



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

WALMIR EMANUEL MIRANDA CUNHA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE
Cissampelos sympodialis Eichl (MENISPERMACEAE)

CRATO – CE

2015

WALMIR EMANUEL MIRANDA CUNHA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE
***Cissampelos sympodialis* Eichl (MENISPERMACEAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular (Linha de pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

CRATO – CE

2015

Cunha, Walmir Emanuel Miranda.
C972e Estudo químico e atividade antimicrobiana das raízes de
Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae)/ Walmir
Emanuel Miranda Cunha. – Crato-CE, 2015
125p.; il.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri –
URCA. Linha de pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.
Orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

1. *Cissampelos sympodialis*; 2. Isolamento; 3. Alcaloides;
4. Atividade antimicrobiana; 5. Atividade moduladora.
I. Título.

CDD: 615.32

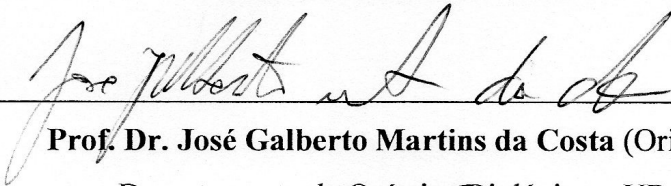
WALMIR EMANUEL MIRANDA CUNHA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE
***Cissampelos sympodialis* Eichl (MENISPERMACEAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



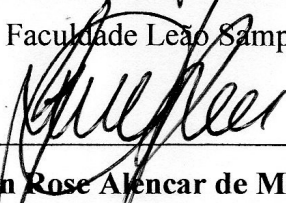
Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Orientador)

Departamento de Química Biológica – URCA



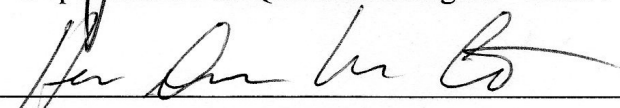
Prof. Dr. Thiago Fonseca Silva (Avaliador Externo)

Faculdade Leão Sampaio - FALS



Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Avaliador Interno)

Departamento de Química Biológica - URCA



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Suplente)

Departamento de Química Biológica - URCA

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca mediram esforços e estímulo para garantir minha formação, a minha irmã e meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o dom da vida, e me dar forças para vencer os obstáculos, mesmo quando estes pareciam grandes demais.

Aos meus pais, Lucileide Gonçalves de Miranda Rodrigues e Walmir Rodrigues Cunha, por me educar e me amar incondicionalmente, nunca medindo esforços para minha felicidade e minha educação sempre motivando e me incentivando nos estudos, devo essa vitória a eles. A minha irmã Luana Miranda Cunha, por participar de todas as etapas importantes em minha vida e por compartilhar comigo um amor que a cada dia cresce mais, meu sobrinho Levi Miranda Rodrigues de Souza, titio te ama.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa por me mostrar o mundo científico e estar presente me guiando durante a maior parte de minha vida acadêmica, sou muito grato pelas oportunidades, conselhos e ensinamentos que hoje me fazem mais crítico sobre o universo da ciência.

A professora Ma. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, por estar também presente durante boa parte de minha vida acadêmica, como uma segunda orientadora, agradeço pela oportunidade de desfrutar novos conhecimentos como microbiologia e bromatologia, além dos concelhos e momentos de descontração.

Ao programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular e toda sua equipe na pessoa do Coordenador Allysson Pontes Pinheiro.

Aos professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da – URCA pelo incentivo e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos amigos que fiz durante as disciplinas, principalmente as “Josés”, Débora Odília Duarte Leite, por dividir as alegrias e as dores de cabeça enfrentadas durante o mestrado, e Cícera Jaciele Mattos Cassiano pelos bons momentos vivenciados durante as disciplinas. Além de Luciene, Ingrid, Fernando, Rodolfo, Válter, que também estavam presentes nos momentos de estudo e descontração.

Aos meus amigos da vida toda, George Souza Feitoza, Enaylle Delmondes de Brito, Marineide Gomes de Farias, Monica Laurentino e Cleiciane Diniz Martins, por me acolherem como amigo, compartilhando alegrias desde a graduação. Um obrigado especial a George, por me incentivar a fazer o mestrado, me ajudar a estudar, e sempre estar presente como amigo, muito obrigado.

Aos meus colegas de Laboratório (LPPN) Janaine, Dayane, Liana, Camila, Erlânio, Fábio e mais recentemente Carol, Carla e Wégila, pelo ambiente agradável de amizade e companheirismo e por ajudar no possível para a realização desse trabalho.

A professora Dr^a. Telma Leda Gomes de Lemos coordenadora do Laboratório de Biotransformação e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará - UFC, por me acolher em seu laboratório e possibilitar que parte desse trabalho fosse realizado. Obrigado também aos membros do LBPN (André, Gisele, Juliana, Cleane, Anderson, Rafaela, Felipe, Thalissa e Romésio) por me acolherem como colega e amigo, mesmo sendo um biólogo no meio de químicos, consegui me integrar graças a ajuda de vocês.

A Universidade Regional do Cariri – URCA, por me possibilitar a formação acadêmica, desde a graduação e agora com mais essa etapa.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo fomento.

A todos os meus familiares e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

“O conhecimento científico é a força motriz que geri a inteligência a favor da vida. Em outras palavras, a ciência é a única condição de sobrevivência. ”

(Diego Góes)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 RERERENCIAL TEÓRICO.....	25
3.1 Alcaloides.....	25
3.1.1 Ocorrência Natural	25
3.1.2 Funções para as plantas	27
3.1.3 Origem biossintética	28
3.1.4 Atividades biológicas	35
3.2 Informações botânicas.....	37
3.2.1 Família Menispermaceae	37
3.2.2 Gênero <i>Cissampelos</i>	39
3.2.2.1 Usos populares do gênero <i>Cissampelos</i>	39
3.2.2.2 Atividades biológicas do gênero <i>Cissampelos</i>	41
3.2.2.3 Alcaloides do gênero <i>Cissampelos</i>	44
3.2.3 <i>Cissampelos sympodialis</i>	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 Material vegetal	67
4.2 Métodos cromatográficos.....	68

4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)	68
4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	68
4.3 Espectrometria de massas	69
4.4 Métodos espectroscópicos	69
4.4.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	69
4.5 Métodos físicos	70
4.5.1 Ponto de fusão	70
4.6 Estudo dos alcaloides de <i>C. sympodialis</i>	70
4.6.1 Preparação do extrato e obtenção da fração alcaloídica (FARCs)	70
4.6.2 Fracionamento cromatográfico da FARCs	73
4.6.3 Tratamento de F31-35 e isolamento ALCS-1	73
4.7 Avaliação antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)	74
4.8 Avaliação da atividade moduladora a aminoglicosídeos	75
4.9 Análises Estatísticas	75
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 77
5.1 Determinação estrutural dos alcaloides de <i>C. sympodialis</i>	77
5.1.1 Determinação estrutural de ALCS-1	77
5.2 Atividade antibacteriana	90
5.3 Atividade moduladora a aminoglicosídeos	95
 6 CONCLUSÕES	 106
 REFERÊNCIAS	 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas metabólicas de formação dos aminoácidos precursores de alcaloides. Formação da L-lisina e L-ornitina pela via do acetato, mediante ciclo de Krebs, e formação da L-tirosina, L-fenilalanina e L-triptofano pela via do chiquimato.....	29
Figura 2: Reação de Mannich. Na primeira parte mostrando a formação da base de Schiff, e em seguida sua reação com um nucleófilo, formando um novo esqueleto carbônico, base na formação dos alcaloides.....	31
Figura 3: Condensação de Pictet-Spengler, na formação de uma tetrahidroisoquinolina (I).	32
Figura 4: condensação de Pictet-Spengler, na formação de uma tetra-beta-carbonila (II). ...	33
Figura 5: Representação das reações de acoplamento fenólico, importante na formação do esqueleto carbônico de alcaloides aromáticos.....	34
Figura 6: Distribuição geográfica (em vermelho) de espécies da família Menispermaceae..	37
Figura 7: Distribuição de Menispermaceae no Brasil. O gráfico em barras mostra a distribuição por regiões, já o gráfico em forma de pizza mostra quanto os domínios fitogeográficos.....	38
Figura 8: Biossíntese dos alcaloides benzilisoquinolínicos e derivados; quatro enzimas atuam catalizando o acoplamento fenólico para originar as demais subclasses, BBE (Berberine Bridge Enzyme), CYP719B1 (salutaridina sintase), CYP80A1 (berbamunina sintase) e CYP80G2 (corytuberina sintase).....	62
Figura 9: <i>Cissampelos sympodialis</i> . Detalhe de suas folhas.....	63
Figura 10: <i>Cissampelos sympodialis</i> . Detalhe de suas raízes.	64
Figura 11: <i>Cissampelos sympodialis</i> . Detalhe de seus frutos	64
Figura 12: Momento da coleta e seleção das raízes de <i>Cissampelos sympodialis</i>	67
Figura 13: Esquema representando a extração ácido-base de alcaloides, mostrando a conversão de alcaloide livre em sal de alcaloide em meio ácido (aq.) e a conversão do sal em alcaloide livre em meio alcalino (aq.).....	71
Figura 14: Espectro de RMN ¹³ C [125 MHz, CDCl ₃] de AICS-1.....	78
Figura 15: Espectro de RMN ¹³ C DEPT 135° [125 MHz, CDCl ₃] de AICS-1.	79

Figura 16: Estruturas do núcleo básico dos alcaloides aporfínicos, da hemangerina, da bulbocapnina e da estrutura proposta para ALCS-1.....	80
Figura 17: Espectro de massas (IE, 70 eV) de ALCS-1.....	82
Figura 18: Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.	83
Figura 19: Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMQC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.	84
Figura 20: Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.	85
Figura 21: Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.....	86
Figura 22: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.....	87
Figura 23: Expansão 3 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.....	88
Figura 24: Estruturas da bulbocapnina e do ALCS-1.	90
Figura 25: Estrutura química da berberina.	93
Figura 26: Estrutura química da stephanina (1) e da crebanina (2).	93
Figura 27: Estrutura química da cocsolina.....	94
Figura 28: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a <i>S. aureus</i> ATCC 12692. Legenda: a significa análise versus controle ($a_4 = p < 0,0001$; $a_2 = p < 0,01$); b análise versus o isolado ($b_2 = p < 0,01$); c análise versus a fração ($c_2 = p < 0,01$; $c_4 = p < 0,0001$).....	100
Figura 29: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922. Legenda: a significa análise versus controle ($a_1 = p < 0,05$; $a_4 = p < 0,0001$); b análise versus o isolado ($b_2 = p < 0,01$; $b_4 = p < 0,0001$); c análise versus a fração ($c_4 = p < 0,0001$)	101
Figura 30: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a <i>S. mutans</i> ATCC 0046. Legenda: a significa análise versus controle ($a_4 = p < 0,0001$); b análise versus o isolado ($b_4 = p < 0,0001$)	101

Figura 31: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *P. aeruginosa* ATCC 15442. Legenda: **a** significa análise versus controle (a3=p<0,001; a4= p<0,0001); **b** análise versus o isolado (b1=p<0,05; b4=p<0,0001) 102

Figura 32: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *E. coli* 27. Legenda: **a** significa análise versus controle (a1= p<0,05; a2=p<0,01; a3=p<0,001; a4=p<0,0001); **b** análise versus o isolado (b4=p<0,0001); **c** análise versus a fração (c2=p<0,01) 102

Figura 33: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *S. aureus* 358. Legenda: **a** significa análise versus controle (a2= p<0,01; a3=0,001; a4= p<0,0001); **b** análise versus o isolado (b4=p<0,0001); **c** análise versus a fração (c2=p<0,01; c3=p<0,001)..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Uso de espécies do gênero <i>Cissampelos</i> na medicina popular.....	41
Tabela 2: Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Cissampelos</i>	42
Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero <i>Cissampelos</i>	45
Tabela 4: Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN 13C-BB e DEPT 135° [125 MHz, CDCl ₃] de ALCS-1..	77
Tabela 5: Comparação entre os deslocamentos químicos de carbono-13 de ALCS-1, hemangerina (RUFINO et al., 2005) e bulbocapnina (WET et al., 2005).	81
Tabela 6: Correlações heteronucleares (¹³ C x ¹ H) a curta e longa distância [125 MHz, CDCl ₃] de ALCS-1.....	89
Tabela 7: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico das raízes de <i>C. sympodialis</i> (EERCs), da sua fração alcaloídica (FARCs) e do alcaloide isolado (ALCS-1).	91
Tabela 8: Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do extrato etanólico das raízes de <i>C. sympodialis</i> (EERCs). Valores expressos em média ± erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.	96
Tabela 9: Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença da fração dos alcaloides das raízes de <i>C. sympodialis</i> (FARCs). Valores expressos em média ± erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.	97
Tabela 10: Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do alcaloide ALCS-1 isolado das raízes de <i>C. sympodialis</i> . Valores expressos em média ± erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Núcleo básico das principais classes de alcaloides.....	36
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero <i>Cissampelos</i>	51

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Esquema da obtenção do EERCs e da FARCes.....	72
Fluxograma 2: Esquema do isolamento de ALCS-1.	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APORFIN	- Aporfínico
ATCC	- Coleção de cultura tipo americana
AZAFLU	- Azafluorantênico
BB	- <i>Broad Band</i>
BHI	- Caldo de infusão de cérebro e coração
BIQ	- Benzilisoquinolínico
BIS-BIQ	- Bisbenzilisoquinolínico
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	- Clorofórmio deuterado
CIM	- Concentração inibitória mínima
CYPs	- Citocromos P
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
EM	- Espectrometria de massas
eV	- Eletrovolt
HMBC	- <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	- <i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
IDH	- Índice de deficiência de hidrogênio
IFN- γ	- Interferon gama
IL	- Interleucina
m/z	- Relação massa carga
MHz	- Megahertz
MORFIN	- Morfinândienônico
OXOCAN	- Stephaoxocano
PRO-APORFIN	- Pro-aporfínico
PROTOB	- Tetrahidroprotoberberínico
RMN ^{13}C	- Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ^1H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SAM	- S-adenosilmetionina
TROPOLI	- Tropoloisoquinolínico
UFC/mL	- Unidade formadora de colônia por mililitro

RESUMO

Cissampelos sympodialis é uma trepadeira endêmica do Brasil, distribuída desde Minas Gerais até o Ceará, conhecida popularmente como “jarrinha”, “milona”, “orelha-de-onça” e “abuteira”, é empregada na medicina alternativa principalmente no tratamento da asma, e de problemas associados ao trato respiratório. Essa espécie, bem como outras do gênero *Cissampelos* e da família Menispermaceae, é rica em alcaloides, principalmente os derivados do núcleo benzilisoquinolínico. O alcaloide warifteína (bisbenzilisoquinolínico) é relatado como majoritário para *C. sympodialis*, apresentando ações farmacológicas comprovadas, principalmente como imunomodulador. O presente estudo teve como objetivo isolar alcaloides das raízes de *C. sympodialis* bem como investigar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico (EERCs), da fração alcaloídica (FARCs) e dos alcaloides isolados contra as linhagens de *S. aureus* ATCC 12692, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. mutans* ATCC 0046 e isolados clínicos *S. aureus* 358 e *E. coli* 27. O extrato foi obtido por maceração, e a fração alcaloídica por extração ácido-base. FARCs foi cromatografada em coluna cromatográfica usando como adsorvente gel de sílica, e a cromatografia em camada delgada foi usada para monitorar as frações obtidas, usando Dragendorff como revelador. A partir da investigação química foi possível o isolamento de ALCS-1, que por análise de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massa, e correlações bidimensionais (HMQC e HMBC), foi possível identificar a estrutura química. ALCS-1 corresponde a um alcaloide aporfínico isômero da bulbocapina, sendo relatado pela primeira vez como metabólito secundário vegetal. A avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição mostrou que o EERCs não apresenta resultado clinicamente significativo frente as linhagens testadas, por apresentar concentração inibitória mínima (CIM) $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, entretanto a FARCs mostrou-se ativa, principalmente frente a *S. aureus* ATCC 12692, *S. aureus* 358 e *E. coli* ATCC 25922 com CIM de $256 \mu\text{g/mL}$, e frente a *E. coli* 27 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 com CIM de $512 \mu\text{g/mL}$. ALCS-1 mostrou-se ativo frente a *S. aureus* ATCC 12692 e *E. coli* 27 com CIM de $256 \mu\text{g/mL}$, e frente a *S. aureus* 358, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 com CIM de $512 \mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade modificadora da resistência a aminoglicosídeos observou-se que tanto o EERCs quanto a FARCs apresentaram sinergismo em todas as linhagens testadas, potencializando a ação dos antibióticos, na maioria dos casos revertendo o fenótipo bacteriano de resistente para sensível. O ALCS-1 apresentou menor efeito modificador do fenótipo de resistência a aminoglicosídeos, apresentando antagonismo na interação com a amicacina frente a *E. coli* 27. Os melhores resultados foram observados para a CIM/8 do EERCs ($128 \mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente *S. mutans* ATCC 0046, reduzindo a CIM em 87,5% (de 64 para $8 \mu\text{g/mL}$) revertendo o fenótipo de resistente para sensível; para a CIM/8 da FARCs ($128 \mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente a linhagem de *S. aureus* ATCC 12692, reduzindo a CIM do antibiótico em 92,12% (de 64,04 para $5,04 \mu\text{g/mL}$), alterando o fenótipo bacteriano de resistente para sensível; e para a CIM/8 do ALCS-1 ($64 \mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente a linhagem de *P. aeruginosa* ATCC 15442, reduzindo a CIM em 87,5% (de 50,8 para $6,35 \mu\text{g/mL}$), alterando o fenótipo de resistente para sensível. Os resultados apontam que os produtos testados representam um potencial agente antimicrobiano, principalmente modulando positivamente antibióticos, o que pode estar relacionado a alcaloides antimicrobianos presentes na fração. Esta é a primeira descrição da atividade antimicrobiana e moduladora para o extrato e fração alcaloídica das raízes de *C. sympodialis*.

Palavras-chave: *Cissampelos sympodialis*; Isolamento; Alcaloides; Atividade antimicrobiana; Atividade moduladora.

ABSTRACT

Cissampelos sympodialis is an endemic vine of Brazil, distributed from Minas Gerais to Ceará, popularly known as "jarrinha", "milona", "orelha-de-onça" and "abuteira" used in traditional medicine especially in the treatment of asthma, and problems associated with respiratory tract. This species, as well as other similar *Cissampelos* and Menispermaceae family, is rich in alkaloids, mainly derivatives of benzilisoquinoline core. The warifteine (bisbenzilisoquinoline) alkaloid reported as majority to *C. sympodialis*, has proven pharmacological actions, primarily acting as an immunomodulator. This study aimed to isolate alkaloids of *C. sympodialis* roots and to investigate the antimicrobial activity of ethanol extract (EERCs), alkaloidal fraction (FARCs) and the alkaloid isolated against strains of *S. aureus* ATCC 12692, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. mutans* ATCC 0046 and clinical isolates *S. aureus* 358 e *E. coli* 27. The extract was obtained by maceration, and the fraction alkaloidal by acid-base extraction. FARCs was chromatographed using chromatography column whit silica gel as adsorbent, and the thin layer chromatography was used for monitoring the fractions using Dragendorff to visualization of spots. From the chemical investigation was possible to isolate one of the ALCS, which by ¹H NMR and ¹³C NMR analysis, mass spectrometry, and two-dimensional correlation (HMQC and HMBC) were identified the chemical structure. ALCS-1 corresponds to an aporfinic alkaloid isomer bulbocapina, was reported first as a plant secondary metabolite. Evaluation of the antimicrobial activity by microdilution showed that EERCs does not present clinically significant result against the tested strains, to present MIC ≥ 1024 µg/mL, however the FARC show is active mainly against *S. aureus* ATCC 12692, *S. aureus* 358 and *E. coli* ATCC 25922 with MIC 256 µg/mL, and for *E. coli* 27 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 with MIC 512 µg/mL. ALCS-1 show is active mainly against *S. aureus* ATCC 12692 and *E. coli* 27 with MIC 256 µg/mL, and against *S. aureus* 358, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 with MIC 512 µg/mL. In the evaluation of modifying activity of aminoglycoside resistance was observed that both the EERCs as FARCs showed synergism in all tested strains enhances the activity of antibiotics, in most cases reversing the bacterial phenotype resistant to sensitive. The ALCS-1 showed lower modifying effect of the aminoglycosides phenotype resistance, showing antagonism in interaction with amikacin for *E. coli* 27. The best results were observed in: MIC/8 from EERCS (128 µg/mL) combined with neomycin against *S. mutans* ATCC 0046, reducing the MIC in 87.5% (from 64 to 8 µg/mL) reversing the phenotype of resistant to sensitive; for MIC/8 from FARCs (128 µg/mL) combined with neomycin against *S. aureus* ATCC 12692, reducing the MIC of the antibiotic 92.12% (from 64.04 to 5.04 µg/mL), changing bacterial phenotype of resistant to sensitive; and the MIC/8 from ALCS-1 (64 mg / mL) in combination with neomycin for *P. aeruginosa* ATCC 15442 strain, reducing the MIC of 87.5% (6.35 to 50.8 mg / mL) changing the phenotype of resistant to sensitive. The results indicate that the tested products represent a potential antimicrobial agent, particularly modulating positively antibiotics, which may relates to antimicrobial alkaloids present in the fraction. This is the first description of antimicrobial activity and modulating to extract and alkaloidal fraction of *C. sympodialis* roots.

Keywords: *Cissampelos sympodialis*; Isolation; Alkaloids; Antimicrobial activity; modulation.

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam infinidades de substâncias que são responsáveis tanto por suas funções bioquímicas básicas quanto, em alguns casos, de defesa contra predadores e patógenos. O metabolismo vegetal pode ser caracterizado como primário ou secundário. No metabolismo primário ocorrem os processos essenciais à vida e são comuns aos seres vivos. Já no secundário, ocorre a produção de substâncias que conferem vantagens adicionais à sobrevivência no ambiente (SANTOS, 2010).

Os metabólitos secundários de plantas são classificados em três grupos básicos quanto suas vias biossintéticas: compostos fenólicos, como os flavonoides; terpenos, como monoterpenos e sesquiterpenos; e compostos contendo nitrogênio, cujos principais representantes são os alcaloides (PARSAEIMEHR; SARGSYAN; VARDANYAN, 2011). Além de funções inerentes ao vegetal, esses metabólitos possuem aplicações medicinais, nutritivas e cosméticas (SEIGLER et al., 1998), o que justifica e valida a utilização empírica das plantas como forma alternativa no tratamento de distúrbios fisiológicas, fitoterapia. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações destas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011), o que impulsiona a pesquisa sobre esses vegetais a fim de garantir segurança ao usuário, principalmente quanto ao uso indiscriminado, além de estudos a respeito da composição química e bioatividade dessas moléculas.

A indústria farmacêutica vê nas plantas um potencial promissor na elaboração de fármacos, e ao longo da história pode-se destacar diversas plantas fontes de importantes medicamentos como: digoxina (*Digitalis lanata*), digitoxina (*Digitalis purpurea*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*), pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) e o taxol (*Taxus brevifolia*) (BARREIRO, 1990). Assim a indústria utiliza as substâncias ativas como protótipo para o desenvolvimento de novas drogas e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos (que são as próprias substâncias isoladas), como para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, como fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2010).

Entre as substâncias ativas oriundas do metabolismo vegetal, grande interesse tem sido atribuído aos estudos dos alcaloides, tanto por suas propriedades químicas quanto pelo seu

potencial farmacológico. Os alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas. Os alcaloides verdadeiros são sintetizados a partir de aminoácidos, embora existam substâncias nitrogenadas derivadas de bases púricas como as metilxantinas chamada por muitos pesquisadores de pseudoalcaloides (HENRIQUES et al., 2010). Embora as ações dos alcaloides sobre o próprio vegetal ainda não sejam tão esclarecidas, estudos apontam diversas atividades biológicas atribuídas a eles. Os alcaloides, principalmente os indólicos, podem agir nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (RIVAS et al., 1999), por isso, são amplamente utilizados como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante muscular (PEREIRA et al., 2007).

Além da conhecida ação dos alcaloides sobre o SNC, grande atenção tem sido dada a eles depois do isolamento de um alcaloide com potente ação anticancerígena, a leurocristina (vincristina, Oncovir®), presente em *Catharanthus roseus*. Isso fez com que os pesquisadores buscassem nos alcaloides uma fonte natural de anticancerígenos, ou como protótipos na elaboração de novos antitumorais. (POTIER, 1992; CARVALHAES et al., 2002).

A família Menispermaceae, de distribuição tropical e subtropical, é particularmente rica em alcaloides. Nas últimas décadas, maior atenção tem sido dada aos gêneros *Stephania* e *Cissampelos*, visto que seus extratos e alcaloides isolados mostram bioatividade (HU et al., 2008; SEMWAL et al., 2010; BARBOSA-FILHO et al. 2000; ASSIS et al., 2013). *Cissampelos sympodialis* é uma trepadeira encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do país, do Ceará a Minas Gerais, conhecida popularmente como milona e jarrinha (EICHLER, 1887). Suas raízes são usadas na medicina popular no tratamento de inflamações, asma, bronquite, gripe, resfriado, artrite, reumatismo e infecções urinárias (CORREA, 1929; BEZERRA-SANTOS et al., 2004; BEZERRA-SANTOS et al., 2005; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008).

Estudos apontam que as atividades biológicas presentes em *C. sympodialis* são oriundas da presença de alcaloides. Dentre os alcaloides presentes destacam-se a milonina, laurifolina, roraimina, metilwarifteína e warifteína, sendo esta última o alcaloide majoritário encontrado nas raízes de jarrinha. A warifteína é um alcaloide bisbenzilisoquinolínico e já foi estudado quanto sua atividade relaxante do músculo liso vascular e não-vascular, espasmolítica, além de efeitos imunomodulatórios (CORTES et al, 1995; FREITAS et al, 1996; COSTA et al., 2008; ROCHA et al., 2010; COSTA et al., 2013).

C. sympodialis é bastante estudada e investigada quanto suas propriedades antiasmáticas, porém não existem estudos na literatura descrevendo suas propriedades antibacterianas, posto isso, a fim de contribuir com o estudo químico e biológico de *C. sympodialis*, o presente trabalho relata o isolamento e a determinação estrutural de alcaloides do extrato etanólico das raízes de *C. sympodialis*, bem como a atividade antimicrobiana, moduladora do extrato etanólico, da fração alcaloídica e de alcaloides isolados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e determinar a estrutura química de alcaloides do extrato etanólico das raízes de *C. sympodialis*, além de avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora a aminoglicosídeos do extrato, fração e alcaloides de *C. sympodialis*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar alcaloides das raízes de *C. sympodialis*;
- Identificar e/ou elucidar a estrutura química de alcaloides isolados de *C. sympodialis*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico, fração alcaloídica e alcaloides isolados;
- Verificar a ação moduladora da atividade antibiótica de aminoglicosídeos do extrato etanólico, fração alcaloídica e alcaloides isolados;

REFERENCIAL TEÓRICO

3 RERERENCIAL TEÓRICO

3.1 Alcaloides

Alcaloides (termo linguisticamente derivado da palavra árabe *alquali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são uma grande classe de metabólitos nitrogenados, que possuem em sua maioria caráter alcalino. Existe certa dificuldade na definição dessa classe, visto a ausência de separação precisa entre os alcaloides e outros compostos naturais nitrogenados (HENRIQUES et al., 2010). Em 1988 para contornar essa dificuldade Pelletier formulou uma definição para esses compostos, sendo a mais aceita até hoje para ele “um alcaloide seria uma substância orgânica de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é restrita entre os organismos vivos”.

3.1.1 Ocorrência Natural

Os alcaloides podem ser encontrados em vários reinos, porém sua maior ocorrência e distribuição encontram-se nas plantas superiores. Em animais, principalmente em anuros já foram isolados aproximadamente 300 alcaloides pertencentes a mais de 24 classes, dos quais se destacam os alcaloides esteroidais neurotóxicos, como a batrachotoxina e a homobatrachotoxina potentes toxinas, ambas isoladas da pele do sapo colombiano *Phyllobates aurotaenia*. Embora em menor proporção, também há relatos da presença de compostos semelhantes a alcaloides isolados de artrópodes, poríferos e mamíferos. Em microrganismos pode-se citar os alcaloides do ergo como a canoclavina-1, agroclavina, ergoclavina, ergonovina (ergometrina) e ergocristina, isolados do fungo *Claviceps purpurea*, primeiros alcaloides a serem isolados de fungos. De bactérias, principalmente do gênero *Pseudomonas*, são conhecidos os alcaloides tabtoxina e pyocianina (EVANS, 2009a; PELLETIER, 1983).

Alcaloides verdadeiros possuem rara ocorrência em plantas inferiores (briófitas e pteridófitas) e gimnospermas. Nas angiospermas a distribuição de alcaloides é bastante

desigual. As ordens de dicotiledôneas Salicales, Fagales, Curcubitales e Oleales são consideradas como sendo livres de alcaloides. Alcaloides são comumente encontrados nas ordens Centrospermae (Chenopodiaceae), Magnoliales (Lauraceae, Magnoliaceae), Ranunculales (Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae), Papaverales (Papaveraceae, Fumariaceae), Rosales (Leguminosae, subfamília Papilionaceae), Rutales (Rutaceae), Gentiales (Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae), Tubiflorae (Boraginaceae, Convolvulaceae, Solanaceae) e Campanulales (Campanulaceae, subfamília Lobelioideae; Compositae, subfamília Senecioneae) (EVANS, 2009a).

Durante o processo evolutivo, mutações modificaram de forma sutil e gradual o metabolismo original dos vegetais. Compostos intermediários oriundos do metabolismo primário começaram a ser produzidos e novas rotas metabólicas surgiram. Evidências sugerem que diversificação molecular certamente tenha ocorrido devido à duplicação e diversificação de genes envolvido no metabolismo principal (OBER; HARTMANN, 2000). Os alcaloides possuem muitos precursores e várias vias biossintéticas, o que pode representar estágios diferentes de evolução entre as plantas indicando relações quimiotaxonômicas, como por exemplo os alcaloides do acônito. A presença de alcaloides também pode indicar proximidade evolutiva entre famílias, como por exemplo, a presença de alcaloides indolmonoterpênicos, encontrados em Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae, usado como critério para a proximidade dessas famílias como Asteridae (HENRIQUES et al., 2010).

Os alcaloides podem ser encontrados em todos os órgãos e tecidos do vegetal, folhas, galhos, brotos, raízes, além de sementes. A presença desse metabólito em determinado tecido, contudo, não representa exatamente seu local de biossíntese, visto que muitos alcaloides sofrem transporte e distribuição por todo o vegetal. A determinação da origem tissular da produção de alcaloides se dá pela identificação de enzimas envolvidas em sua síntese. Esses compostos são sintetizados no retículo endoplasmático, porém enzimas responsáveis por algumas das etapas da via biossintética foram encontrados em mitocôndrias e cloroplastos, o que indica que essas organelas estão envolvidas em etapas intermediárias de produção dos alcaloides, provavelmente na produção de compostos intermediários. Após a produção são então armazenados nos vacúolos, ou então podem ser transportados para outras partes do vegetal, como ocorre com a nicotina que é produzido nas raízes de espécies do gênero *Nicotiana*, depois é distribuída por toda a planta, concentrando-se em maior quantidade nas folhas. A busca pela localização dos tecidos responsáveis pela produção de metabólitos proporciona a tentativa de sua síntese por meio de cultura celular. Nesse sentido vários

alcaloides já foram sintetizados em laboratórios diretamente dos tecidos produtores por meio desse método (WINK, 1987; EVANS, 2009b; HENRIQUES et al., 2010).

3.1.2 Funções para as plantas

Os metabólitos secundários garantem aos vegetais certas vantagens que permitiram maior sucesso no ambiente, principalmente fornecendo defesas contra predadores e microrganismos patógenos. Entretanto, são poucas as evidências das funções reais dos alcaloides para a planta (EVANS, 2009a).

Os alcaloides podem fornecer resistência à herbivoria devido ao fato de a maior parte dessas substâncias possuírem sabor amargo, o que afugentaria possíveis predadores. Esse fato poderia ser interpretado como condição determinante para o sucesso evolutivo das plantas produtoras dessa classe de compostos, o que levaria a predominância dessas plantas em detrimento daquelas não produtoras de alcaloides. Porém esse fato não é observado e isso indica que a produção de alcaloide não deve estar envolvida apenas para a defesa da planta (HENRIQUES et al., 2010).

Devido a característica de base fraca os alcaloides têm a capacidade de se ligar a compostos ácidos, como por exemplo os alcaloides de cinchona encontram-se naturalmente conjugados com os ácidos quínico e cinchotânico, outro exemplo são os alcaloides do ópio que se apresentam complexados com ácido meconíco. Isso pode ser indicativo de duas funções: os alcaloides poderiam estar envolvidos na manutenção de um equilíbrio ácido-base no organismo vegetal, neutralizando ácidos orgânicos que possam ser produzidos em excesso, ou então, assegurando um meio de armazenar e transportar ácidos específicos pela planta, isso pode ser demonstrado em espécies de Solenaceae, em que os ésteres de tropano formadas nas raízes são translocados para as partes aéreas, onde então ocorre a hidrólise do alcaloide e repartição do ácido libertado (HENRIQUES et al., 2010; EVANS, 2009a).

O nitrogênio é um dos fatores limitantes do crescimento vegetal, nesse ponto os alcaloides podem representar uma forma de armazenamento desse elemento. Foi observado (embora haja exceções) que diversas plantas produtoras de alcaloides aumentam sua síntese em condições de excesso de nitrogênio. Já em condições de estresse de nitrogênio, estes alcaloides são quebrados para dar suporte ao metabolismo vegetal (CHAPIN III; SCHULZE; MOONEY, 1990).

Os alcaloides também podem estar relacionados na defesa do vegetal contra microrganismos e vírus (WINK, 1993), na redução do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (LARSON; MARLEY, 1984; LARSON, 1988), além da proteção que essas moléculas oferecem contra a radiação ultravioleta, principalmente devido a presença de núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (SAMUELSSON, 1994).

3.1.3 Origem biossintética

Os metabólitos secundários são originados pelo processo de derivação e construção de blocos ativos. Existem apenas quatro blocos ativos responsáveis pela síntese dos metabólitos secundários. A acetil coenzima A (acetil-CoA) é usada na via do acetato, e o ácido chiquímico na via do chiquimato. O terceiro bloco, o ácido mevalônico, é ativo na via do mevalonato, e o último, 1-deoxixilulose-5-fosfato, é chave na via da deoxixilulose fosfato. A construção desses blocos requer energia e precursores específicos, que são originados no metabolismo primário. Dessa forma a construção dos blocos ativos é o ponto de conexão entre o metabolismo primário e secundário nos vegetais (ANISZEWSKI, 2007).

Os alcaloides são sintetizados a partir de certos aminoácidos, porém esses aminoácidos precisaram ser formados por meio dos blocos ativos do metabolismo primário. A figura 1 mostra as vias e os principais intermediários na formação dos aminoácidos precursores de alcaloides.

A glicose oriunda do processo fotossintético pode seguir por duas rotas básicas do metabolismo vegetal, a glicólise e o ciclo das pentoses. Na glicólise uma molécula de glicose sofre várias reações originando duas moléculas de piruvato como produto final. Na glicólise

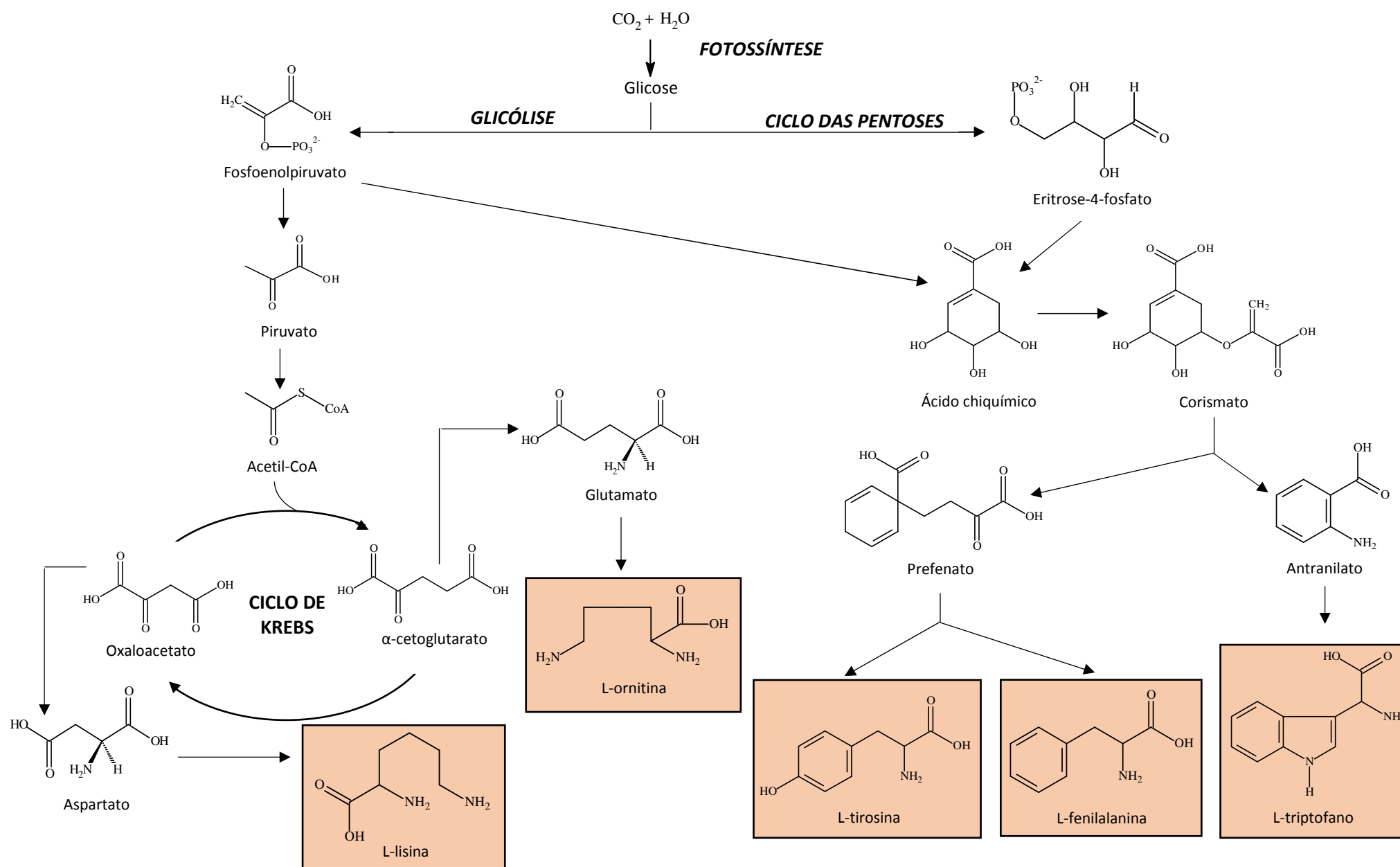


Figura 1: Rotas metabólicas de formação dos aminoácidos precursores de alcaloides. Formação da L-lisina e L-ornitina pela via do acetato, mediante ciclo de Krebs, e formação da L-tirosina, L-fenilalanina e L-triptofano pela via do chiquimato. (Adaptado de SIMOES).

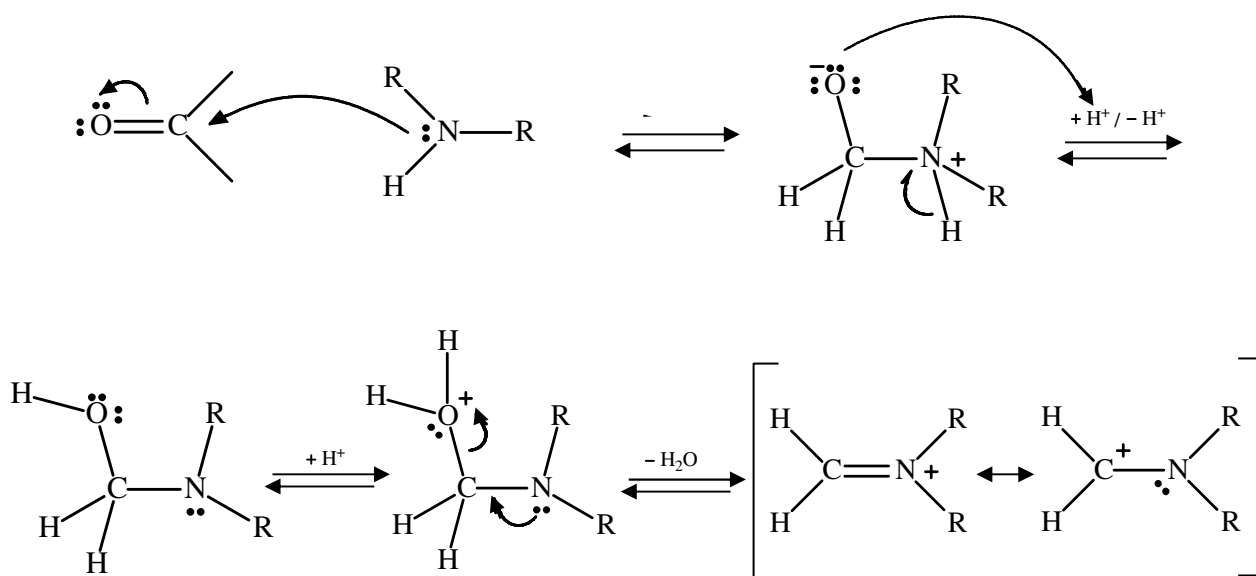
aeróbica o piruvato é convertido a acetil-CoA nas mitocôndrias participando do ciclo de Krebs (via do acetato). Esse ciclo é responsável pela síntese de muitos precursores de metabólitos secundários. O glutamato e o aspartato, aminoácidos oriundos desse ciclo e seus derivados, ornitina e lisina, respectivamente, são precursores na formação de alcaloides. No ciclo das pentoses, durante uma de suas etapas, é formado o composto intermediário eritrose-4-fosfato, que por condensação aldólica origina o ácido chiquímico. O ácido chiquímico também pode ser originado pela condensação aldólica do fosfoenolpiruvado, intermediário da formação do piruvato na glicólise. Pela via do chiquimato são produzidos os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, precursores dos alcaloides aromáticos. Alguns intermediários na síntese desses aminoácidos também podem atuar como elementos chave na síntese de algumas classes de alcaloides, como por exemplo, o aspartato e o antracilato (HENRIQUES et al., 2010,).

Os alcaloides verdadeiros, por regra, derivam de aminoácidos proteicos. Porém existem alcaloides derivados da ornitina, que é um aminoácido não-proteico. A ornitina em sua via de formação é originada a partir do glutamato, que é um aminoácido proteico. Dessa forma os alcaloides sintetizados tendo a ornitina como precursor, também são classificados como verdadeiros, pois possuem em sua via biossintética a presença de um aminoácido proteico (ANISZEWSKI, 2007).

A diversidade estrutural dos alcaloides é muito grande, sendo esse um dos critérios usados em sua divisão por grupos. Os alcaloides verdadeiros podem ser divididos em vários grupos, dentre os principais estão: pirrolizidinas; tropanos; pirrolidinas; piridinas; piperidinas; quinolizidinas; indolizidinas; quinoleínas; quinazolininas; benzoxazinas; indóis; imidazóis e as quinoleínas (HENRIQUES et al., 2010; EVANS, 2009a).

As rotas metabólicas de síntese dos alcaloides vem sendo muito estudadas, porém, algumas etapas dessas vias ainda não estão bem esclarecidas. Contudo, há consenso entre os químicos que três reações principais se mostram como pedra fundamental na biossíntese dos alcaloides: I) a reação de Mannich de uma base de Schiff com um nucleófilo, II) a condensação de Pictet-Spengler, e III) a reação de acoplamento fenólico (DEWICK, 2009).

A figura 2 representa a reação de Mannich de uma base de Schiff com um nucleófilo. Quando um aldeído ou uma cetona se condensa com uma amina e ocorre a eliminação de água, o produto resultante é uma base de Schiff. Esta espécie é um forte eletrófilo e pode atrair um nucleófilo de qualquer fonte de origem. Frequentemente, o produto dessa reação apresenta um novo esqueleto carbônico reforçado com um núcleo heterocíclico. As figuras 3 e 4 representam a reação de condensação de Pictet-Spengler.



Base de Schiff

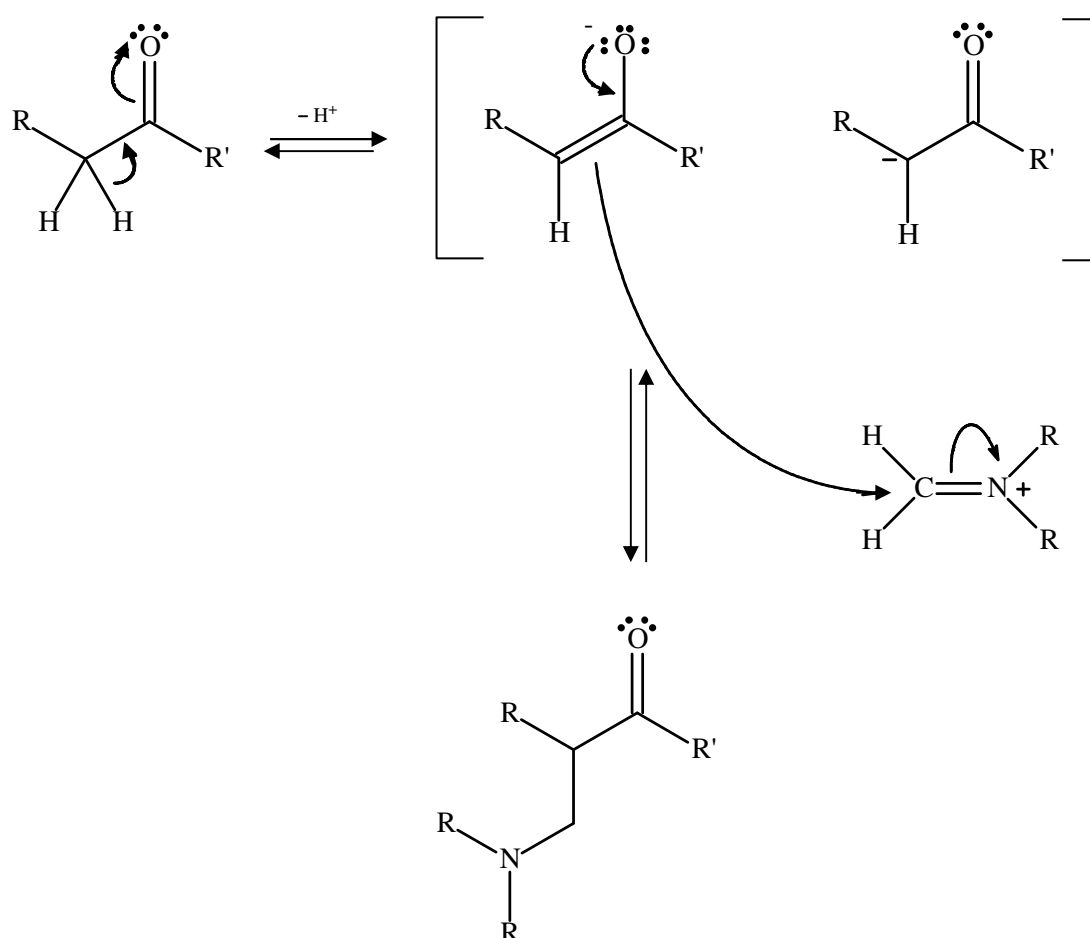


Figura 2: Reação de Mannich. Na primeira parte mostrando a formação da base de Schiff, e em seguida sua reação com um nucleófilo, formando um novo esqueleto carbônico, base na formação dos alcaloides.

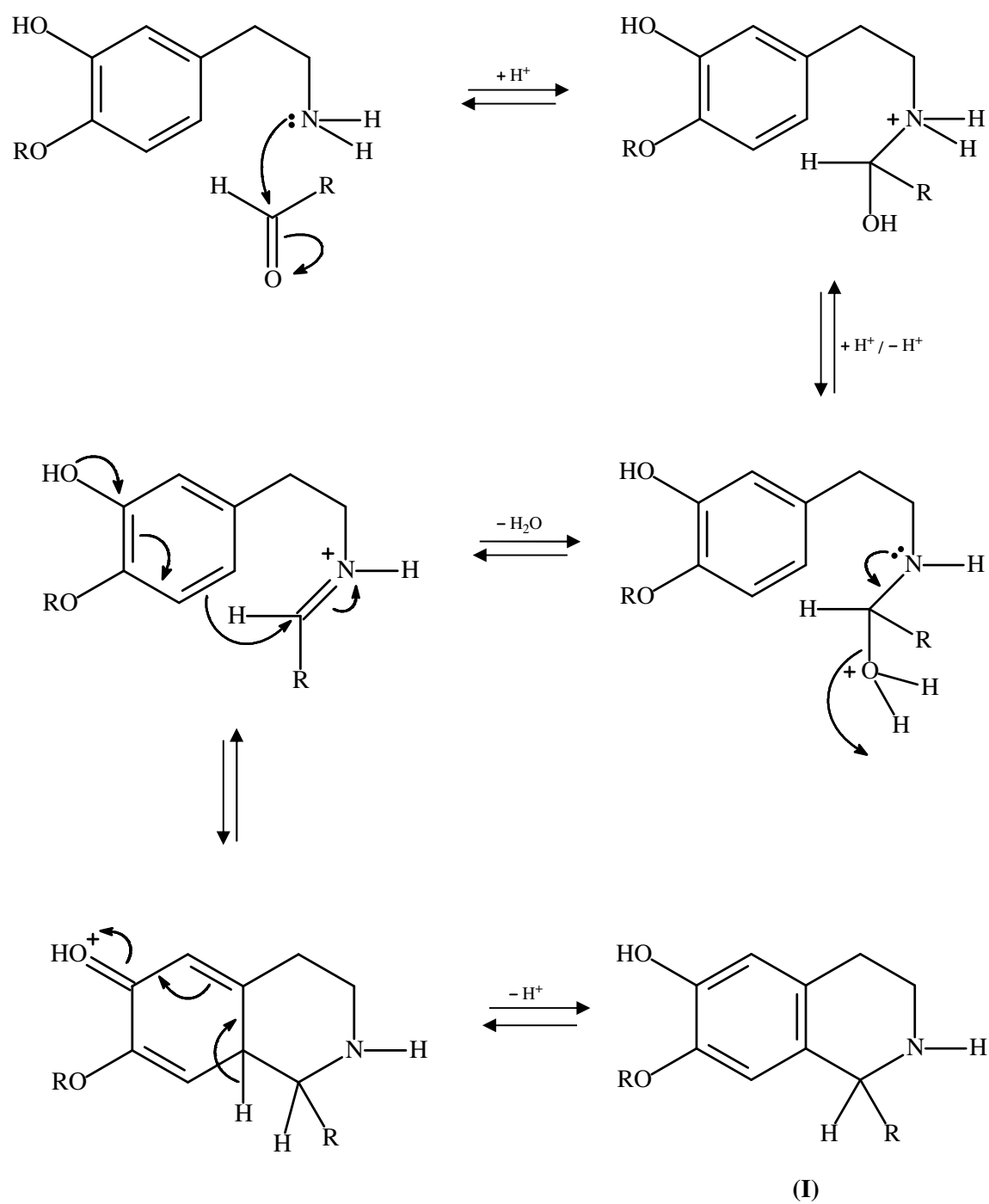


Figura 3: Condensação de Pictet-Spengler, na formação de uma tetrahydroisoquinolina (I).

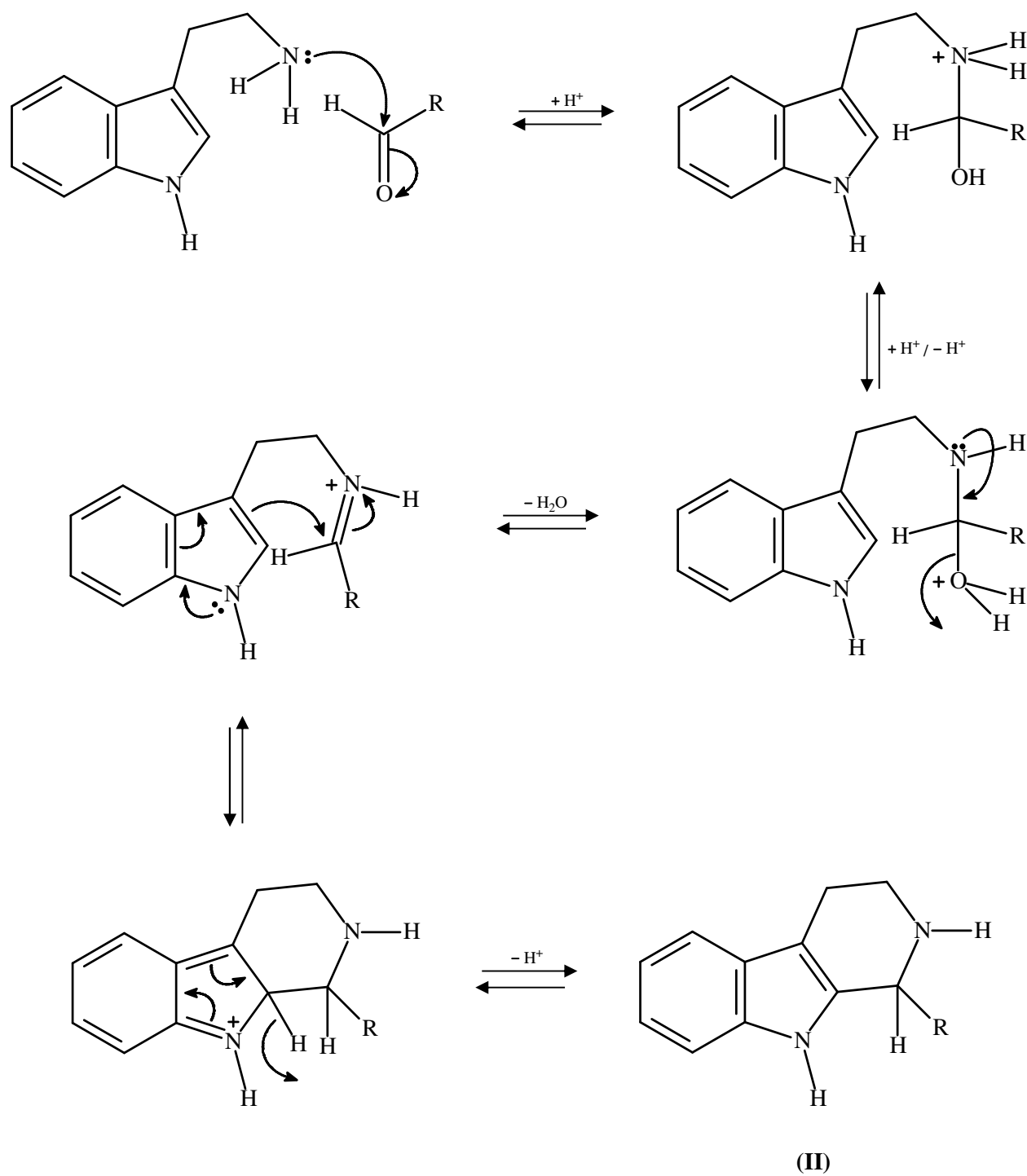


Figura 4: condensação de Pictet-Spengler, na formação de uma tetra-beta-carbonila (II).

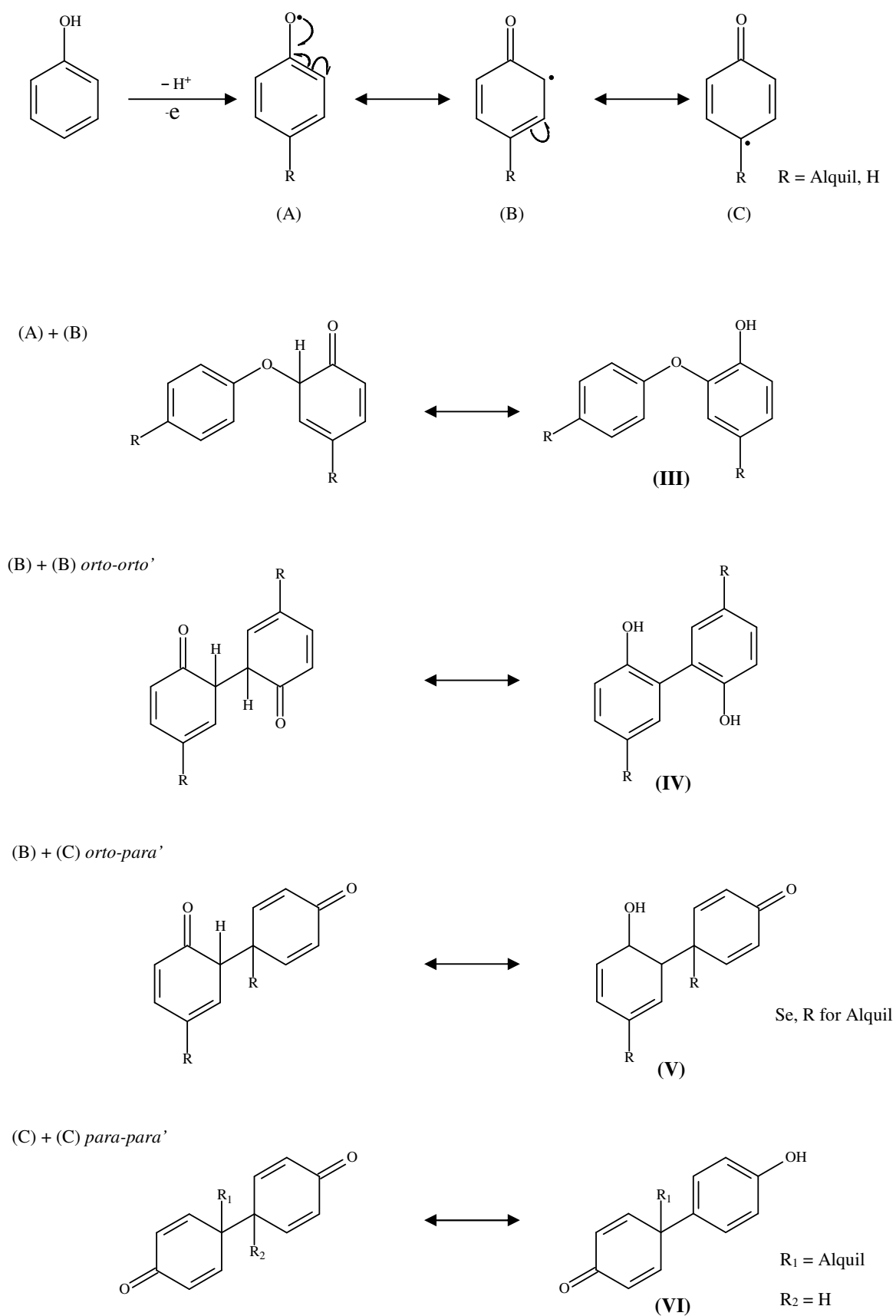


Figura 5: Representação das reações de acoplamento fenólico, importante na formação do esqueleto carbônico de alcaloides aromáticos.

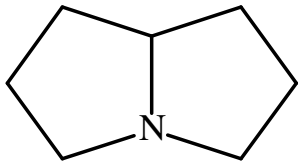
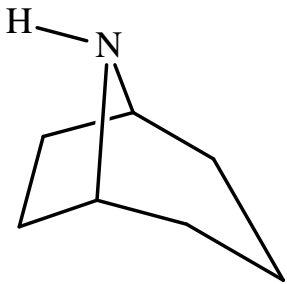
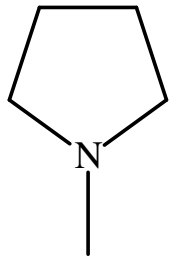
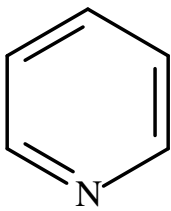
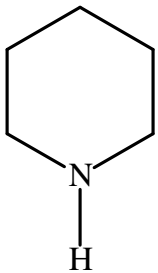
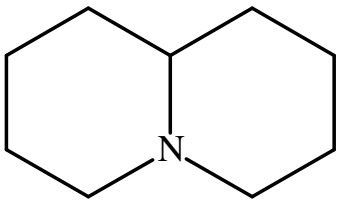
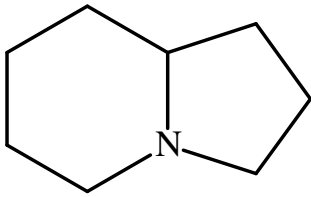
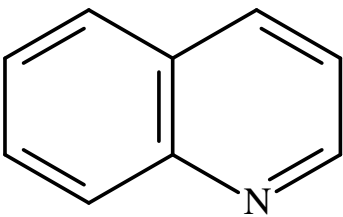
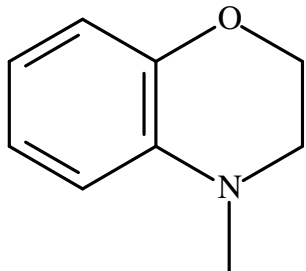
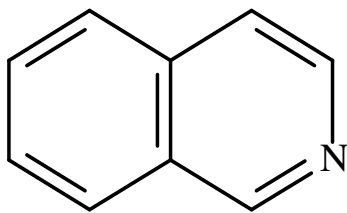
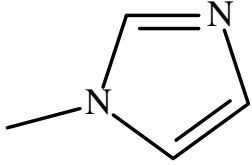
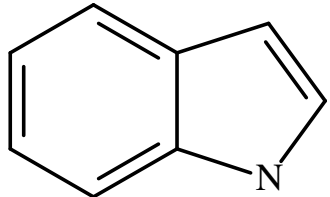
Quando uma base de Schiff é atacada intermolecularmente por um núcleo aromático, o produto é quase sempre uma tetrahidroisoquinolina (I) ou uma tetra-beta-carbonila (II). Outra reação importante na formação de alcaloides é a reação de acoplamento fenólico (figura 5). Quando uma hidroxila de um composto fenólico é oxidada pela perda de um hidrogênio, um radical intermediário altamente reativo é produzido, que pode ser capturado tanto internamente, quanto por outra unidade contendo um radical, para formar diferentes produtos, incluindo aqueles derivados da formação de ligação carbono-oxigênio (III) e carbono-carbono nas posições *orto*- (IV) ou *para*- (V e VI) do radical fenólico. Dessa maneira, novas ligações são produzidas aumentando a variedade estrutural a partir do esqueleto básico dos alcaloides. A reação de acoplamento fenólico é mais observada nas vias de biossíntese dos alcaloides derivados da fenilalanina e tirosina (CORDELL; CHOI, 2010).

O aminoácido não-proteico L-ornitina dá origem às classes de alcaloides chamadas pirrolizidinas, tropanos e pirrolidinas. A L-lisina origina as classes piperidinas, quinolizidinas e indolizidinas. O L-triptofano dá origem aos alcaloides indólicos. Ambos os aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina dão origem à classe isoquinoleínas. O aspartato, intermediário na via de síntese da L-lisina, origina as piridinas, e o antracilato, intermediário na síntese de aminoácidos aromáticos, origina as quinoleínas, quinazolinas e benzoxazinas. Além disso a histidina também pode estar envolvida na síntese de alcaloides, originando a classe dos imidazóis. (HENRIQUES et al., 2010; ANISZEWSKI, 2007, EVANS, 2009a). O quadro 1 mostra o esqueleto básico de cada uma das principais classes de alcaloides.

3.1.4 Atividades biológicas

Diversas atividades biológicas são citadas para os vários alcaloides já isolados. Dentre as primeiras ações comprovadas estão os efeitos que algumas classes de alcaloides exercem sobre o sistema nervoso. Esse efeito foi primeiramente demonstrado para a morfina, isolada em 1804 pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam, a partir do látex das cápsulas da papoula (*Papaver somniferum*) (BARREIRO e BOLZANI, 2009). A ibogaína, isolada de *Tabernanthe iboga* (Apocynaceae), apresenta ação serotoninérgica central, podendo ter ações reduzindo a fadiga e a fome (SERSHEN; HASHIM; LAJTHA, 1997). Outros alcaloides podem atuar a nível de sistema nervoso tais como a atropina, encontrada na beladona (*Atropa belladonna*), e a muscarina isolada do fungo *Amanita muscaria* (KTZUNG, 2010).

Quadro 1: Núcleo básico das principais classes de alcaloides.

 Pirrolizidinas	 Tropanos	 Pirrolizidinas
 Piridinas	 Piperidinas	 Quinolizidinas
 Indolizidinas	 Quinoleínas	 Benzoxazinas
 Isoquinoleínas	 Imidazóis	 Indóis

As potentes ações dos alcaloides sobre o sistema nervoso incentivaram a prospecção por novas atividades biológicas. Os alcaloides se mostram bastante ativos sendo comprovadas suas ações antimalárica (SENER; ORHAN; SATAYAVIVAD, 2003), antioxidante (HERRAIZ; GALISTEO; CHAMORRO, 2003), como inibidor da acetilcolinesterase (LÓPEZ et al., 2002), analgésica (LOOMIS; PENNING; MILNE, 1989), entre outras. Além disso, vários estudos se mostram promissores utilizando alcaloides potencialmente ativos contra células de linhagens tumorais (POWELL; WEISLEDER; SMITH, 1972; LÚCIO et al., 2011; ZUPKÓ et al., 2009; SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2010).

3.2 Informações botânicas

3.2.1 Família Menispermaceae

Menispermaceae está inserida na ordem Ranunculales, constituindo oito tribos, com cerca de 70 gêneros e 450-500 espécies, apresentando distribuição essencialmente pantropical (figura 6) (ORTIZ; KELLOGG; VAN DER WERFF, 2007; HOOT et al. 2009). Os representantes dessa família se apresentam como arbustos escandentes ou lianas, ervas ou árvores (raramente); são predominantes trepadeiras, sendo poucos indivíduos com caule autossustentável (WATSON; DALLWITZ, 2014).

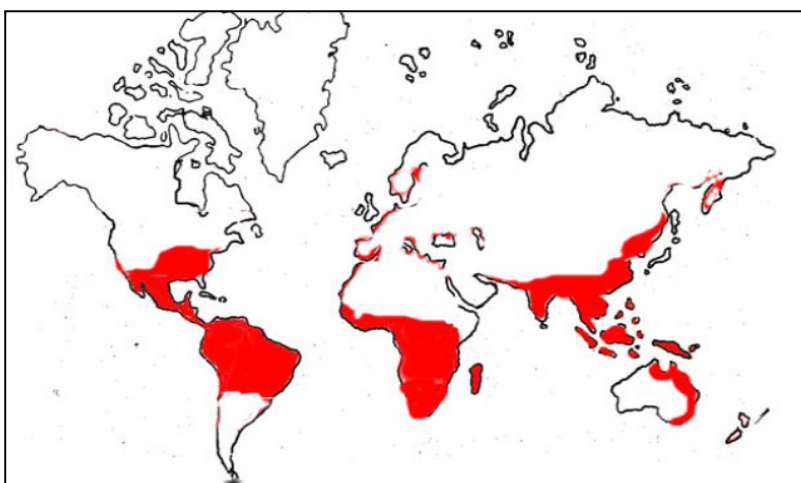


Figura 6: Distribuição geográfica (em vermelho) de espécies da família Menispermaceae.

Fonte: <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/16.%20Menispermaceae.pdf>

Os membros dessa família possuem as seguintes características: Folhas alternas, simples, de forma variada, possuem pecíolo espessado em sua maioria no ápice e/ou base, estípulas ausentes. As inflorescências variam de espigas, racemos, panículas ou cimeras, são axilares ou frequentemente caulifloras com tamanhos e quantidades diferentes entre flores femininas e masculinas. As flores são pequenas (6 mm), unissexuais, normalmente trímeras, de coloração esverdeada, esbranquiçada, marrom ou amarelada. O fruto é uma drupa com exocarpo membranoso e subcoriáceo, com mesocarpo carnoso ou fibroso, e endocarpo lenhoso (RHODES, 1962)

No Brasil são conhecidas 108 espécies de Menispermaceae, distribuídas em 15 gêneros, e dessas, 29 são endêmicas. A figura 7 mostra a distribuição das espécies com relação a região e ao domínio fitogeográfico. Observa-se que a maior parte da diversidade dessa família se encontra localizada na região norte, 92 espécies, enquanto a região nordeste apresenta 28 espécies. Quanto aos domínios fitogeográficos observa-se uma predominância na Amazônia (93 espécies) seguida pela Mata Atlântica (28 espécies), Cerrado (16 espécies) e Caatinga (11 espécies) (BRAGA, 2014).

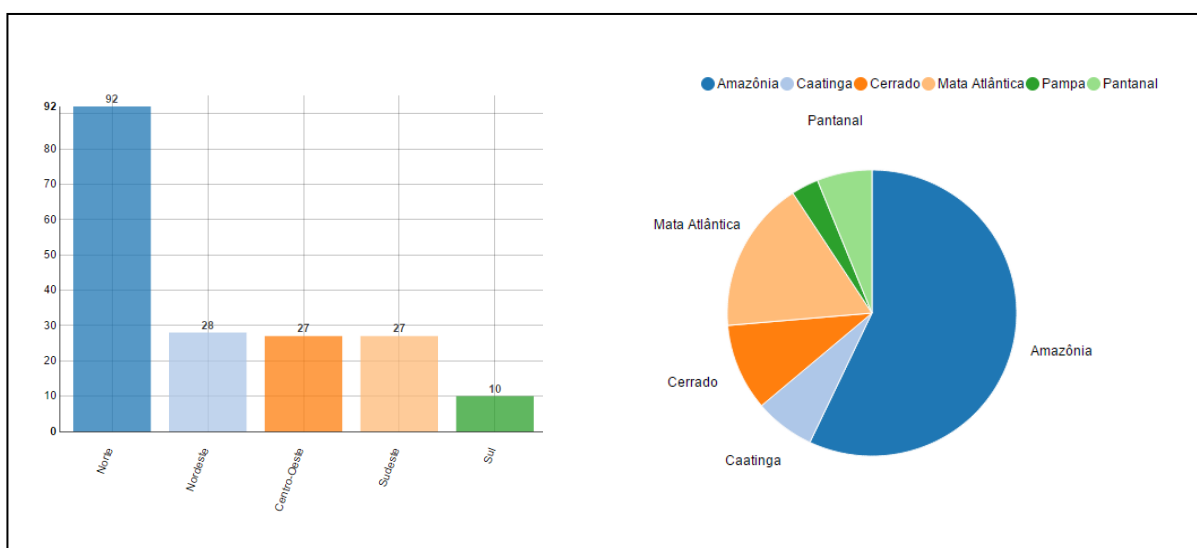


Figura 7: Distribuição de Menispermaceae no Brasil. O gráfico em barras mostra a distribuição por regiões, já o gráfico em forma de pizza mostra quanto os domínios fitogeográficos.

Fonte: <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/16.%20Menispermaceae.pdf>

A família Menispermaceae é particularmente rica em alcaloides, o último levantamento realizado apontou 1.525 estruturas descritos a partir de 159 espécies (BARBOSA-FILHO; CUNHA; GRAY, 2000). Esses vegetais são usados na África, Ásia e América para atordoar peixes (utilizado durante a pesca por indígenas) e para fazer decocções usadas como venenos em dardos e flechas, incluindo o curare. O principal constituinte ativo

do curare é a tubocurarina isolado de *Condrodendron tomentosum* Ruiz & Pav., agindo como potente relaxante muscular (KRUKOFF; SMITH, 1939).

3.2.2 Gênero *Cissampelos*

O gênero *Cissampelos* apresenta 20 espécies, sendo nove distribuídas nas Américas, nove na África, uma na Ásia, e uma de distribuição pantropical, *C. pareira* (RHODES, 1975), porém estudos recentes apontam uma nova espécie endêmica para a América do Sul (ORTIZ e NEE, 2014). No Brasil foram catalogadas dez espécies, destas, cinco são encontradas no nordeste, e uma, *C. sympodialis*, é endêmica para o território brasileiro.

Segundo Rhodes (1975) as espécies desse gênero possuem as seguintes características: trepadeiras herbáceas, sendo uma única espécie arbustiva (*C. ovalifolia*). Possuem folhas alternadas com nervação actinódroma. As flores apresentam no máximo 2 mm de comprimento, com coloração amarela e verde-clara. As flores masculinas caracterizam-se por apresentar quatro sépalas, uma pétala conada, quatro estames com filetes formando um sinandro. As flores femininas são constituídas por uma sépala, uma pétala e um carpelo com estigma trifido. O fruto é uma drupa, oboval.

3.2.2.1 Usos populares do gênero *Cissampelos*

As espécies do gênero *Cissampelos* são largamente utilizadas na medicina tradicional de diversos países, no tratamento de infecções, distúrbios respiratórios, distúrbios gastrintestinais, além de serem usados como analgésico, antipirético, diurético, sedativo, entre outros. A tabela 1 lista os principais usos tradicionais das espécies desse gênero.

Tabela 1: Uso de espécies do gênero *Cissampelos* na medicina popular.

Espécies	Uso tradicional (indicações)	Referências
<i>C. capensis</i>	Tratamento da febre, diabetes, distúrbios estomacais, câncer de pele, cólera e sífilis.	VAN WYK; GERICKE, 2000; VON KOENEN, 2001
	Purificador do sangue e diurético.	WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962
<i>C. glaberrima</i>	Tratamento dos sintomas da asma e infecções urinárias.	PIO-CORRÊA, 1984
<i>C. mucronata</i>	Tratar feridas, indigestão, febre (malária)	JOHNS et al., 1994; GESSLER et al., 1994
	Tratar esquistossomose, e usado como antídoto contra veneno de cobra.	SPARG; VAN STADEN; JAGER 2000; SELVANAYAHGAM et al., 1994
	Tratar dor de estômago em crianças, antidiarréico e para tratar queimaduras.	FALANA; CARTAXO-MARTINS; OFUSORI, 2011
	Para prevenir o aborto, menorragia, como sedativo, e no tratamento de dores de estômago.	OLIVER, 1969
<i>C. owariensis</i>	Tratar problemas circulatórios, ginecológicos, astenia, loucura, contra a diarreia humana e animal, para curar feridas, tratar mordida de cobra, contra a amnésia e psicose.	ADJANOHOOUN et al., 1989; SCHMELZER, 2008
<i>C. pareira</i>	Tratamento de úlceras, diarreia, infecções do trato urinário e como anti-inflamatório.	WARRIER; NAMBIER; RAMANKUTTY, 2005; AMRESH et al., 2007
	Usado como adstringente, antiespasmódico, analgésico, antitérmico, diurético, tônico, anti-helmíntico e emenagogo.	KHARE, 2007; FENG et al., 1962; GOGTE, 2000
	Prevenir ameaça de aborto e parar hemorragias uterinas.	LEWIS; LEWIS, 1977

Tabela 1: Uso de espécies do gênero *Cissampelos* na medicina popular. (cont.)

<i>C. pareira</i>	Tratar feridas, antídoto contra mordida de cobra, tratamento de fístulas, prurido, doenças de pele.	VAIDYA, 1988
	Usado na tosse, dispepsia, hidropisia, problemas genito-urinários como prolapso uterino, cistite, hemorragia, e nefrite calcular.	CACERES; GIRON; MARTINEZ, 1987; KIRTIKAR; BASU, 2001
	Tratar problemas menstruais, como dor, cólicas, sangramentos excessivos, miomas e endometriose, como tônico feminino, usado no equilíbrio hormonal, perda de libido na menopausa, acne hormonal, síndrome pré-menstrual, problemas cardíacos, como antiespasmódico, relaxante muscular.	KUMAR; CHANDRA; KUMAR, 2012
	Antisséptico contra inflamações.	NEUWINGER, 1994
	Agente anti-infertilidade, tratamento da cólera, epilepsia, febre e raiva.	RAJAN; SETHURAMAN; MUKHERJEE, 2002; MAURYA et al., 2004
<i>C. sympodialis</i>	Tratar inflamações, asma, bronquite, resfriados, gripe, artrite, reumatismo, infecções urinárias	PIO-CORRÊA, 1929; BEZERRA-SANTOS et al., 2004; BEZERRA-SANTOS et al., 2005; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; AGRA et al., 2007; PORTO et al., 2008

3.2.2.2 Atividades biológicas do gênero *Cissampelos*

Relatos na literatura indicam que essas espécies representam um potencial na área farmacológica. Dentre os trabalhos realizados com representantes de *Cissampelos* (extratos, frações e/ou isolados) as principais atividades biológicas encontram-se citadas na tabela 2.

Tabela 2: Atividades biológicas de espécies do gênero *Cissampelos*.

Atividade Biológica	Espécie	Referencia
Antimicrobiana	<i>C. mucronata</i> <i>C. pareira</i>	NONDO et al., 2011; KUMAR; CHANDRA; KUMAR, 2012
Leishmanicida	<i>C. sympodialis</i>	(SILVA et al., 2012)
Antiplasmódica	<i>C. mucronata</i> <i>C. Pareira</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003; SINGH; BANYAL, 2011)
Anti-helmíntica	<i>C. Pareira</i> <i>C. capensis</i>	AYERS et al., 2007; SHUKLA; SHUKLA; GOPALAKRISHNA, 2012
Larvicida	<i>C. mucronata</i>	NONDO et al., 2011
Inseticida	<i>C. glaberrima</i>	TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001
Citotóxica	<i>C. sympodialis</i>	MELO et al., 2003
Anticancerígena	<i>C. pareira</i>	AMRESH; RAO; SINGH, 2007b; THAVAMANI; MATHEW; DHANABAL, 2014
Antiespasmódica	<i>C. sympodialis</i>	CORTES et al., 1995
Antiasmática	<i>C. sympodialis</i>	BEZERRA-SANTOS et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2013
Broncodilatadora	<i>C. sympodialis</i>	THOMAS et al., 1997
Antialérgica	<i>C. sympodialis</i>	BEZERRA-SANTOS; PEÇANHA; PIUVEZAM, 2005; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; COSTA et al., 2008; CERQUEIRA-LIMA et al., 2010

Tabela 2: Atividades biológicas de espécies do gênero *Cissampelos*. (cont.)

Antinociceptiva	<i>C. pareira</i>	AMRESH; SINGH; RAO, 2007;
	<i>C. sympodialis</i>	OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011
Anti-inflamatória	<i>C. pareira</i>	AMRESH et al., 2007
Atividade imunomoduladora	<i>C. sympodialis</i>	THOMAS; SELAK; HENSON, 1999; PIUVEZAM et al., 1999; ALEXANDRE-MOREIRA; PIUVEZAM; PEÇANHA, 2003; BEZERRA-SANTOS et al., 2004; VIEIRA et al., 2013; BAFNA; MISHRA, 2010; LIMA et al., 2014
Antidiabética	<i>C. pareira</i>	KUMAR et al., 2011
Diurética	<i>C. pareira</i>	SAYANA et al., 2014b
Antiurólítico	<i>C. pareira</i>	SAYANA et al., 2014 ^a
Gastroprotetor	<i>C. mucronata</i>	NWAFOR; OKOYE, 2005
Ações cardiovasculares	<i>C. sympodialis</i>	MEDEIROS et al., 1998; CAVALCANTE et al., 2010;
	<i>C. pareira</i>	SINGH et al., 2013
Ansiolítico	<i>C. pareira</i>	THAKUR; RANA, 2013
Antidepressiva	<i>C. sympodialis</i>	ALMEIDA et al., 1998; MENDONÇA-NETTO et al., 2007
Antioxidante	<i>C. pareira</i>	AMRESH; RAO; SINGH, 2007a; BAFNA; MISHRA, 2010

3.2.2.3 Alcaloides do gênero *Cissampelos*

O gênero *Cissampelos*, bem como outros representantes da família Menispermaceae, são conhecidos por sintetizar grande quantidade de alcaloides. A maior parte dos alcaloides deste gênero são quimicamente conhecidos como derivados de núcleo isoquinolínico e as informações presentes na literatura apontam que estes apresentam sete tipos de esqueleto diferentes: benzilisoquinolínico (BIQ); bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ); aporfínico (APORFIN); morfinândienônico (MORFIN); tetrahidroprotoberberínico (PROTOB); tropoloisoquinolínico (TROPOLI); azafluorantênico (AZAFLU) (BARBOSA et al., 1997). Entretanto o levantamento realizado aponta mais dois esqueletos para os alcaloides de *Cissampelos*: pro-aporfínico (PRO-APORFIN) e stephaxocano (OXOCAN).

Uma busca realizada na base de dados do Scifinder cruzando os termos *Cissampelos*, substâncias e alcaloides, gerou um total de 58 estruturas diferentes de alcaloides isoladas no gênero, além de três estruturas propostas (não identificadas) e duas substâncias que não apresentavam estrutura química (Menismine e Pareirine). Os resultados da revisão sobre os alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* estão presentes na tabela 3 e no quadro 2.

Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos*.

Substância	Estrutura	Subclasse	Fonte	Referência
Reticulina	1	BIQ	<i>C. campensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Isococclaurina	2	BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003
Laudanosina	3	BIQ	<i>C. pareira</i>	AHMAD; MALIK; ZIA-UL-HAQ, 1992
Warifteína	4	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i> ^{4I} <i>C. sympodialis</i> ^{4II}	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970 ^{4I} ; BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS 1997 ^{4II}
Metilwarifteína	5	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i> ^{5I} <i>C. sympodialis</i> ^{5II}	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970 ^{5I} ; ; BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS 1997 ^{5II}
Des-7'-O-metilroraimina	6	BIS-BIQ	<i>C. sympodialis</i>	MARINHO et al., 2013
epi-Des-7'-O-metilroraimina	7	BIS-BIQ	<i>C. sympodialis</i>	MARINHO et al., 2013
Insulanolina	8	BIS-BIQ	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Insularina	9	BIS-BIQ	<i>C. capensis</i> ^{9I} <i>C. pareira</i> ^{9II}	WET; HEERDEN ; WYK, 2011 ^{9I} ; DWUMA-BADU et al., 1975 ^{9II}

Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos* (cont.)

Cycleanina	10	BIS-BIQ	<i>C. capensis</i> ^{10I} <i>C. pareira</i> ^{10II}	WET; HEERDEN ; WYK, 2011 ^{10I} , DWUMA-BADU et al., 1975 ^{10II}
Cissacapina	11	BIS-BIQ	<i>C. capensis</i> ^{11I}	WET; HEERDEN ; WYK, 2011 ^{11I}
Cissampareina	12	BIS-BIQ	<i>C. pareira</i>	KUPCHAN; PATEL; FUJITA, 1965
(-)-curina	13	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i> ^{13I} <i>C. pareira</i> ^{13II}	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003 ^{13I} ; BOISSER et al., 1965 ^{13II}
R,S-tubocurina	14	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003
S,R-tubocurina	15	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003
Hayatinine	16	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i> ^{16I} <i>C. pareira</i> ^{16II}	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003 ^{16I} ; MUKHERJI; BHANDARI (1959) ^{16II}
R,S-12-O-Metil-curina	17	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003
Tobocurano	18	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003

Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos* (cont.)

Isochondodendrina	19	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i> ^{19I} <i>C. pareira</i> ^{19II}	FERREIRA et al., 1965 ^{19I} ; DWUMA-BADU et al., 1975 ^{19II}
Isoliensinina	20	BIS-BIQ	<i>C. mucronata</i>	TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003
Roraimina	21	BIS-BIQ	<i>C. sympodialis</i>	LIRA et al., 2002
(+)-tetrandrina	22	BIS-BIQ	<i>C. pareira</i>	ROJANASONTHORN, 1970
Dihidrowarifteina	23	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i>	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970
Dimetildihidrowarifteina	24	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i>	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970
Metildihidrowarifteina	25	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i>	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970
Dimetilwarifteina	26	BIS-BIQ	<i>C. ovalifolia</i>	SNEDDEN; PARKER; GORINSKY, 1970
(+)-bebeerina	27	BIS-BIQ	<i>C. pareira</i>	HULLATTI; SHARADA, 2010
Daijisong	28	BIS-BIQ	<i>C. pareira</i>	BUCKINGHAM, 1993
Cissampentina	29	BIS-BIQ	<i>C. fasciculata</i> ^{29I} <i>C. mucronata</i> ^{29II}	GALINIS; WIEMER; CAZIN JR, 1993 ^{29I} ; TSHIBANGU; WRIGHT; KÖNIG, 2003 ^{29II}

Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos* (cont.)

Simpodialina-β-N-óxido	30	BIS-BIQ	<i>C. sympodialis</i>	ALENCAR, 1994
Bulbocapnina	31	APORFIN	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
(+)-dicentrina	32	APORFIN	<i>C. capensis</i> ^{32I} <i>C. pareira</i> ^{32II}	WET; HEERDEN ; WYK, 2011 ^{32I} ; DWUMA-BADU et al., 1975 ^{32II}
Lauroschooltzina	33	APORFIN	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Liriodenina	34	APORFIN	<i>C. sympodialis</i>	LIRA et al., 2002
Cissaglaberrimina	35	APORFIN	<i>C. glaberrima</i>	BARBOSA-FILHO et al., 1997
Laurifolina	36	APORFIN	<i>C. sympodialis</i>	ALENCAR, 1994
Magnoflorina	37	APORFIN	<i>C. pareira</i>	AHMAD; MALIK; ZIA-UL-HAQ, 1992
Oxobuxifolina	38	APORFIN	<i>C. glaberrima</i>	BARBOSA-FILHO et al., 1997
Nuciferina	39	APORFIN	<i>C. pareira</i>	AHMAD; MALIK; ZIA-UL-HAQ, 1992
(+)-Corytuberina	40	APORFIN	<i>C. pareira</i>	AMRESH; SINGH; RAO, 2008
Dehidrodicentrina	41	APORFIN	<i>C. pareira</i>	DWUMA-BADU et al., 1975

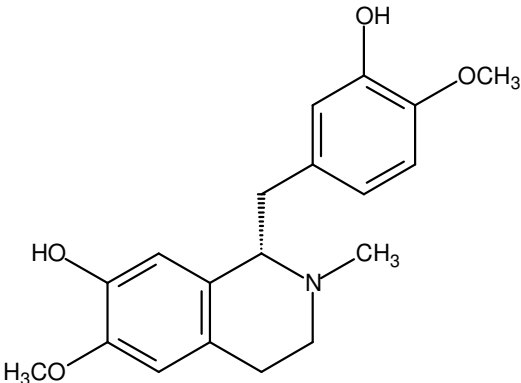
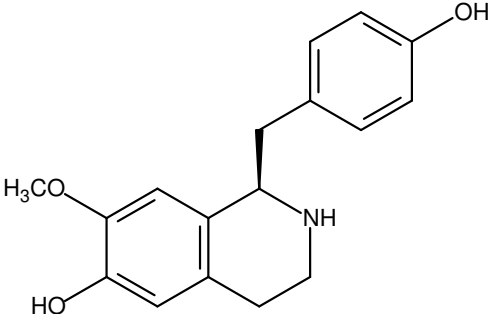
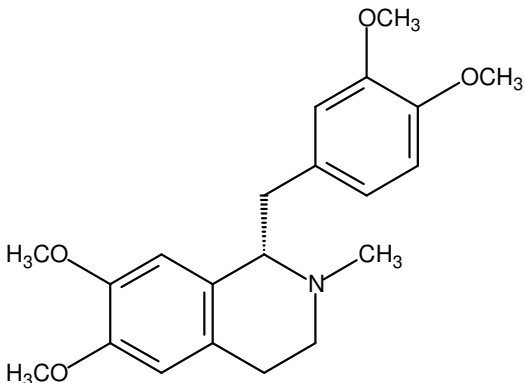
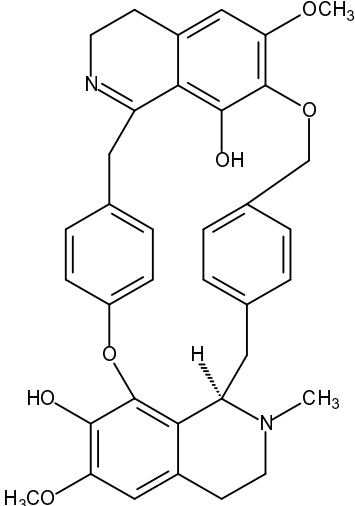
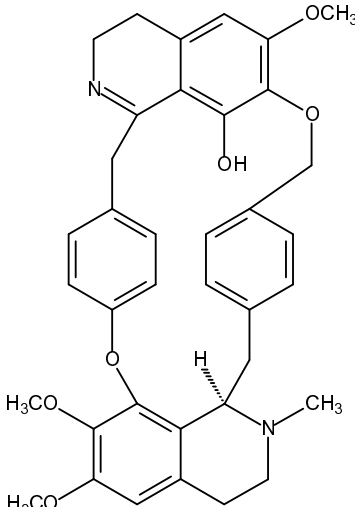
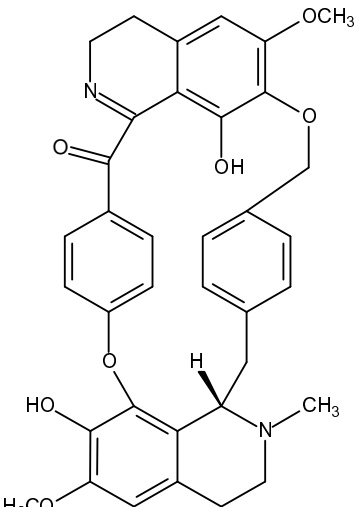
Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos* (cont.)

(+)-Corydina	42	APORFIN	<i>C. fasciculata</i>	GALINIS; WIEMER; CAZIN JR., 1993
Milonina	43	MORF	<i>C. sympodialis</i>	DEFREITAS et al., 1995
Salutaridina	44	MORF	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Steponina	45	PROTOB	<i>C. pareira</i>	ANWER et al., 1968
(-)-cissamina	46	PROTOB	<i>C. pareira</i>	RIVASTAVA; KHARE, 1964
(-)- β -cyclanolina	47	PROTOB	<i>C. pareira</i>	BUCKINGHAM, 1993
Isoimerubrina	48	TROPOLI	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993b
Pareirubrina A	49	TROPOLI	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993b
Pareirubrina B	50	TROPOLI	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993b
Grandirubrina	51	TROPOLI	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993b
Pareitropona	52	TROPOLI	<i>C. pareira</i>	MORITA; TAKEYA; ITOKAWA, 1995

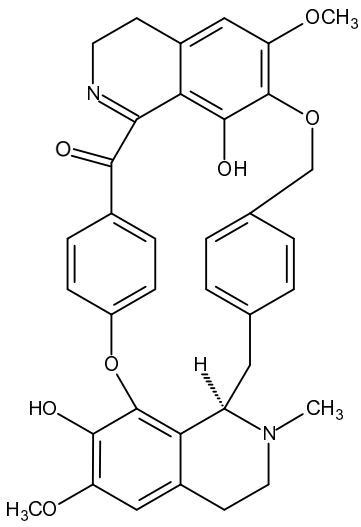
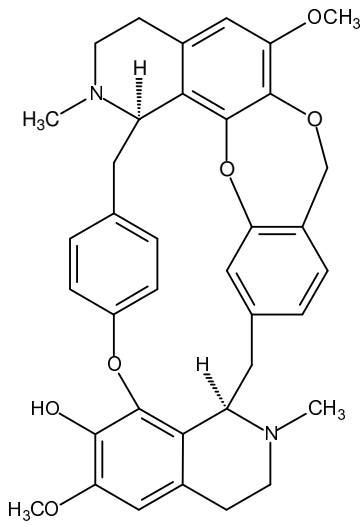
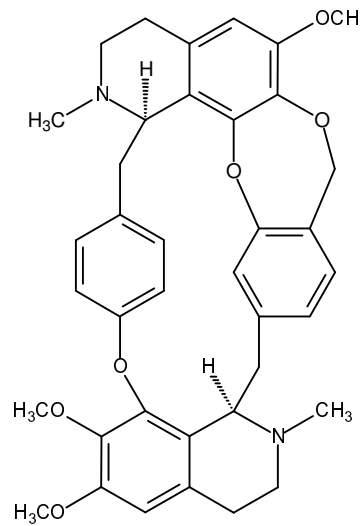
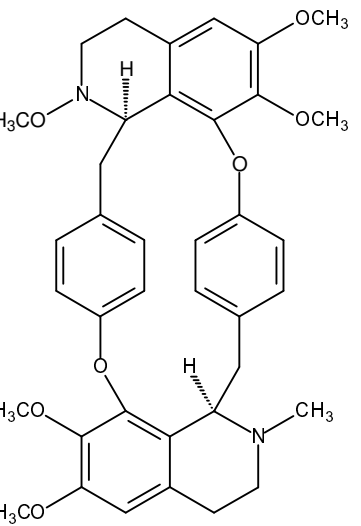
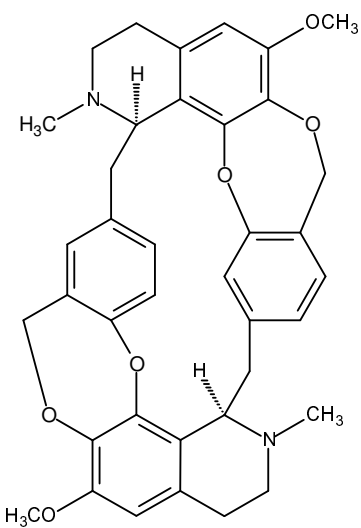
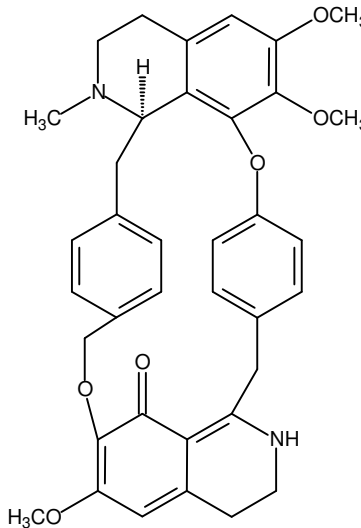
Tabela 3: Alcaloides isolados nas espécies do gênero *Cissampelos* (cont.)

Norimeluteina	53	AZAFLU	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993a
Norruffscina	54	AZAFLU	<i>C. pareira</i>	MORITA et al., 1993a
Eletefina	55	OXOCAN	<i>C. glaberrima</i>	DA-CUNHA et al., 1998
Pronuciferina	56	PRO-APORFIN	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Glaziovina	57	PRO-APORFIN	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011
Crotsparina	58	PRO-APORFIN	<i>C. capensis</i>	WET; HEERDEN ; WYK, 2011

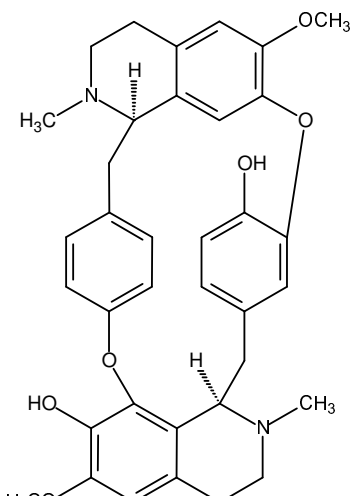
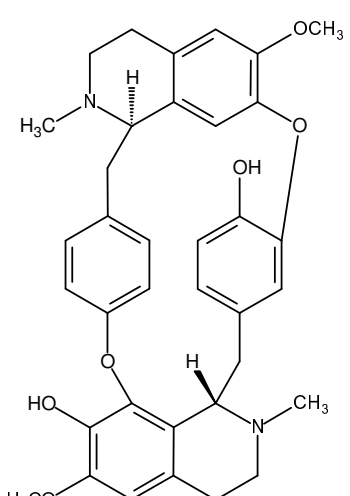
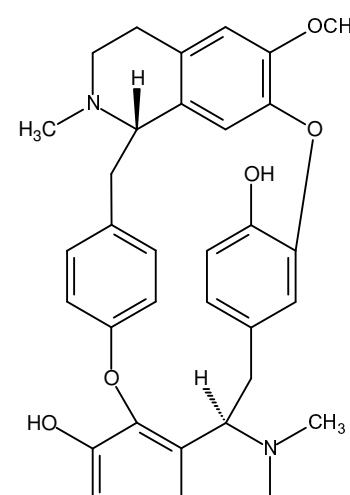
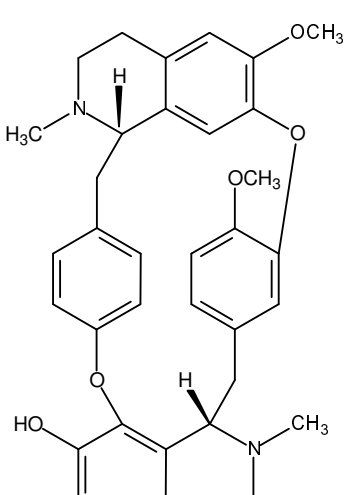
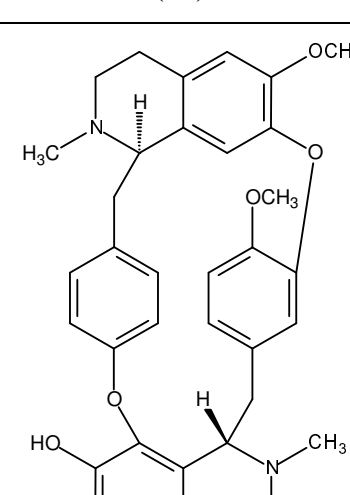
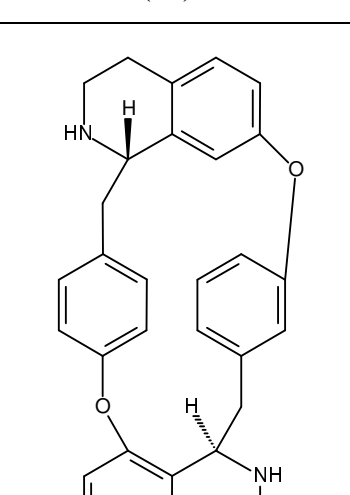
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos*.

 (1)	 (2)
 (3)	 (4)
 (5)	 (6)

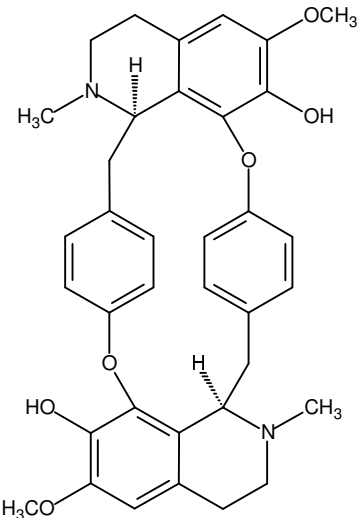
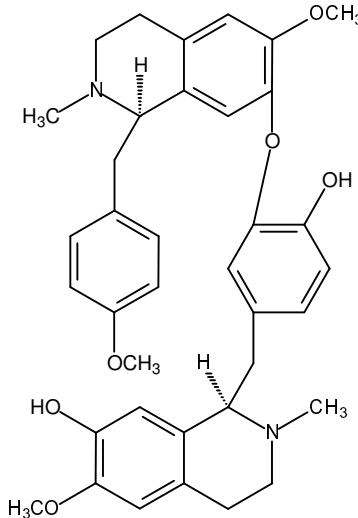
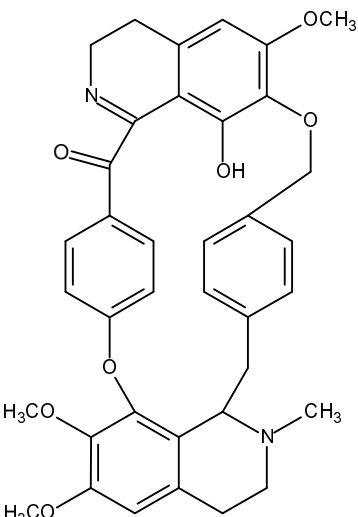
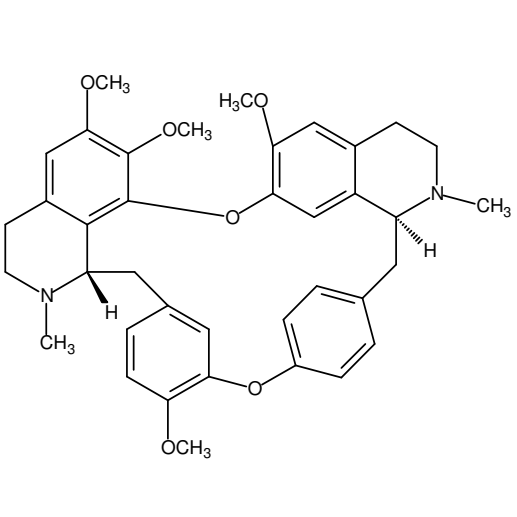
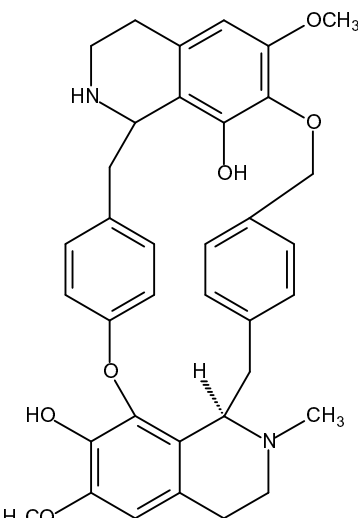
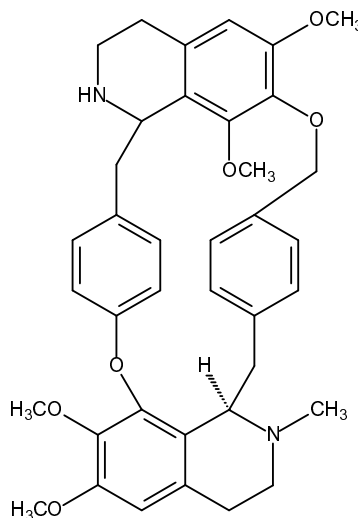
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (7)	 (8)
 (9)	 (10)
 (11)	 (12)

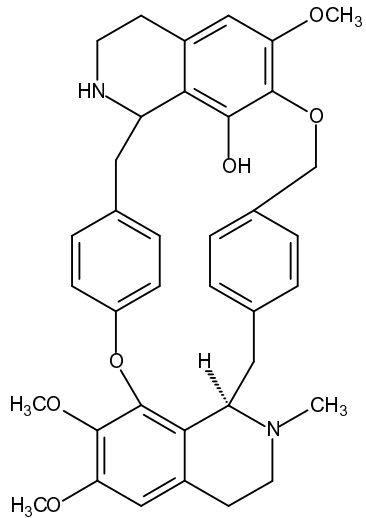
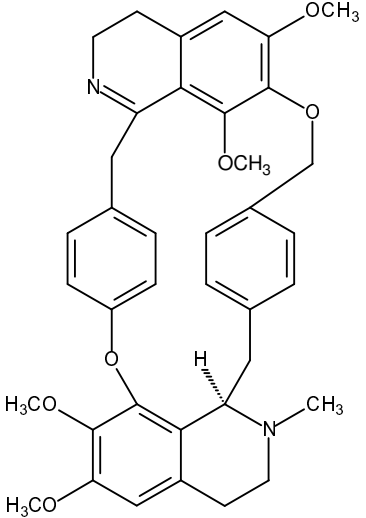
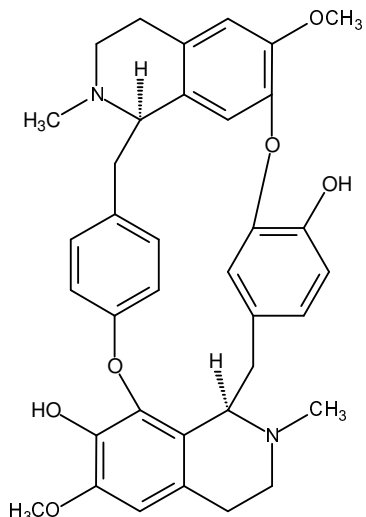
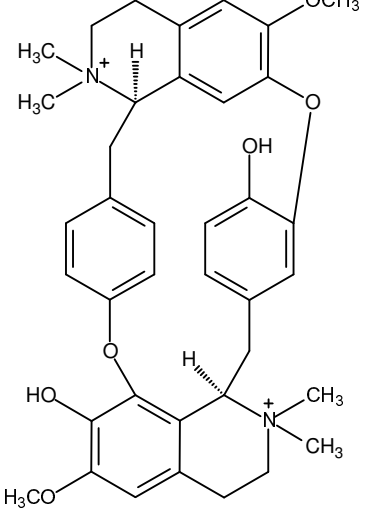
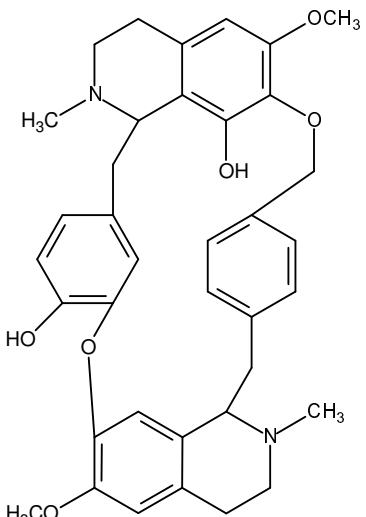
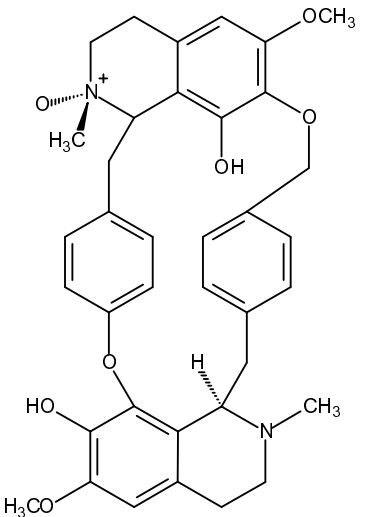
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (13)	 (14)
 (15)	 (16)
 (17)	 (18)

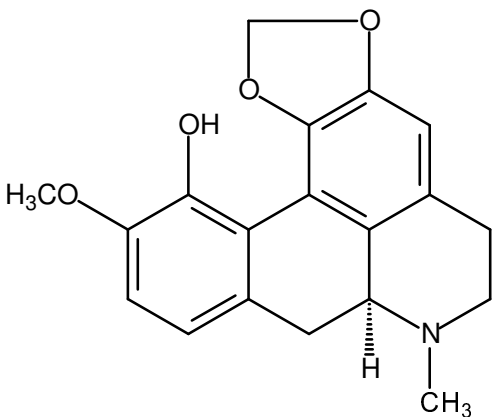
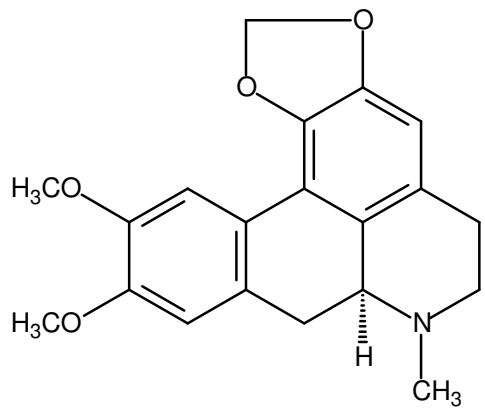
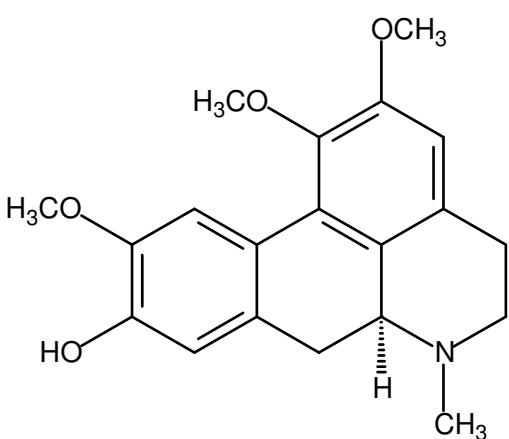
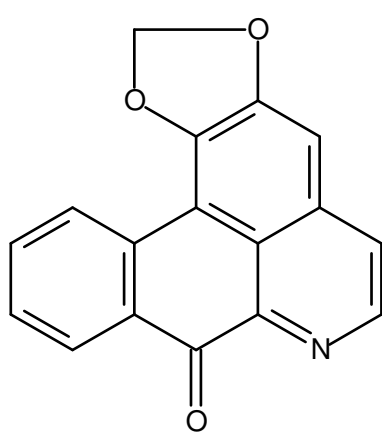
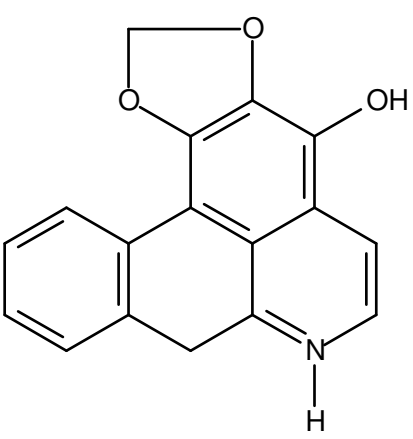
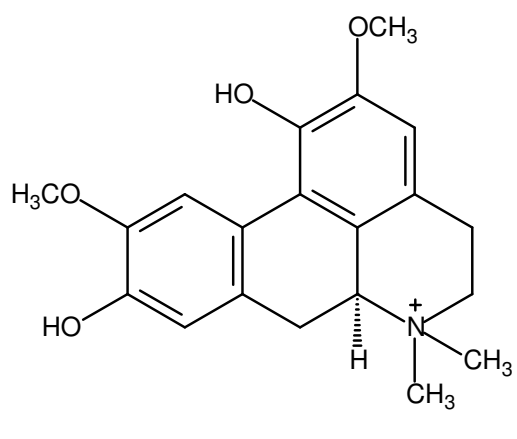
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (19)	 (20)
 (21)	 (22)
 (23)	 (24)

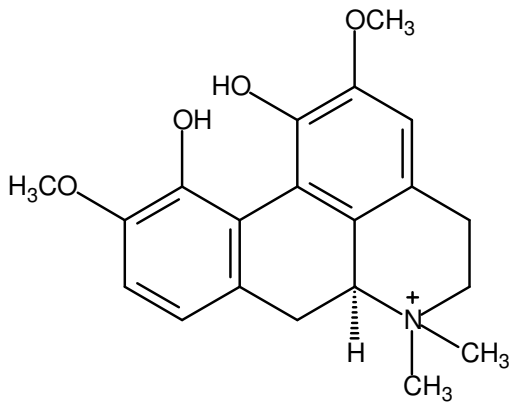
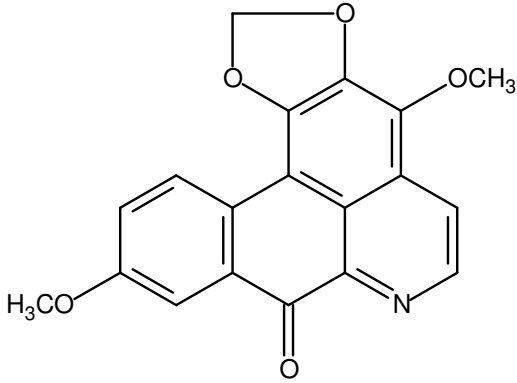
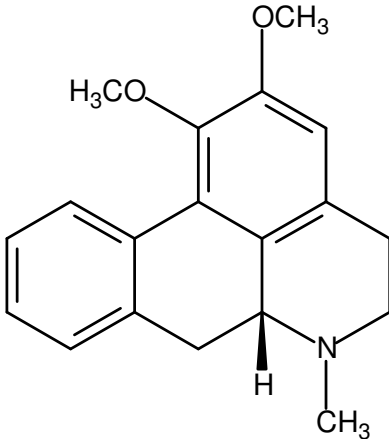
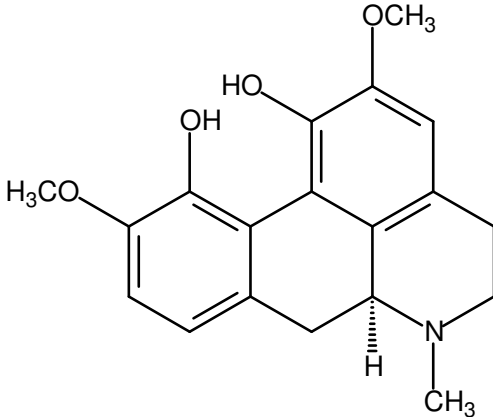
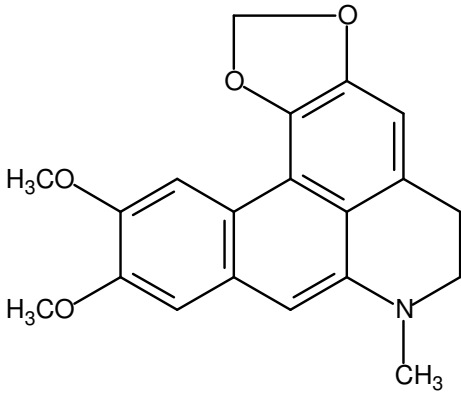
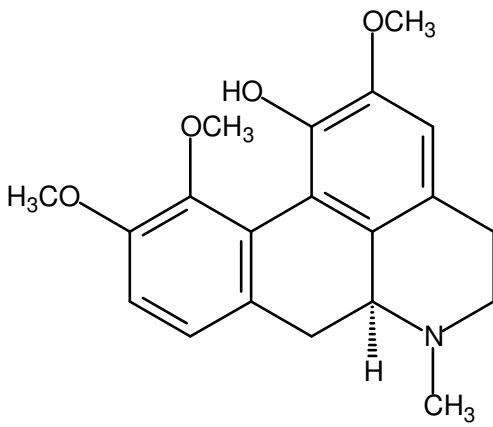
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (25)	 (26)
 (27)	 (28)
 (29)	 (30)

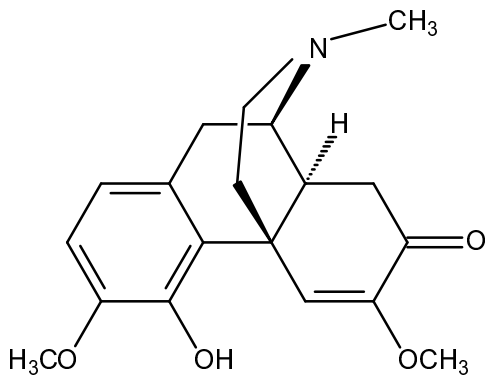
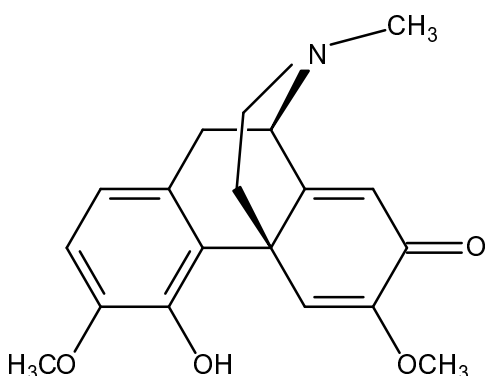
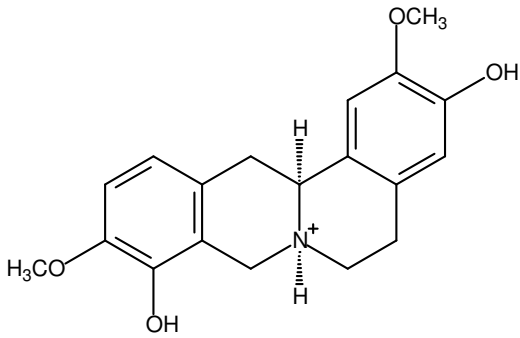
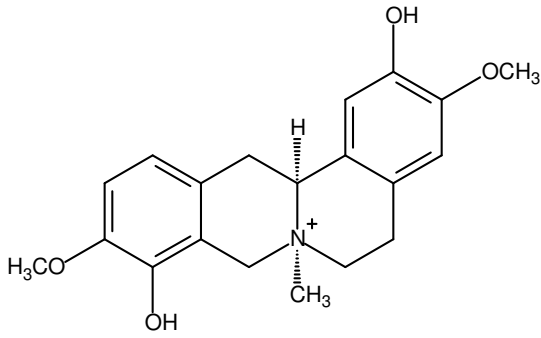
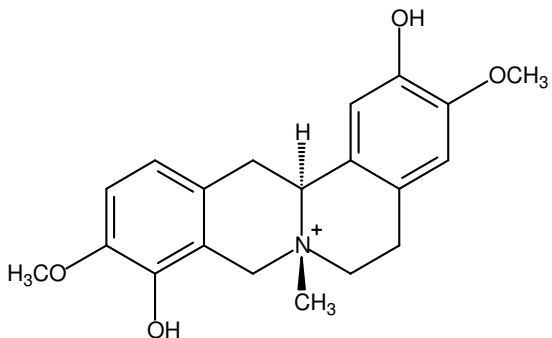
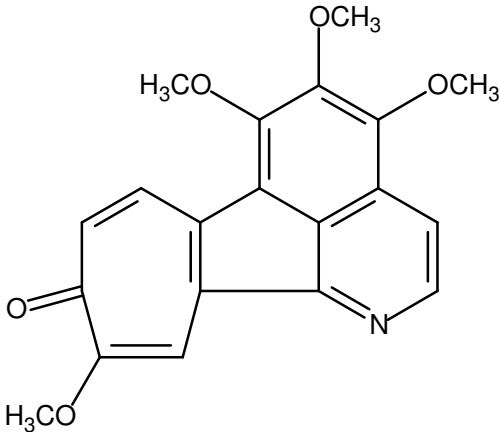
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (31)	 (32)
 (33)	 (34)
 (35)	 (36)

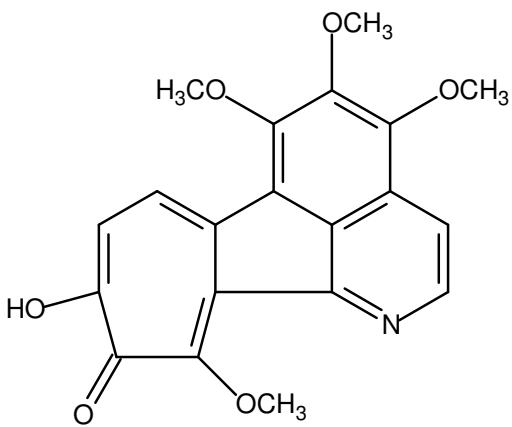
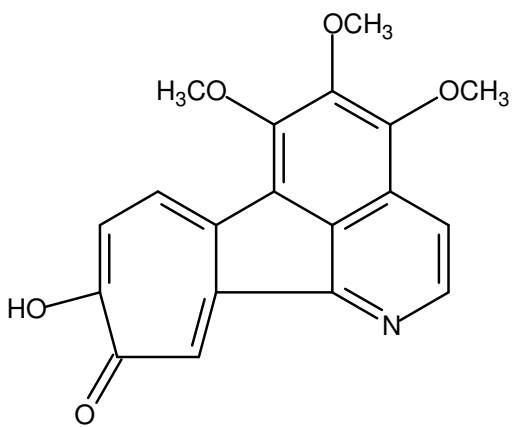
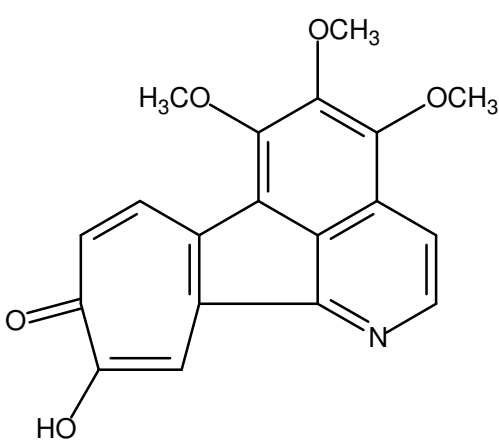
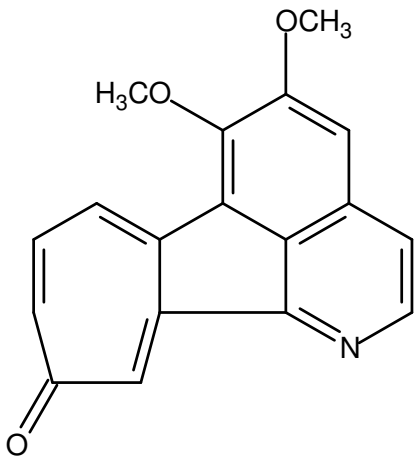
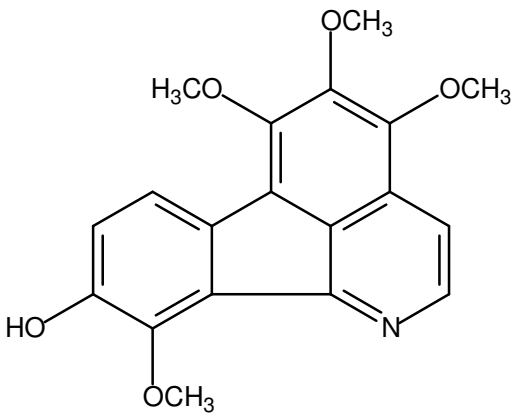
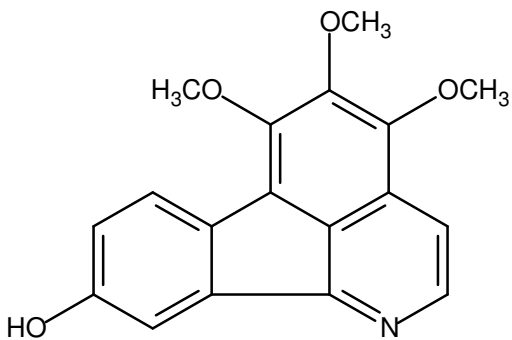
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (37)	 (38)
 (39)	 (40)
 (41)	 (42)

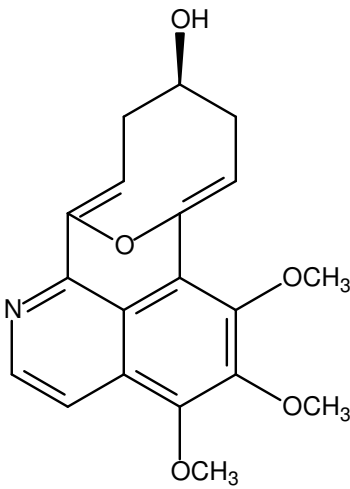
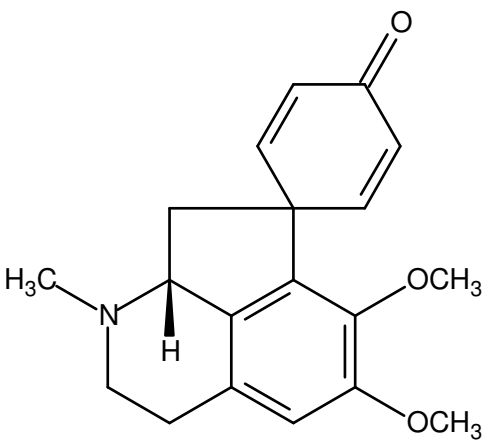
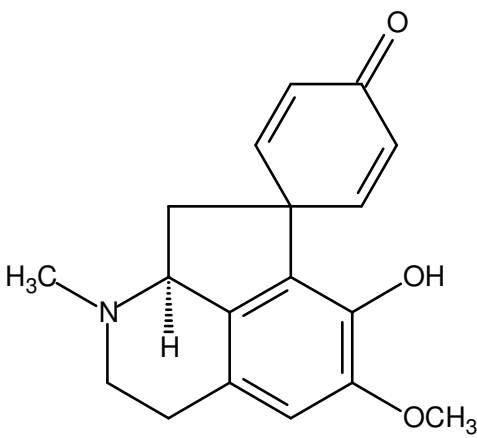
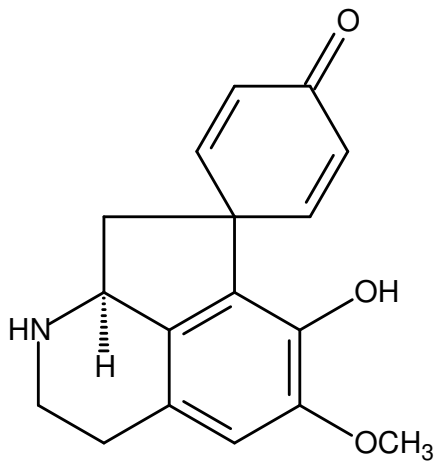
Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (43)	 (44)
 (45)	 (46)
 (47)	 (48)

Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (49)	 (50)
 (51)	 (52)
 (53)	 (54)

Quadro 2: Estrutura dos alcaloides isolados de espécies do gênero *Cissampelos* (Cont.)

 (55)	 (56)
 (57)	 (58)

Através do levantamento realizado observou-se que a grande maioria dos alcaloides sintetizados no gênero *Cissampelos* são derivados do núcleo benzilisoquinolínico. Esses alcaloides são originados a partir do aminoácido proteico L-tirosina. A rota biossintética dessa classe tem início com duas moléculas de L-tirosina. Uma é descarboxilada para formar tiramina e pode sofrer ação da enzima fenol oxidase formando a L-dopamina. O esqueleto benzil da (S)-nococlaurina é formado pela transaminação da segunda molécula de L-tirosina formando o ácido 4-hidroxifenilpirúvico, que então é descarboxilado para 4-hidroxifenilacetaldeído. Dopamina e 4-hidroxifenolacetaldeído são depois estereoseletivamente condensados formando (S)-norcoclaurina. A partir desse ponto uma série de reações de metilação e oxidação dão origem ao intermediário benziltetraidroisoquinolínico (S)-reticulina precursor dos alcaloides isoquinolínicos e benziltetraidroisoquinolínicos e seus derivados (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LACLERCQ, 2005; DEWICK, 2009).

O esqueleto básico dos BIQ fornece estrutura para a formação de uma miríade de tipos estruturais de alcaloides incluindo os aporfinicos, protoberberínicos, morfinândienônicos, bisbenzilisoquinolínicos, além da pavina e da benzil[c]fenantridina. Grande parte dessa diversidade estrutural é obtida através de reações de acoplamento fenólico carbono-carbono ou carbono-oxigênio catalisados pelos citocromos P450 (CYPs), incluindo os membros das famílias CYP80 e CYP719. Outros rearranjos intramoleculares importantes são obtidos por meio de oxidações catalisadas por flavoproteínas (por exemplo, ciclizações por meio da enzima BBE, Berberine Bridge Enzyme) ou por reações radiculares espontâneas, devido a formação de intermediários instáveis. Uma vez formados, cada um dos diferentes derivados de BIQ podem ser modificados através de hidroxilações e formações de ponte dioximetileno mediadas pelo CYP; O- e N-metilações S-adenosilmetionina (SAM) dependente, e O-demetilações catalisadas pela dioxigenase. A figura 8 mostra a biossíntese dos alcaloides benzilisoquinolínicos e seus derivados (ZIEGLER; FACCHINI, 2008; HAGEL; FACCHINI, 2010).

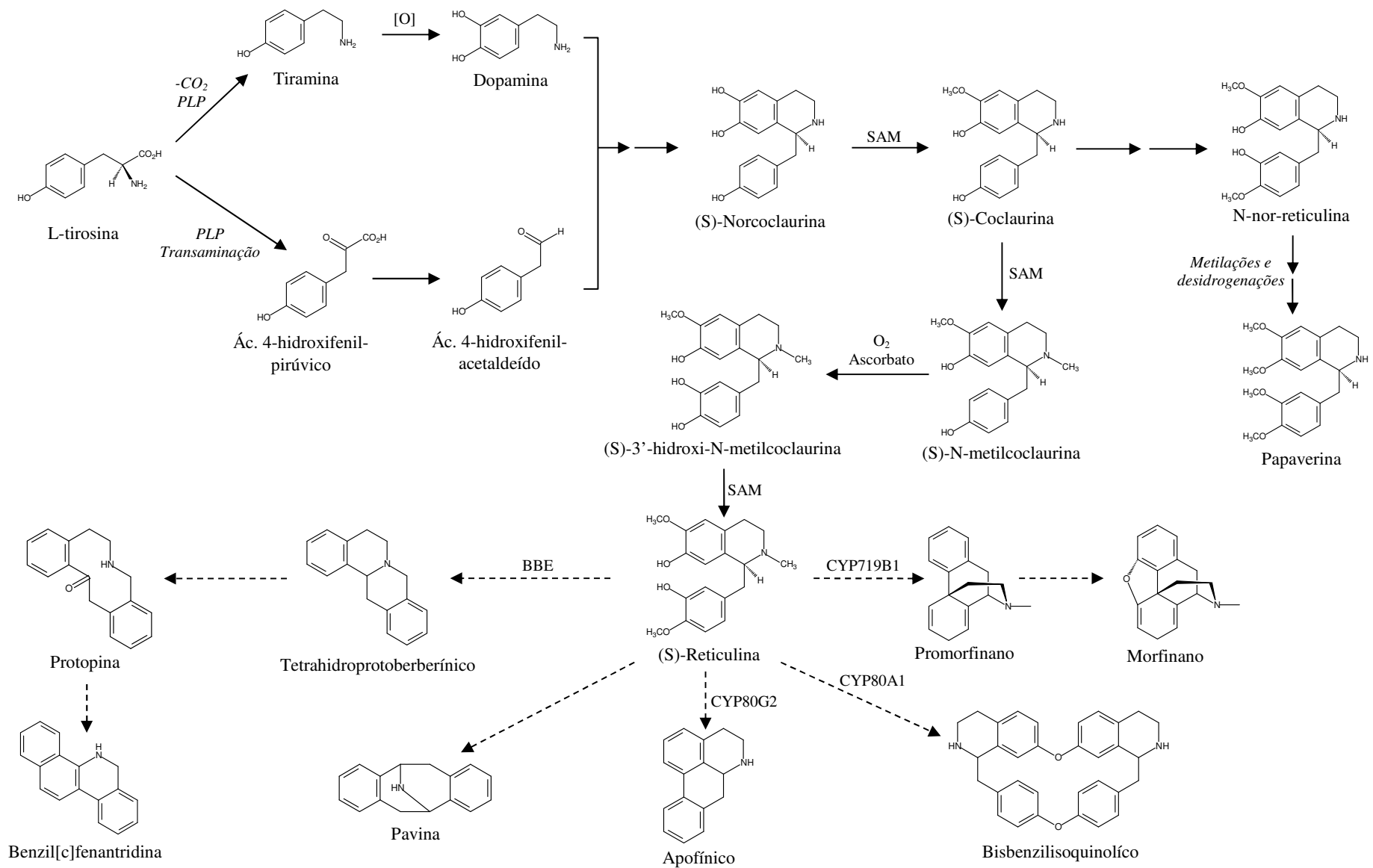


Figura 8: Biossíntese dos alcalóides benzilisoquinolínicos e derivados; quatro enzimas atuam catalizando o acoplamento fenólico para originar as demais subclasses, BBE (Berberine Bridge Enzyme), CYP719B1 (salutaridina sintase), CYP80A1 (berbamunina sintase) e CYP80G2 (corytuberina sintase).

Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009; FARROW, HAGEL e FACCHINI, 2012.

3.2.3 *Cissampelos sympodialis*

A espécie foco desse estudo é a *Cissampelos sympodialis*, conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” (BARBOSA-FILHO et al., 1997). Essa espécie é a única representante do gênero *Cissampelos* endêmica para o Brasil, distribuída desde Minas Gerais até o Ceará, sendo largamente distribuída no Nordeste (principalmente Paraíba, Ceará, Alagoas e Bahia) (RHODES, 1975)

C. sympodialis apresenta caule com coloração verde-clara a vermelho ferrugíneo. Possui lâmina foliar oval a deltoide com ápice obtuso a retuso e base truncada a cordada, membranácea a subcoriácea. As flores masculinas possuem corola pateliforme. É distinguível pelas superfícies glabras e pecíolo peltado excêntrico (PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008; RHODES, 1975). A figura 9 mostra o detalhe das folhas a figura 10 as raízes e a figura 11 apresenta em detalhe os frutos de *C. sympodialis*.



Figura 9: *Cissampelos sympodialis*. Detalhe de suas folhas.
Fonte: Autor, 2013.



Figura 10: *Cissampelos sympodialis*. Detalhe de suas raízes.
Fonte: Autor, 2013.



Figura 11: *Cissampelos sympodialis*. Detalhe de seus frutos.
Fonte: CAVALCANTI *et al.*, 2013.

Dentre os alcaloides presentes em *C. sympodialis*, os mais encontrados são a warifteína (BIS-BIQ), metilwarifteína (BIS-BIQ) milonina (MORF), laurifolina (APORFIN), liriodenina (APORFIN) e roraimina (BIS-BIQ) (PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008).

Na medicina popular *C. sympodialis* é usada no tratamento de inflamações, asma, bronquite, resfriados, gripe, artrite, reumatismo e infecções urinárias (PIO-CORREA, 1929; BEZERRA-SANTOS et al., 2004; BEZERRA-SANTOS et al., 2005; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; AGRA et al., 2007; PORTO et al., 2008). Sobre o efeito anti-inflamatório e antiasmático presente nessa espécie estudos comprovam que isso se dá pela ação imunomoduladora presente nessa espécie, podendo estar relacionada principalmente a diminuição da migração e degranulação de neutrófilos mediados pela inibição da fosfodiesterase (PDE), decréscimo da infiltração de eosinófilos nos pulmões pela inibição de citocinas quimiotáticas, diminuição de imunoglobulinas alérgico-específicas e proliferação de linfócitos-B, aumento da produção de citocininas anti-inflamatórias como a IL-10 e o IFN- γ , diminuição da degranulação de mastócitos e da liberação de histamina, diminuição de *cis*-leucotrienos (CysLTs) e corpos lipídicos em eosinófilos (CAVALCANTI et al., 2013)

MATERIAL E MÉTODOS



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Folhas e raízes de *C. sympodialis* foram coletadas nos meses de junho e julho de 2013 no município de Barbalha – CE. Em um estudo posterior a espécie em questão já havia sido coletada e identificada, e uma amostra representativa encontra-se depositada no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos-PB, sob registro CSTR N° 2948.



Figura 12: Momento da coleta e seleção das raízes de *Cissampelos sympodialis*.

Fonte: Autor.

4.2 Métodos cromatográficos

4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram executadas utilizando gel de sílica 60, com granulometria de 70-230 mesh, da Vetec® (cromatografia gravitacional). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de gel de sílica empregada

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Os solventes utilizados nos procedimentos foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, de qualidade P.A. ou destilados

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada CCD foi usada de maneira analítica (a fim de agrupar frações e verificar as frações mais puras) e preparativa (para isolar compostos).

Na CCD analítica foram usadas lâminas de vidro para microscopia com dimensões de 2,6 x 7,6 cm, com uma das faces revestida por gel de sílica 60G da marca Vetec®, código 1094, e cromatoplasas de gel de sílica 60, 2-25 µm, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (Merck).

Na CCD preparativa foram utilizadas lâminas de vidro com dimensões de 10 x 5 cm, revestidas em uma das faces por gel de sílica 60G da Vetec®, código 1094.

As revelações das substâncias na CCD foram realizadas pela pulverização de uma solução do reagente de Dragendorff, uma solução de iodeto de bismuto do potássio, $K(BiI_4)$, em ácido acético diluído, que é específica para a presença de alcaloides. Além disso as substâncias na CCD foram monitoradas pela exposição à radiação de luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm).

Os extratos e as frações resultantes das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

4.3 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massas modelo QP5050A da SHIMADZU, operando em impacto eletrônico de 70 eV.

4.4 Métodos espectroscópicos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREN/UFC).

4.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância Magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono-13.

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente clorofórmio (δ_{H} 7,27). Para o RMN ^{13}C , como referencial o pico central do tripleto em δ_{C} 77,23 do clorofórmio deuterado.

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação (θ) de 135° . Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela comparação dos espectros de RMN ^{13}C DEPT 135° com o espectro de carbono-13 BB (Broad Band). Os sinais

dos carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH₃) possuem amplitude positiva e os sinais de carbonos metilênicos (CH₂) amplitude negativa no espectro DEPT 135°.

4.5 Métodos físicos

4.5.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão das substâncias isoladas foi determinado em equipamento da Microquímica, modelo MQAPF 302. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 1°C/min e os valores obtidos não foram corrigidos.

4.6 Estudo dos alcaloides de *C. sympodialis*

4.6.1 Preparação do extrato e obtenção da fração alcaloídica (FARCs)

O extrato etanólico foi obtido por meio do método de maceração segundo MATOS, (1988). Foi utilizado 1 kg de raízes frescas e trituradas de *C. sympodialis*. As raízes foram submetidas à extração com etanol (4L) por 72h, sendo esse processo repetido 7 vezes (com o mesmo material), para garantir a completa extração dos constituintes da raiz. Após a extração o solvente foi destilado sob pressão reduzida a 60°C, obtendo-se por fim o extrato etanólico bruto das raízes de *C. sympodialis* (EERCs), com massa de 96,14g e rendimento de 9,6%.

Para a obtenção da fração dos alcaloides terciários totais das raízes de *C. sympodialis* (FARCs) foi realizada extração ácido-base. A maioria dos alcaloides (principalmente os terciários) apresentam a característica de uma base fraca, sendo solúvel em solventes orgênicos como o clorofórmio, e insolúvel em água. Quando exposto a meio ácido formam sais que passam a ser hidrossolúveis. Em seguida quando expostos novamente ao meio

alcalino eles retornam à forma de base livre, tornando-se novamente solúveis em solventes orgânicos (figura 13).

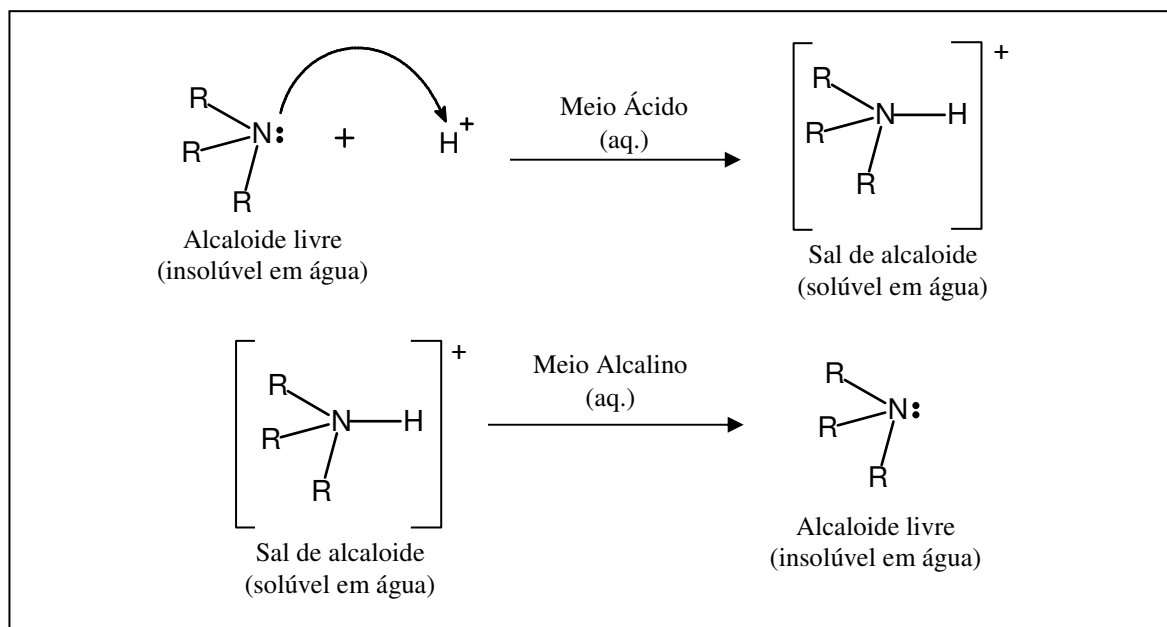
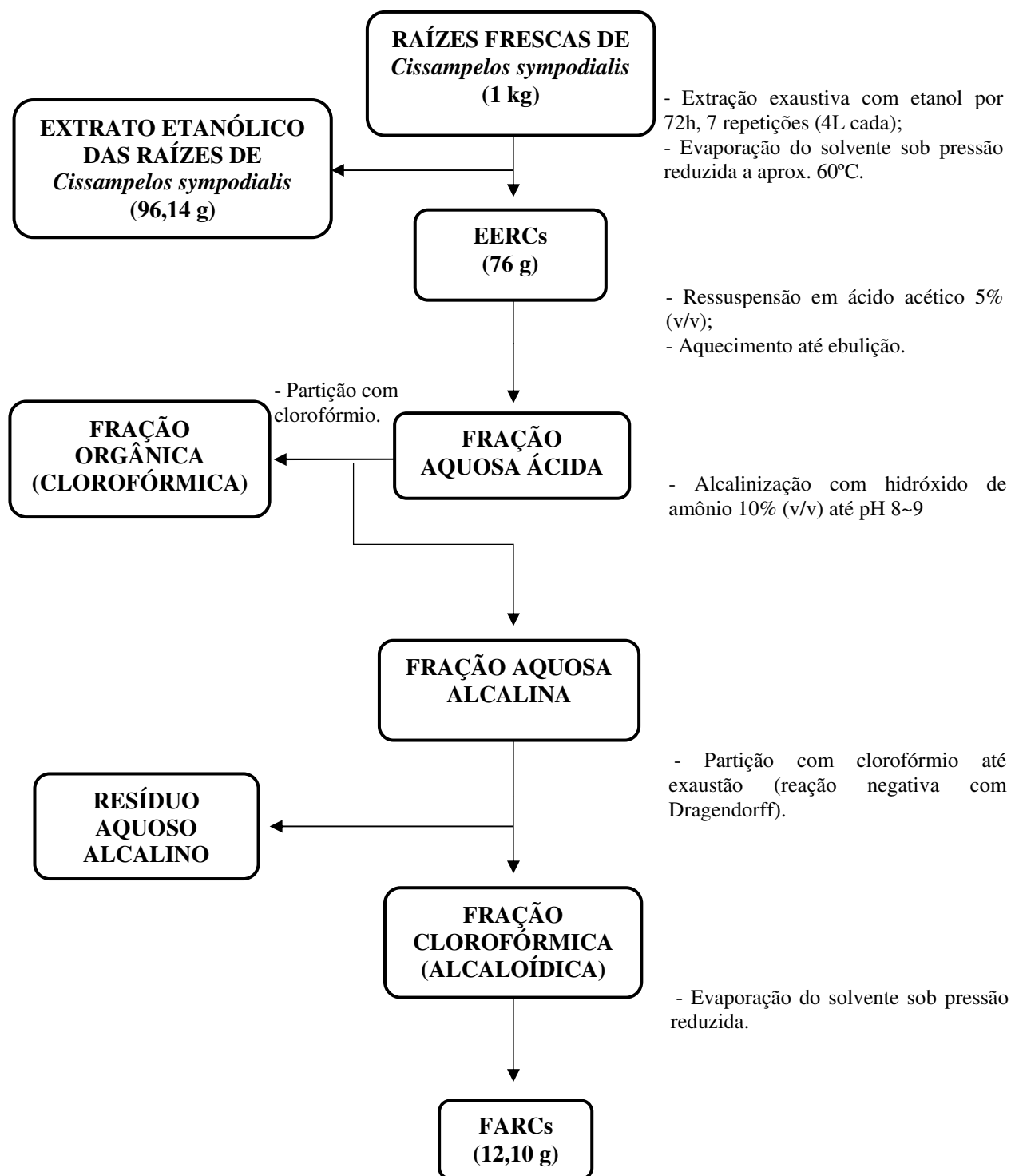


Figura 13: Esquema representando a extração ácido-base de alcaloides, mostrando a conversão de alcaloide livre em sal de alcaloide em meio ácido (aq.) e a conversão do sal em alcaloide livre em meio alcalino (aq.).

Fonte: Autor, 2014.

Na elaboração da fração dos alcaloides terciários totais das raízes de *C. sympodialis* (FARCs) foram utilizados 76 g do EERCs que foi solubilizado em solução aquosa de ácido acético (5%, v/v), aquecido até ebulição e particionado com clorofórmio. A fração orgânica foi coletada e reservada para posteriores análises. A fração aquosa ácida (contendo os sais de alcaloides) foi alcalinizada com hidróxido de amônio (10%, v/v) até pH 8~9, e novamente submetida a partição com clorofórmio para extração dos alcaloides livres. Foram feitas sucessivas extrações com clorofórmio até reação negativa com o reagente de Dragendorff. Por fim, a fração clorofórmica (alcaloídica) foi concentrada sob pressão reduzida obtendo-se a FARCs com massa de 12,10 g e rendimento de 16% em relação ao peso do extrato (fluxograma 1).



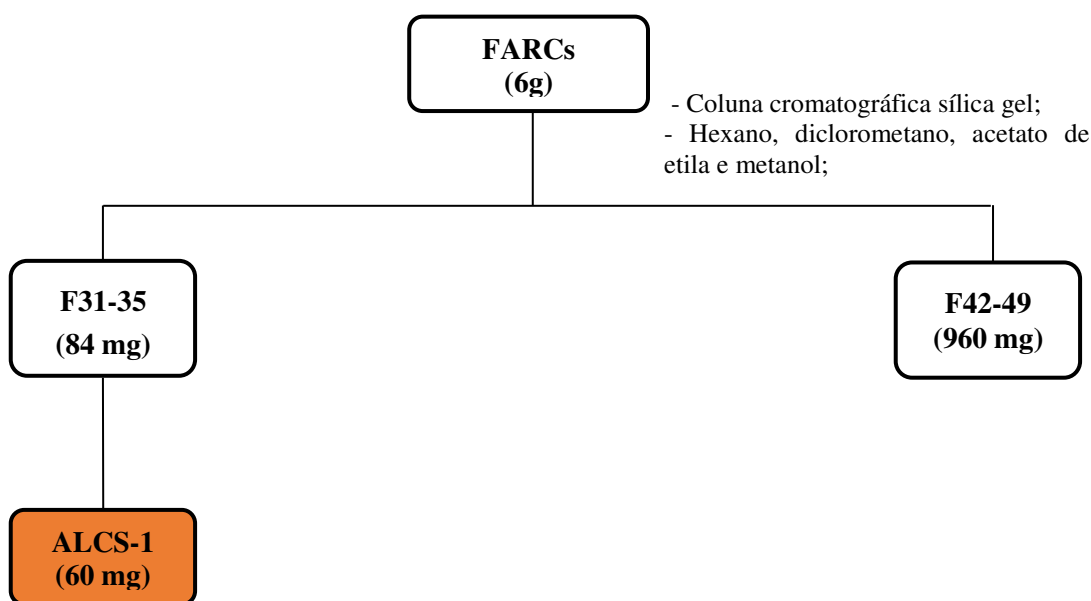
Fluxograma 1: Esquema da obtenção do EERCs e da FARC.

4.6.2 Fracionamento cromatográfico da FARCs

Parte da FARCs (6 g) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e devidamente acondicionada sobre gel de sílica em coluna cromatográfica. A eluição foi realizada empregando os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas um total de 138 frações, de 10 ml cada, que foram reunidas e agrupadas de acordo com seus perfis em CCD.

4.6.3 Tratamento de F31-35 e isolamento de ALCS-1

Após a secagem da fração F31-35 (84 mg), observou-se a formação de cristais com presença de impurezas. Esses cristais possuíam solubilidade baixa em acetato de etila e alta solubilidade em clorofórmio, assim os cristais foram lavados com acetato de etila, resultando no isolamento de ALCS-1 (60 mg), um sólido cristalino, amarelado, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão na faixa de 190,2~192°C. O fluxograma 2 descreve o fracionamento para isolamento de ALCS-1.



Fluxograma 2: Esquema do isolamento de ALCS-1.

As demais frações obtidas durante os processos cromatográficos, assim como a fração majoritária F42-49, foram armazenadas e futuramente serão analisados.

4.7 Avaliação antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibacteriana do EERCs, da FARC e do alcaloide isolado (ALCS-1) foi avaliada através do método de microdiluição, com base no documento M7-A6 do NCCLS (NCCLS, 2012). Foram utilizadas seis linhagens de bactérias padrão, sendo duas Gram (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Streptococcus mutans* ATCC 0046 e duas Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e duas linhagens de isolados clínicos multirresistentes: *Escherichia coli* 27 obtida de escarro e *Staphylococcus aureus* 358 de ferida cirúrgica.

Previamente aos testes, as linhagens bacterianas foram ativadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI 3,8%) e mantidas a temperatura ambiente (37°C) por 24 h. Após este subcultivo, o inóculo bacteriano foi padronizado a partir de uma suspensão com concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (0,5 unidades de turbidez nefelométrica-escala McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída a 1×10^6 UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram adicionados e então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações do extrato, fração e alcaloide isolado de *C. sympodialis*, resultando num inóculo de 5×10^5 UFC/mL. Tanto o EERCs quanto a FARC e ALCS-1 foram diluídos em água destilada e dimetil sulfoxido (DMSO) a uma concentração de 1.024 µg/mL. Outras diluições seriadas foram realizadas através da adição de caldo BHI com finalidade de atingir as concentrações no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata, as placas de microdiluição contendo bactérias foram incubadas a 37°C por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico pela adição de 25 µL da solução de resazurina sódica (0,01%) após o período de incubação (SALVAT et al., 2001). A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento de bactérias.

4.8 Avaliação da atividade moduladora a aminoglicosídeos

Para avaliar o EERCs, a FARCes e o ALCS-1 como potencializador da resistência de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina e amicacina) foram utilizadas todas as linhagens bacterianas testadas para a obtenção da CIM. O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do produto natural através de microdiluição em triplicata. Inóculos bacterianos (CIM/8) em BHI a 10% foram distribuídos em placas de microdiluição seguido da adição de 100 μ L das soluções de antibióticos (1024 μ g/mL) seguido de diluições seriadas (1:2), obtendo-se concentrações finais dos antibióticos que variaram de 512 à 0,5 μ g/mL. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h e a leitura dos resultados foi realizada com resazurina sódica como descrito anteriormente (COUTINHO et al., 2008).

4.9 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média geométrica (E.P.M.G), avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias usando o teste de post-hoc Tukey (quando necessário) de acordo com os valores obtidos nos testes. Onde “a” refere-se a análise versus controle onde a1 = $p < 0,05$, a2 = $p < 0,01$, a3 = $p < 0,001$ e a4 = $p < 0,0001$, “b” versus isolado onde b1 = $p < 0,05$, b2 = $p < 0,01$, b3 = $p < 0,001$ e b4 = $p < 0,0001$, “c” versus fração onde c1 = $p < 0,05$, c2 = $p < 0,01$, c3 = $p < 0,001$ e c4 = $p < 0,0001$. Os cálculos foram realizados a partir do software estatístico GraphPad Prism 6, de acordo com os valores obtidos nos testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural dos alcaloides de *C. sympodialis*

5.1.1 Determinação estrutural de ALCS-1

O fracionamento cromatográfico da FARC's do EERC's de *C. sympodialis* obteve a subfração F31-35, que forneceu 60 mg de um sólido cristalino amarelado, solúvel em clorofórmio, com ponto de fusão na faixa de 190,2~192°C, que foi denominado ALCS-1.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] (figura 14) registrou um total de 18 linhas espectrais para 19 átomos de carbono, sete na região de carbonos sp^3 , sendo um carbono sp^3 bem deslocado (δ_c 100,59) que corresponde a um CH_2 entre oxigênios ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$) de um grupo dioxano. Da região sp^3 observou-se um carbono oxigenado (δ_c 56,37). Os demais sinais encontraram-se na região de carbonos sp^2 . A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (figura 15), permitiu construir a tabela 4, referente ao padrão de hidrogenação dos carbonos, conforme descrito a seguir. O espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135°, foi obtido com amplitude invertida, assim os carbonos metilênicos apresentaram amplitude positiva e os carbonos metílicos e metínicos amplitude negativa.

Tabela 4: Padrão de hidrogenação determinado através da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
114,44 (C=C)	62,75 (C-C)	28,73 (C-C)	43,45 (C-N)	
118,37 (C=C)	107,81 (C=C)	35,01 (C-C)	56,37 (C-O)	
126,92 (C=C)	111,06 (C=C)	52,95 (C-C)		
126,92 (C=C)	119,54 (C=C)	100,59 (O-CH ₂ -O)		
129,23 (C=C)				
141,04 (C=C)				
143,07 (C-OH)				
146,54 (C=C)				
148,47 (C=C)				
C₉H₉O	C₄H₄	C₄H₈O₂	C₂H₆NO	C₁₉H₁₉NO₄

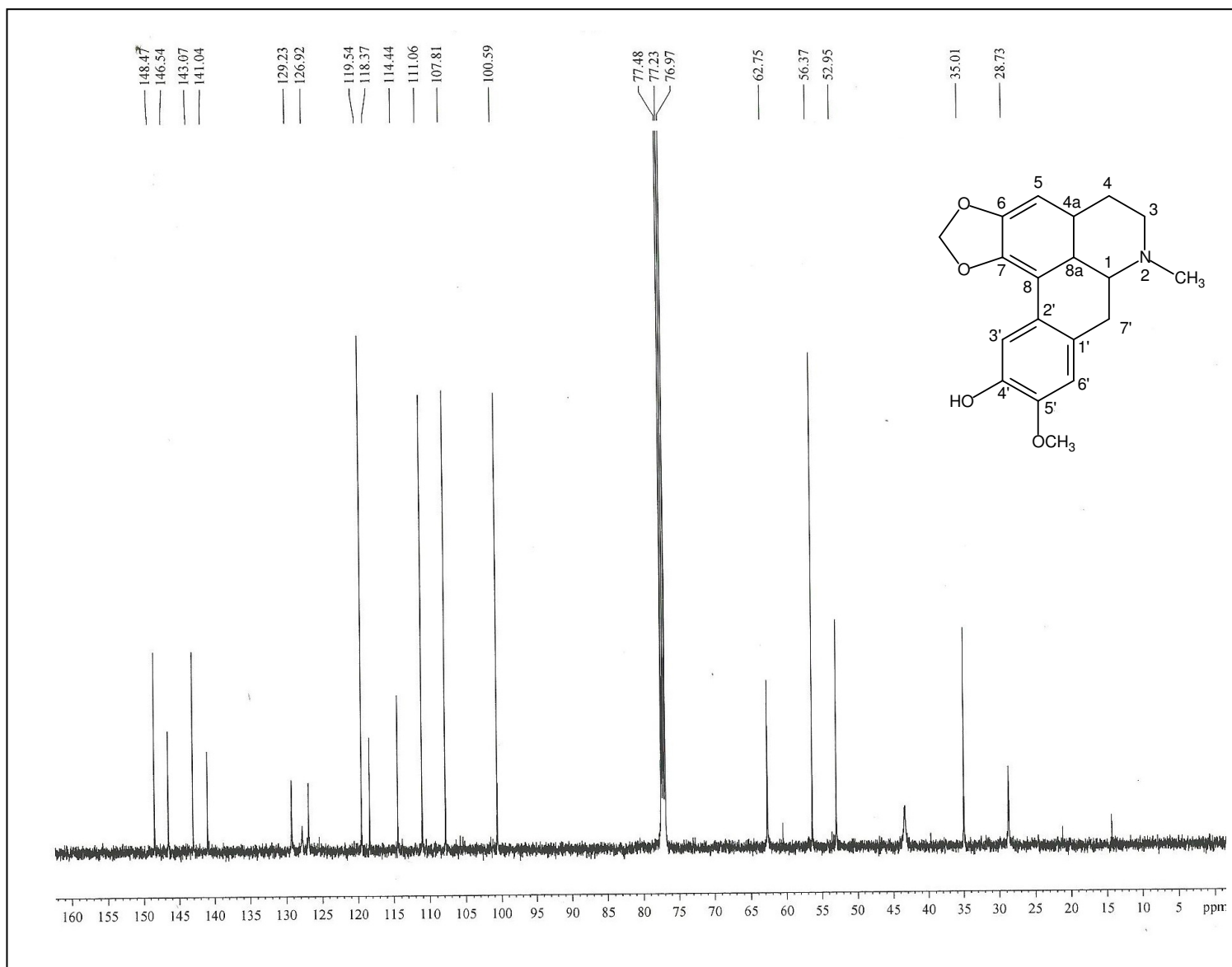


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C [125 MHz, CDCl_3] de 14CS-1.

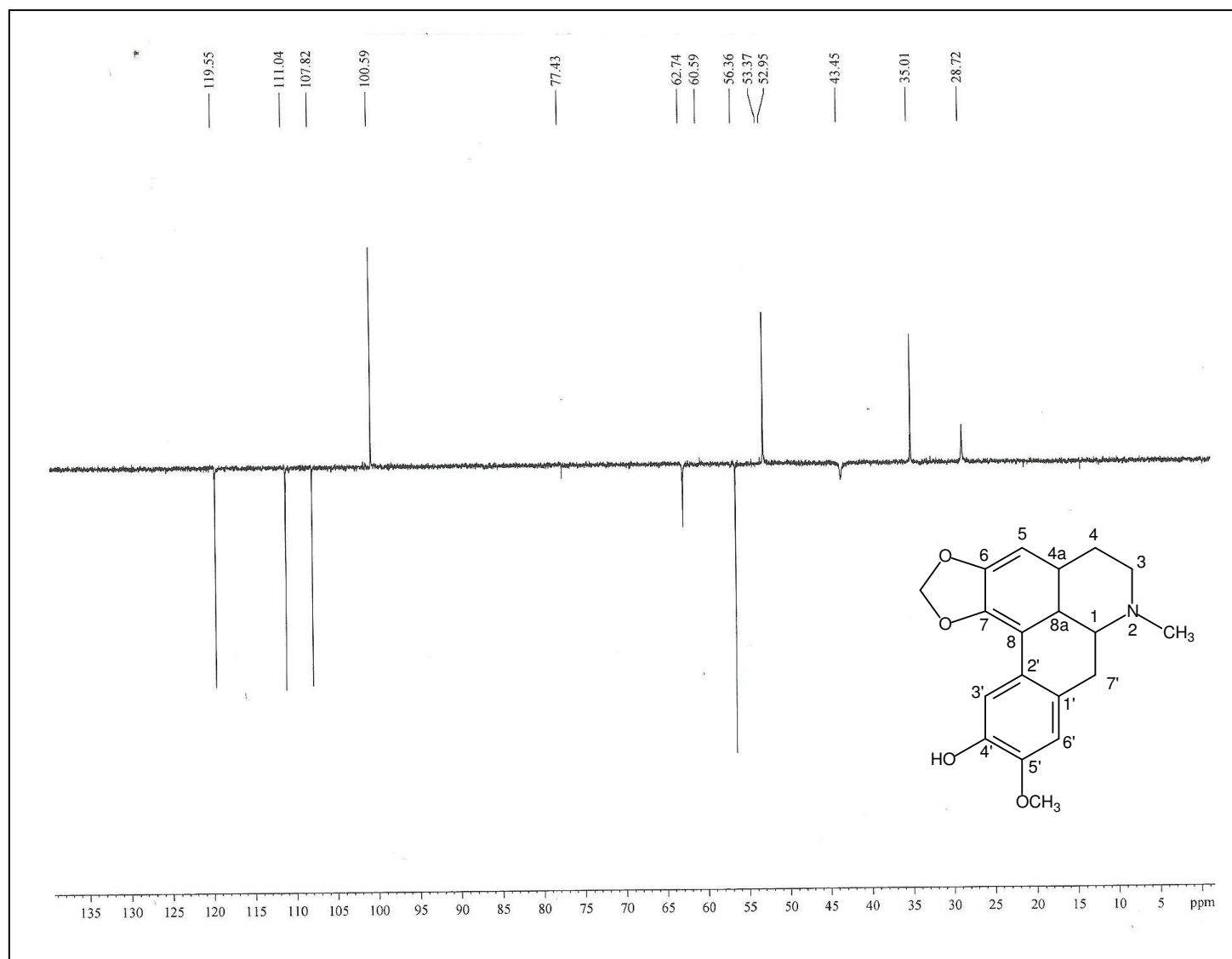


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de AICS-1.

A comparação dos dados de deslocamento químico dos carbonos de ALCS-1 com a literatura sugere a presença de um núcleo aporfínico (figura 16), com a presença de um grupo metil no nitrogênio heterocíclico, além de hidroxila no carbono 4' com δ_c de 143,07, deslocamento semelhante é observado para a hemangerina (figura 16) (RUFINO et al., 2005) que também apresenta hidroxila nessa posição (δ_c da literatura 145,6), e de uma metoxila no carbono 5' com δ_c 148,47, a hemangerina não apresenta metoxila nessa posição apresentando deslocamento inferior (δ_c 114,5), porém na posição 3' há uma metoxila com deslocamento semelhante (δ_c 148,5) o que mais uma vez justifica a metoxila na posição 5' de ALCS-1. Isso se comprova ao comparar os dados de ALCS-1 com a bulbocapnina. Observou-se uma similaridade dos padrões de deslocamento químico de carbono-13 entre esses dois alcaloides, onde a diferença marcante encontra-se na mudança de posição da hidroxila e do grupamento metoxila, que na bulbocapnina encontra-se nos carbonos 3' (δ_c 142,8) e 4' (δ_c 148,2), respectivamente, e em ALCS-1 nos carbonos 4' e 5', como relatado anteriormente (figura 16).

A comparação dos deslocamentos químicos de carbono-13 para ALCS-1, hemangerina e bulbocapnina estão presentes na tabela 5.

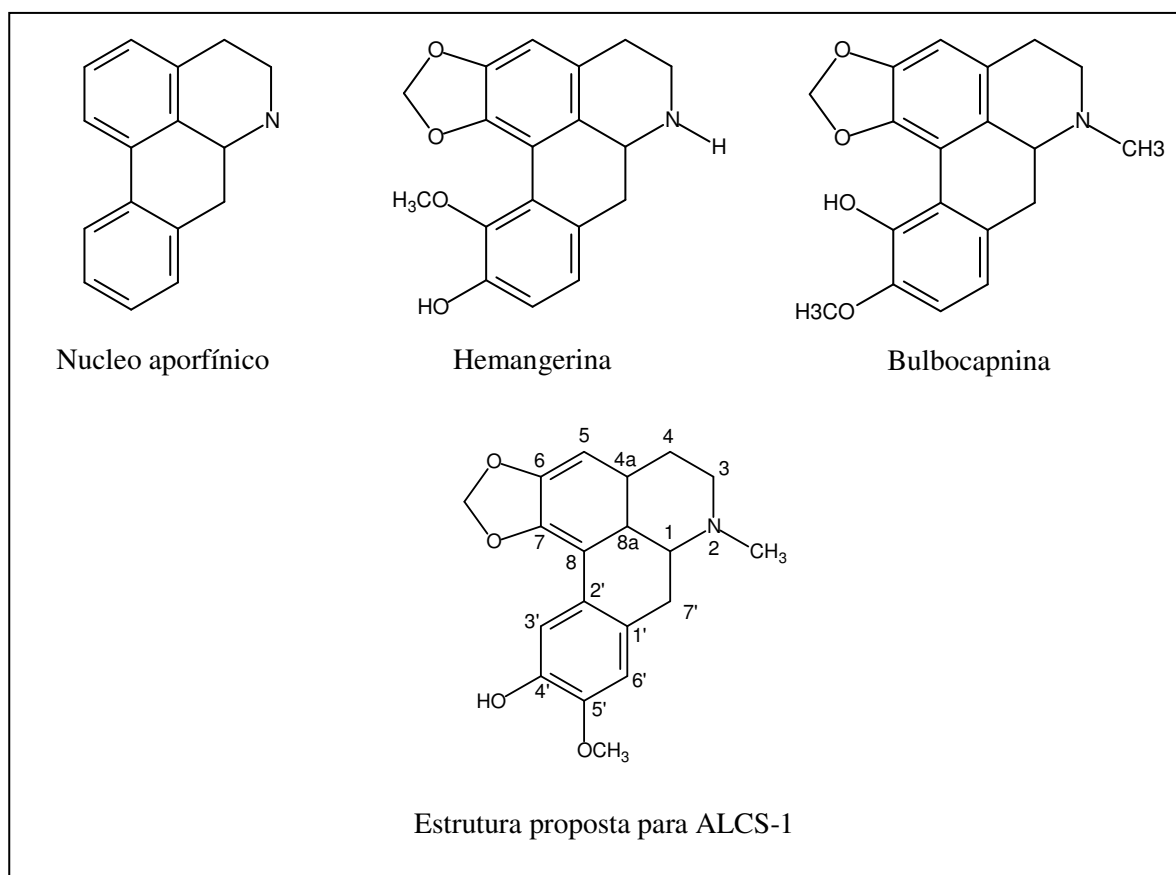


Figura 16: Estruturas do núcleo básico dos alcaloides aporfínicos, da hemangerina, da bulbocapnina e da estrutura proposta para ALCS-1.

Tabela 5: Comparação entre os deslocamentos químicos de carbono-13 de ALCS-1, hemangerina (RUFINO et al., 2005) e bulbocapnina (WET et al., 2005).

Carbono	δ_c (ALCS-1)	δ_c (hemangerina)	δ_c (bulbocapnina)
1	62,75	54,0	62,7
3	52,95	42,8	53,0
4	28,73	29,2	29,4
4a	126,92	129,4	127,3
5	107,81	108,3	107,6
6	146,54	146,9	145,9
7	141,04	142,6	140,4
8	114,44	112,3	114,2
8a	126,92	126,4	128,8
1'	129,23	129,1	129,6
2'	118,37	122,8	118,4
3'	119,54	148,5	142,8
4'	143,07	145,6	148,2
5'	148,47	114,5	110,8
6'	111,06	123,4	119,2
7'	35,01	37,4	35,4
O-CH ₃	56,37	-	56,1
N-CH ₃	43,45	-	44,0

O espectro de massas (figura 17) revelou o pico do íon molecular em m/z 325 Daltons, confirmando a fórmula molecular do composto, C₁₉H₁₉NO₄ com IDH=11.

O espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] (figura 18) apresentou um conjunto de sinais de δ_H 6,84 (s, 2H) e 6,64 (s) referentes a hidrogênios de aromáticos. Um simpleto com δ_H de 6,98 de hidrogênio de hidroxila. Dois sinais de dupletos referente a hidrogênios com acoplamento geminal que correspondente ao grupo dioxano (O-CH₂-O) com δ_H de 6,11 (d, $J=0,9$ Hz) e 5,95 (d, $J=0,9$ Hz). Um simpleto com δ_H de 3,91 (s, 3H) característico de grupo metoxila. Um simpleto com δ_H de 2,60 correspondendo ao grupo metil ligado ao átomo de nitrogênio heterocíclico.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (figura 19) permitiu correlacionar, a uma ligação (¹ J_{CH}), os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono. Já o espectro bidimensional heteronuclear HMBC (figuras 20 a 24) possibilitou correlacionar os sinais de hidrogênios e carbonos a duas (² J_{CH}) e a três ligações (³ J_{CH}). Os dados obtidos encontram-se na tabela 6.

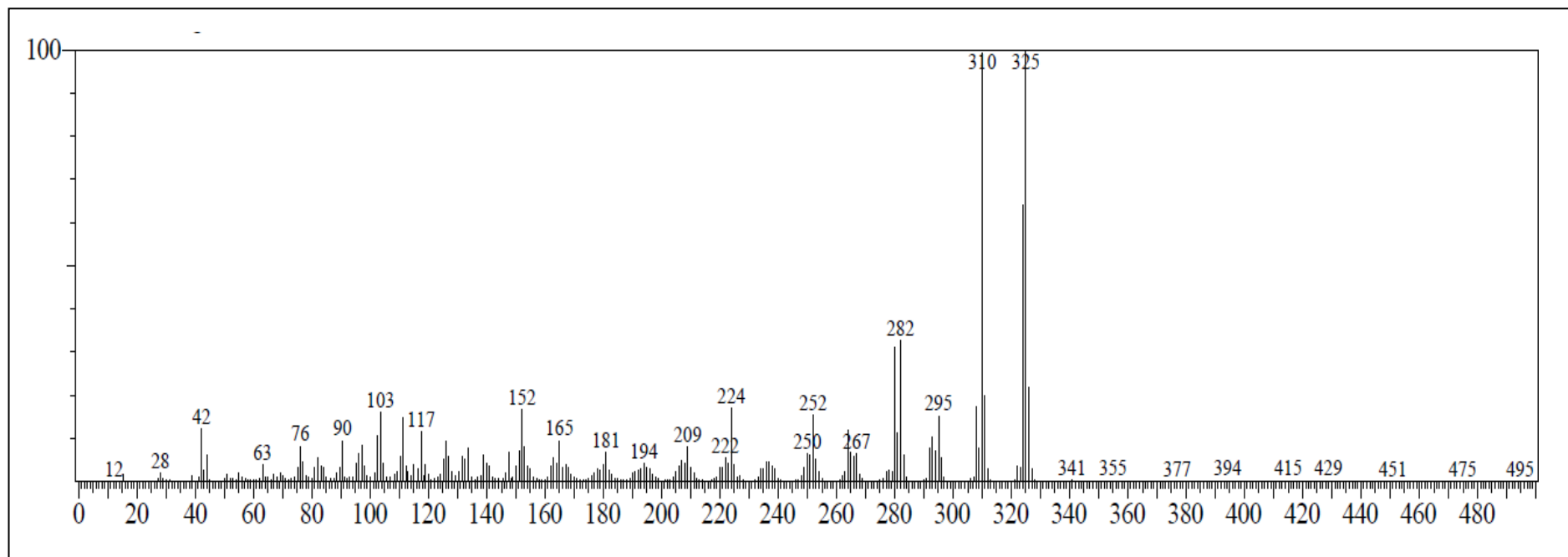


Figura 17: Espectro de massas (IE, 70 eV) de ALCS-1.

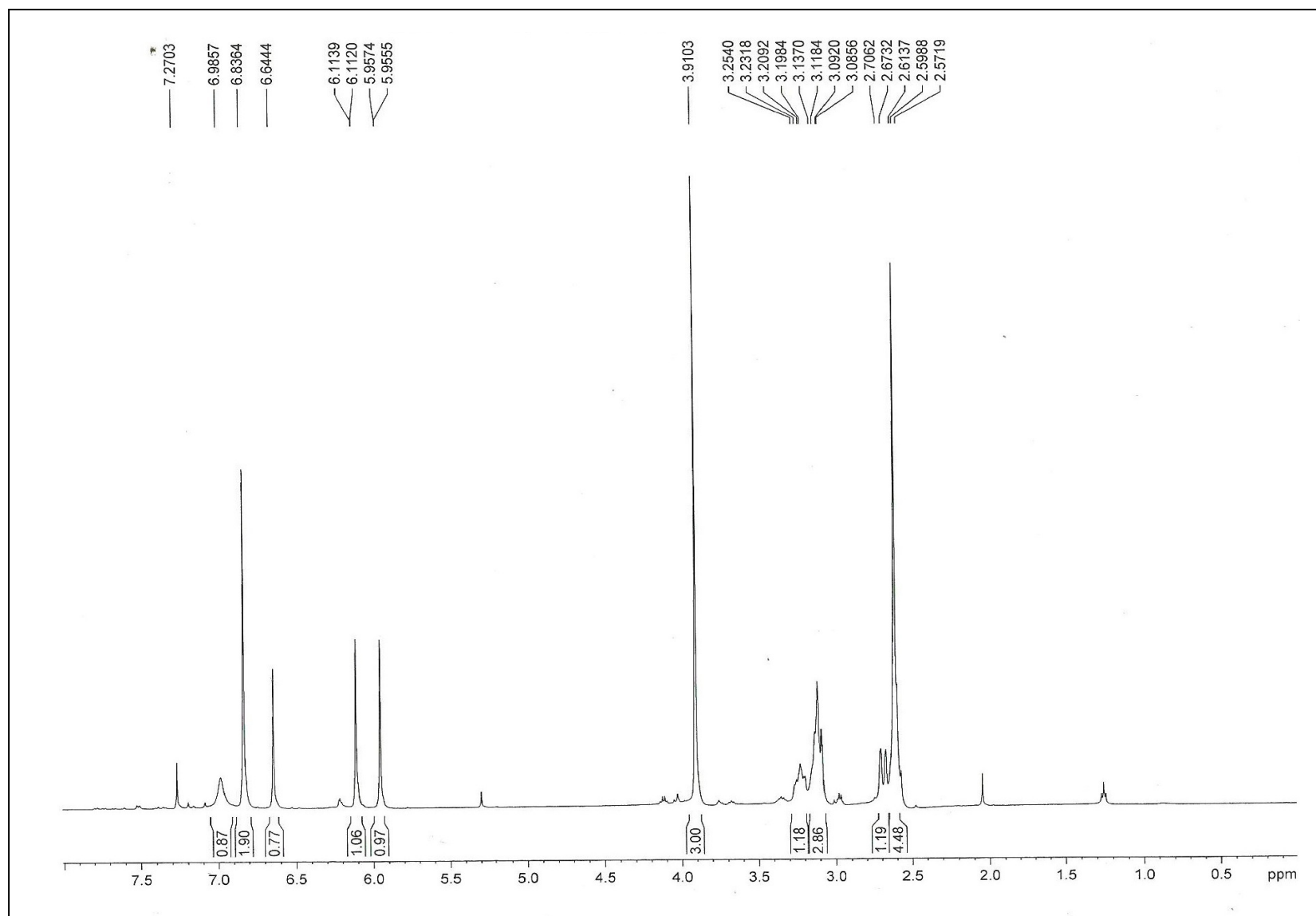


Figura 18: Espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] de ALCS-1.

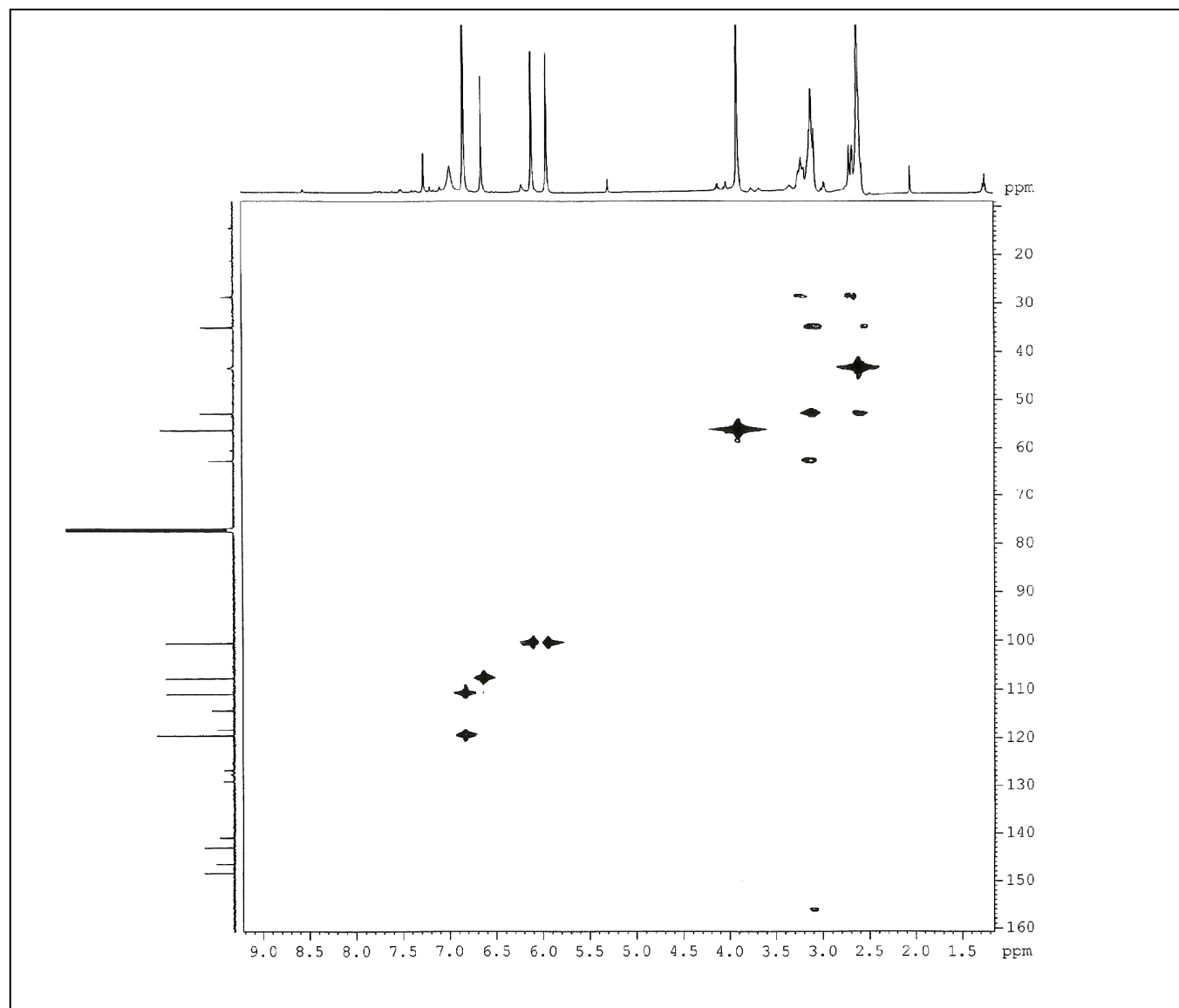


Figura 19: Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMQC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

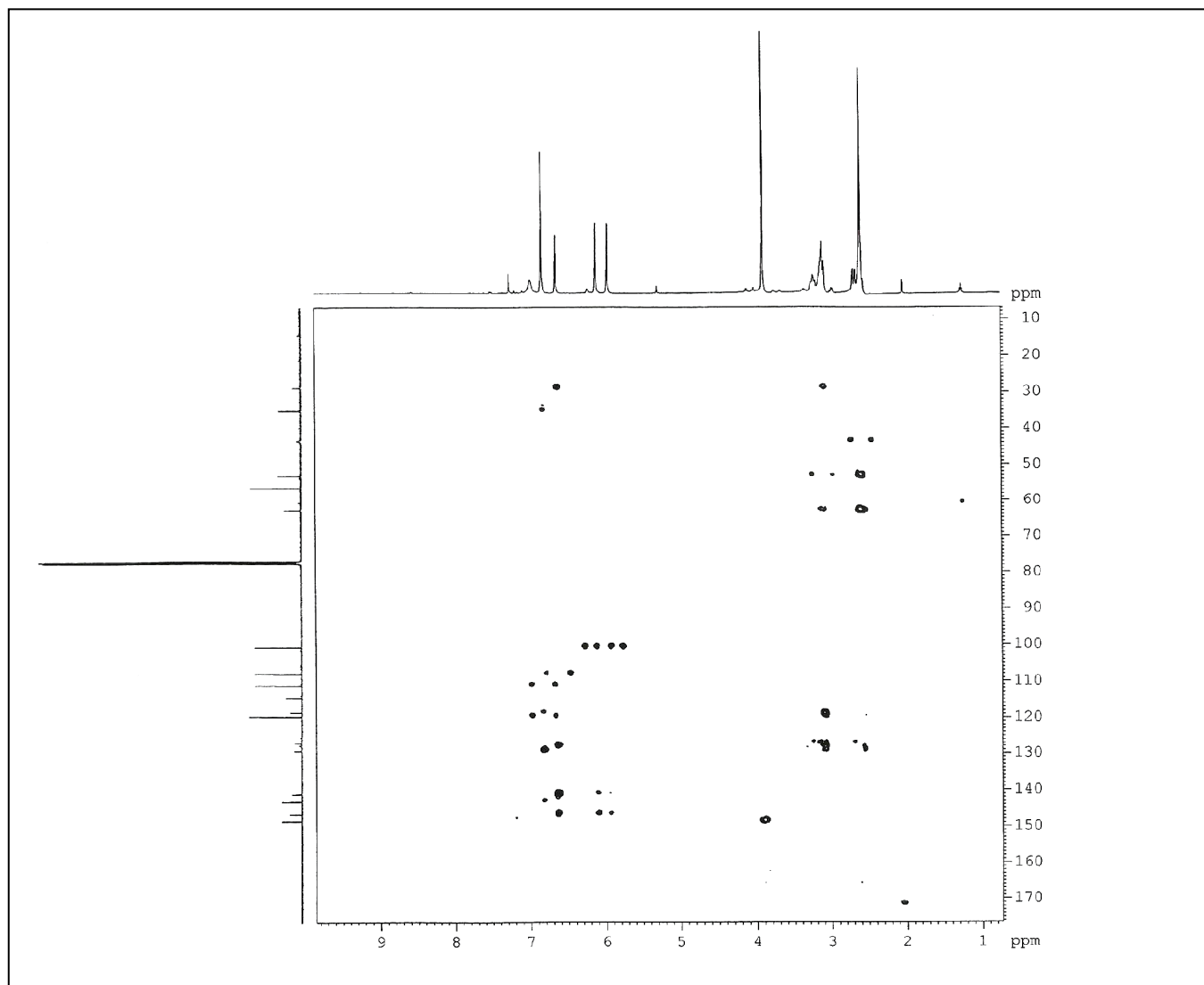


Figura 20: Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

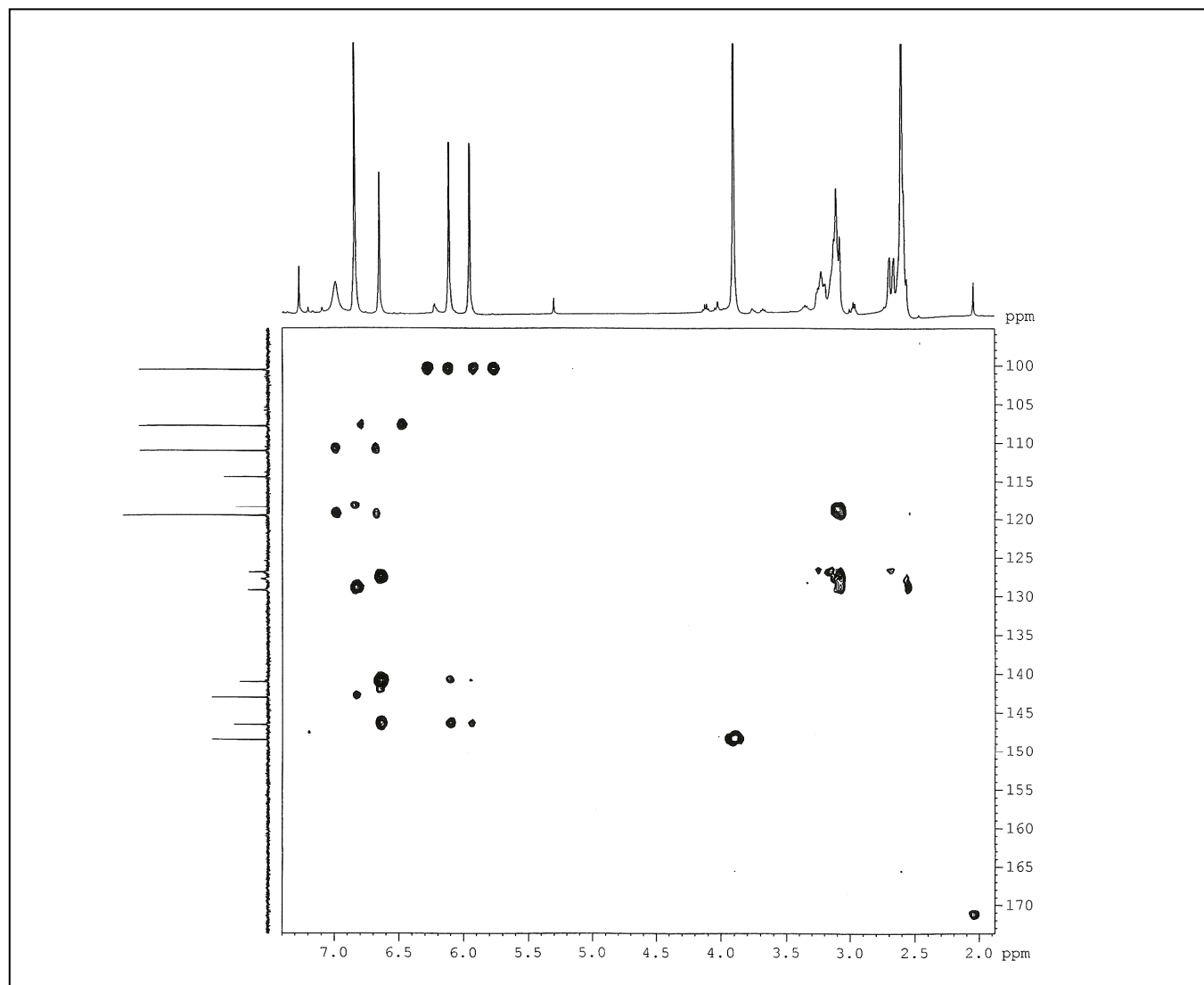


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

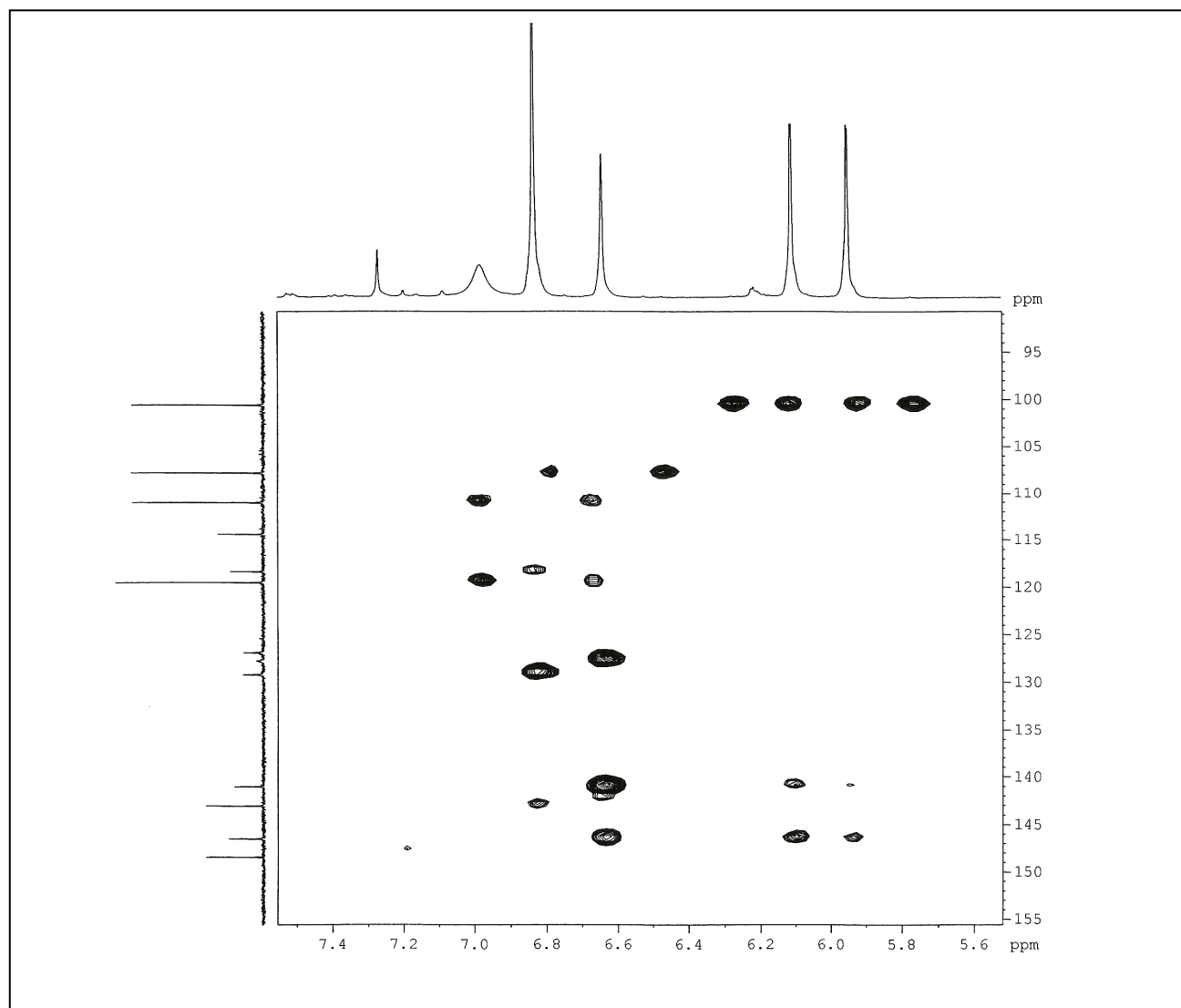


Figura 22: Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

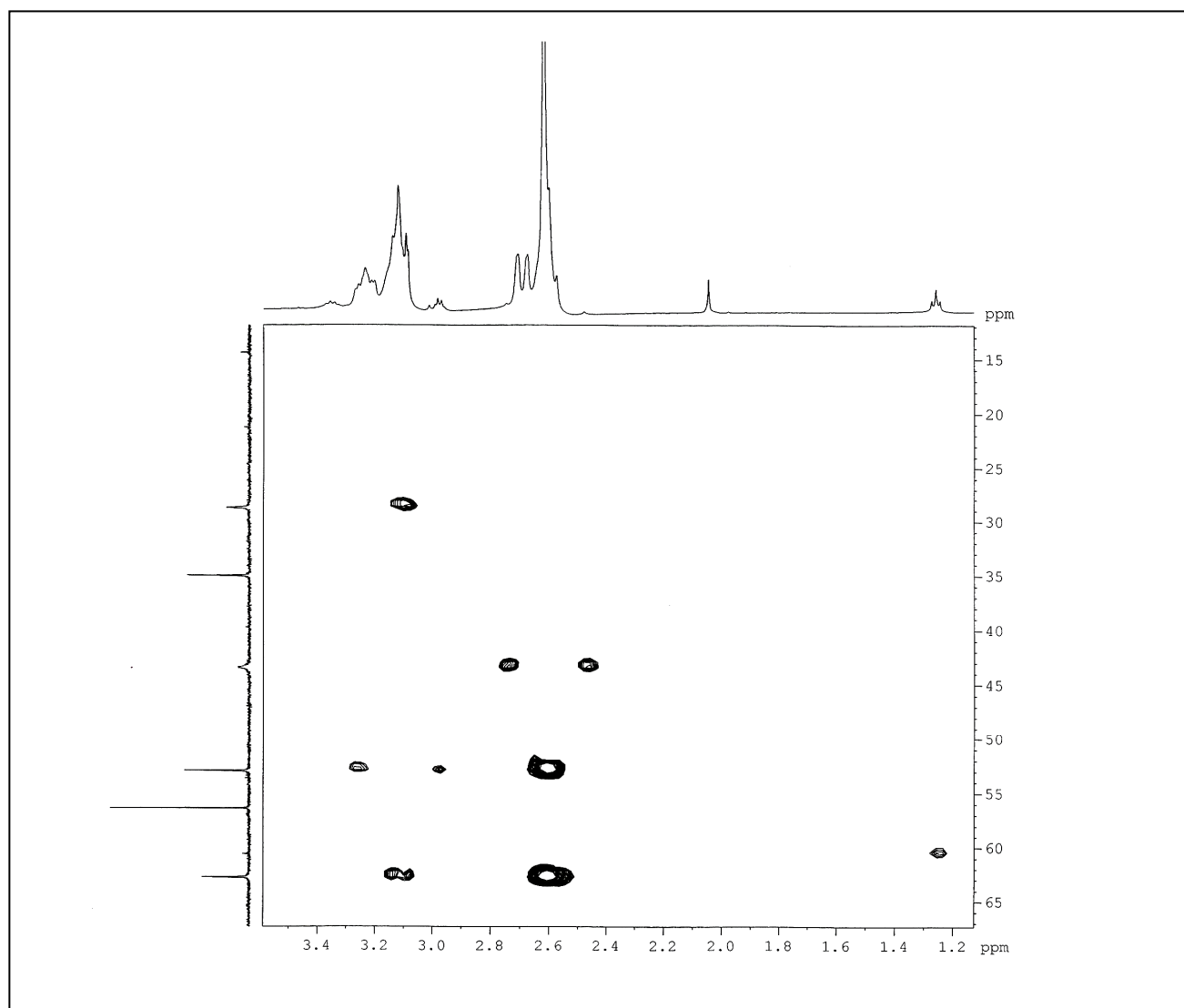


Figura 23: Expansão 3 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

Tabela 6: Correlações heteronucleares ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) a curta e longa distância [125 MHz, CDCl_3] de ALCS-1.

C	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^2J_{\text{CH}}$
1	62,75	3,12	-	MeN
3	52,95	3,12; 2,57	-	MeN
4	28,73	3,23 (dd, $J=11,1$ e $16,0$); 2,69 (d, $J=16,0$)	-	H-5
4a	126,92	-	H-5	-
5	107,81	6,64 (s)	-	-
6	146,54	-	H-5	OCH_2O
7	141,04	-	-	H-5; OCH_2O
8	114,44	-	-	-
8a	126,92	-	-	-
1'	129,23	-	H-6'	H-3'
2'	118,37	-	-	H-6
3'	119,54	6,84 (s)	-	-
4'	143,07	-	-	-
5'	148,47	-	-	MeO-5'
6'	111,06	6,84 (s)	-	2H-7'
7'	35,01	3,12; 2,57	-	H-6'
OCH_2O	100,59	6,11 (d, $J=0,9$); 5,95 (d, $J=0,9$)	-	-
MeO	56,37	3,91 (s)	-	-
MeN	43,45	2,60 (s)	-	-

Por meio da interpretação dos dados espectrais foi possível propor a estrutura para o alcaloide ALCS-1. Trata-se de um alcaloide aporfínico, com substituições no nitrogênio (CH_3), grupamento dioxano formando um ciclo entre os carbonos 6 e 7 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), hidroxila (OH) no carbono 4' e metoxila ($-\text{OCH}_3$) no carbono 5'. A estrutura proposta trata-se de um isômero da bulbocapnina. Na bulbocapnina a hidroxila encontra-se no carbono 3' e a metoxila

em 4', já para ALCS-1 esses substituintes estão na posição 4' e 5', respectivamente. Esse é o primeiro relato dessa substância como metabólito secundário (figura 24)

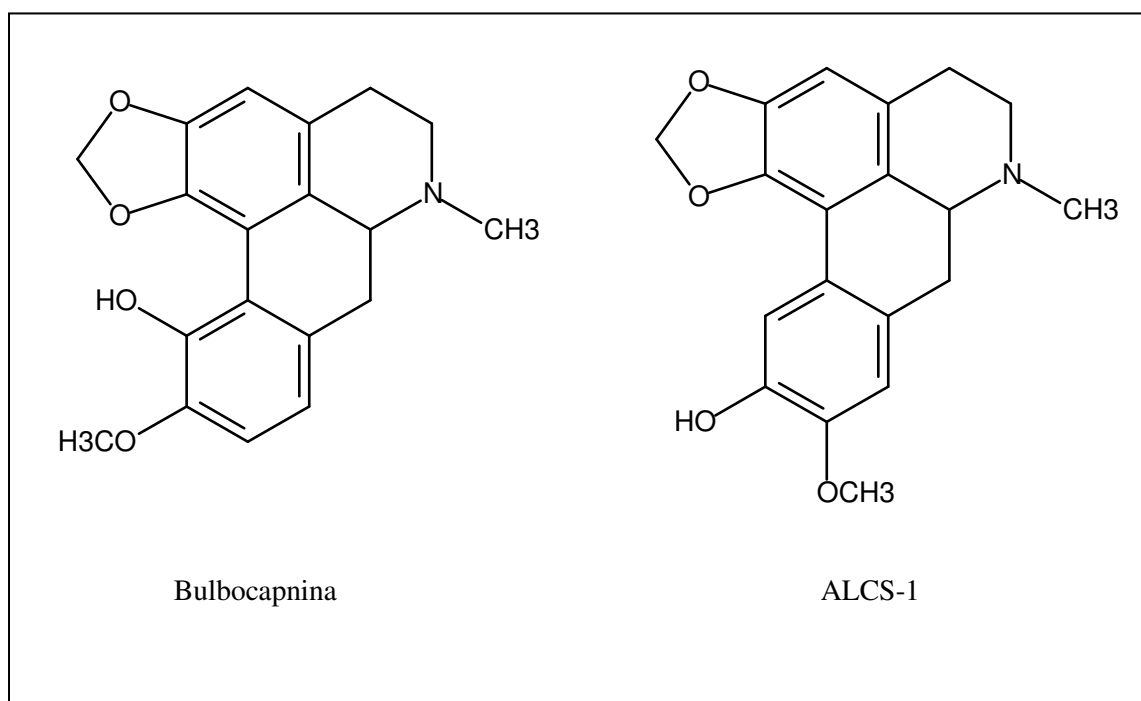


Figura 24: Estruturas da bulbocapnina e do ALCS-1.

5.2 Atividade antibacteriana

Na avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição foi observado que o EERCs apresentou concentração inibitória mínima maior ou igual a 1024 µg/mL, para todas as linhagens bacterianas testadas. A FARC apresentou CIM de 256 µg/mL para *S. aureus* ATCC 12692, *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* 358, de 512 µg/mL para as linhagens de, *E. coli* 27 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, e maior ou igual a 1024 µg/mL para a linhagem de e *Streptococcus mutans* ATCC 0046. Enquanto o alcaloide isolado apresentou CIM de 256 µg/mL para *S. aureus* ATCC 12692 e *E. coli* 27, de 512 µg/mL para as linhagens de *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* 358, e maior ou igual a 1024 µg/mL para a linhagem de *Streptococcus mutans* ATCC 0046 (tabela 7)

Tabela 7: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico das raízes de *C. sympodialis* (EERCs), da sua fração alcaloídica (FARCs) e do alcaloide isolado (ALCS-1)

Bactérias	CIM (µg/mL)		
	EERCs	FARCs	ALCS-1
Linhagens Padrão:			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 12692	≥1024	256	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	≥1024	256	512
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 0046	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	≥1024	512	512
Linhagens Multirressistentes:			
<i>Escherichia coli</i> 27	≥1024	512	256
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	≥1024	256	512

De acordo com o trabalho de Houghton e colaboradores (2007), que estabelece parâmetros para uso de produtos naturais, é estabelecido que concentrações acima de 1 mg/mL (1000 µg/mL) são clinicamente irrelevantes, visto que seria necessária uma grande quantidade do produto natural para atingir essa concentração a níveis plasmáticos. Como os pontos de CIM são obtidos por diluição seriadas, pode-se supor que se a CIM apresentada for igual a 512 µg/mL, isso equivale dizer que a concentração real pode estar entre 1024 e 512 µg/mL. Assim resultados ≥256 apresentam melhores níveis de confiança do ponto de vista clínico.

Extratos vegetais são uma mistura complexa de diversas substâncias oriundas do metabolismo tanto primário quanto secundário, dessa forma quando são fracionados pode-se excluir classes indesejadas, ou mesmo separar uma única classe, como realizado neste trabalho. Observa-se, portanto, que o extrato, enquanto mistura, não possui atividade antimicrobiana significativa, porém quando separado apenas a fração de alcaloides observa-se atividade, concluindo assim que os alcaloides totais de *C. sympodialis* apresentam atividade antimicrobiana. Os alcaloides também estão presentes no EERCs mas em concentração, relativamente, baixa (16%), o que explica a pouca atividade do extrato, ou também outras substâncias presentes no extrato podem mascarar o efeito desses alcaloides antagonizando sua

ação antimicrobiana. O resultado semelhante observado entre a CIM da FARC's e do ALCS-1 para as bactérias testadas, pode sugerir que esse alcaloide seja o principal agente antibacteriano presente na fração.

Existem poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana para o gênero *Cissampelos*. Um estudo preliminar realizado com o extrato metanólico da espécie *C. pareira* para investigar sua atividade antimicrobiana, pelo método de disco-difusão em ágar, avaliou sua atividade nas concentrações de 200 e 400 µg/mL frente a linhagens de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* (KUMAR, CHANDRA e KUMAR 2012). Esse estudo mostrou que o extrato metanólico das raízes de *C. pareira* apresenta ação antibacteriana sobre as cepas testadas, apresentando melhores valores de halo de inibição para *E. coli* na concentração de 400 µg/mL (12 mm) e para *B. subtilis* na concentração de 200 µg/mL (21 mm).

Outro estudo, dessa vez realizado com o extrato das partes aéreas e raízes da espécie *C. mucronata*, avaliou a ação antimicrobiana frente as linhagens padrão de *S. aureus* (NCTC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 29953), *Salmonella typhi* (NCTC 8385), *Vibrio cholerae* (isolado clínico), *Bacillus anthracis* (NCTC10073), *Streptococcus faecalis* (isolado clínico), *Cryptococcus neoformans* (isolado clinico) além do fungo, *Candida albicans* (ATCC 90028) (NONDO et al., 2011). Foi observado que os extratos etanólico e diclorometano das partes aéreas de *C. mucronata* apresentaram melhor atividade antimicrobiana (tanto frente a bactérias quanto a fungos) do que os extratos das raízes. Os resultados mais expressivos foram obtidos pelo extrato etanólico das partes aéreas frente a *V. cholera* com CIM de 391 µg/mL, e pelo extrato diclorometano das partes aéreas frente a *S. typhi*, *B. anthracis* e *C. neoformans* com valores de CIM de 781 µg/mL, 195 µg/mL e 195 µg/mL, respectivamente. Neste estudo, não foi observado atividade relevante frente a *E. coli* e *S. aureus*, diferente do nosso estudo que mostra valores significativos de CIM para essas duas linhagens de importantes patógenos humanos.

Vários alcaloides têm sido reportados por apresentarem atividade antimicrobiana como por exemplo a berberina (figura 25), isolada de diversas espécies das famílias Berberidaceae, Runculaceae e Papaveraceae. A berberina tem sido usada no tratamento de infecções intestinais, como gastroenterites agudas, cólera e disenteria bacilar. O estudo realizado por Zhang *et al.* (2013), avaliou a atividade antibacteriana da berberina e seus derivados sintéticos frente a linhagens gram-positivas e gram-negativas, pelo método de microdiluição. Foi observado melhores valores de CIM para a linhagem multirresistente de *S. aureus* (128 µg/mL), *Proteus vulgaris* (128 µg/mL), *Shigella dysenteriae* (256 µg/mL), e *P. aeruginosa* (256 µg/mL). A berberina possui estrutura semelhante a alcaloides isolados do

gênero *Cissampelos*, os tetrahidroprotoberberínicos, dessa forma esses alcaloides podem possuir uma provável ação antimicrobiana, no que se refere a relação estrutura-atividade da berberina.

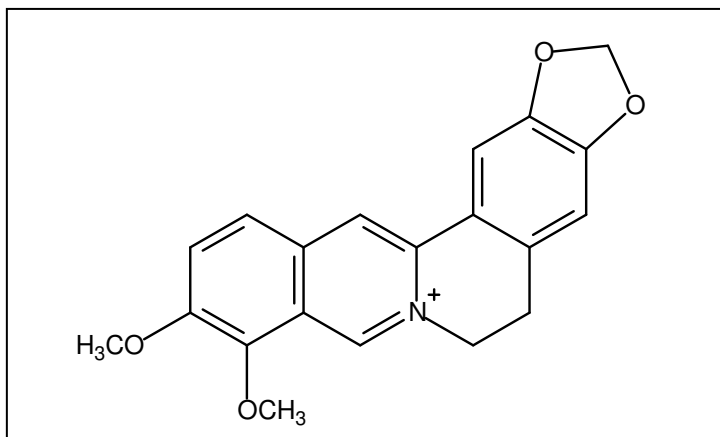


Figura 25: Estrutura química da berberina.

Outra classe de alcaloides bastante isolados de *Cissampelos*, os aporfínicos, também isolados de outras espécies de Menispermaceae, foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana. A stephanina e a crebanina (figura 26), isolados de *Stephania dielsiana*, foram testadas e mostraram atividade principalmente frente a bactérias gram-positivas. Stephanina apresentou CIM de 156 µg/mL frente a *Micrococcus lysodeikticus* e de 78 µg/mL para *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Já para a crebanina observou-se CIM de 312 µg/mL para as linhagens de *M. lysodeikticus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *S. aureus*, e de 213 µg/mL para *B. cereus* (DENG et al., 2011).

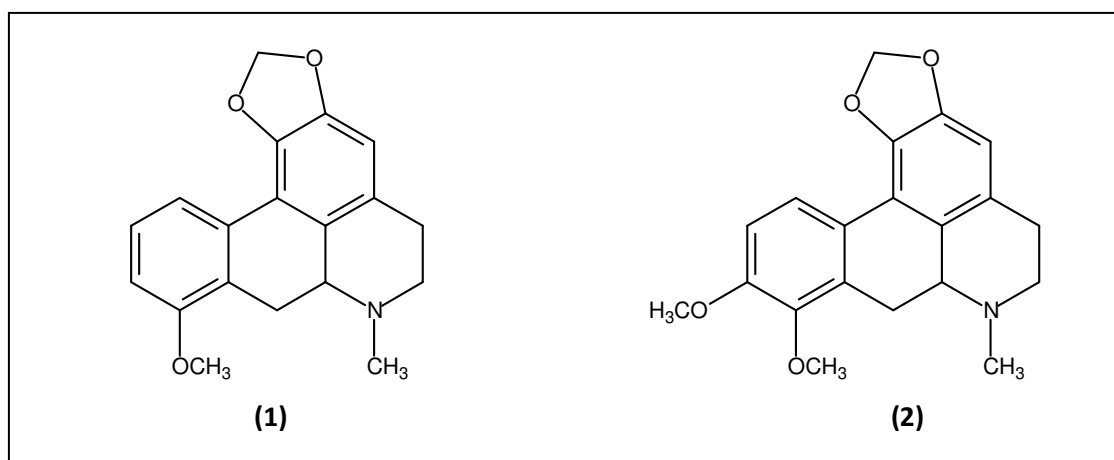


Figura 26: Estrutura química da stephanina (1) e da crebanina (2).

A stephanina e crebanina, ambos alcaloides aporfínicos, são bastante semelhantes estruturalmente diferindo na presença de uma metoxila adicional no carbono 9 (C9) da

crebanina. Essa modificação estrutural supostamente fez com que a crebanina tenha uma menor atividade, em relação a stephanina. Assim, os alcaloides aporfínicos presentes em *Cissampelos*, principalmente os que se assemelham estruturalmente com a stephanina e crebenina, merecem atenção quanto sua possível atividade antimicrobiana.

A cycleanina (estrutura 10 do quadro 1), um alcaloide bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ) isolada de *Albertisia villosa*, foi avaliada quanto sua possível atividade frente a bactérias pelo método de difusão em ágar, mostrando atividade frente a *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, com halos de inibição de 23 e 21 mm, respectivamente, na concentração de 1000 µg/mL (LOHOMBO-EKOBA *et al.*, 2004). Outro BIQ-BIQ, a cocsoline (figura 27) isolada das raízes de *Epinetrum villosum*, também apresentou atividade antimicrobiana, com melhores valores de CIM: 31,25 µg/mL para *Shigella sonnei*, *Campylobacter coli* e *E. coli*; e de 15, 62 µg/mL frente a *Campylobacter jejuni* e *Salmonella typhimurium* (OTSHUDI *et al.*, 2005). Os BIS-BIQ são os alcaloides mais abundante em espécies de *Cissampelos*, sendo em *C. sympodialis* a warifteína encontrada como alcaloide majoritário. Porém, a maior parte dos estudos realizados com essa substância demonstram sua ação imunomoduladora, e relaxante do musculo liso, não havendo dados sobre seu perfil antimicrobiano.

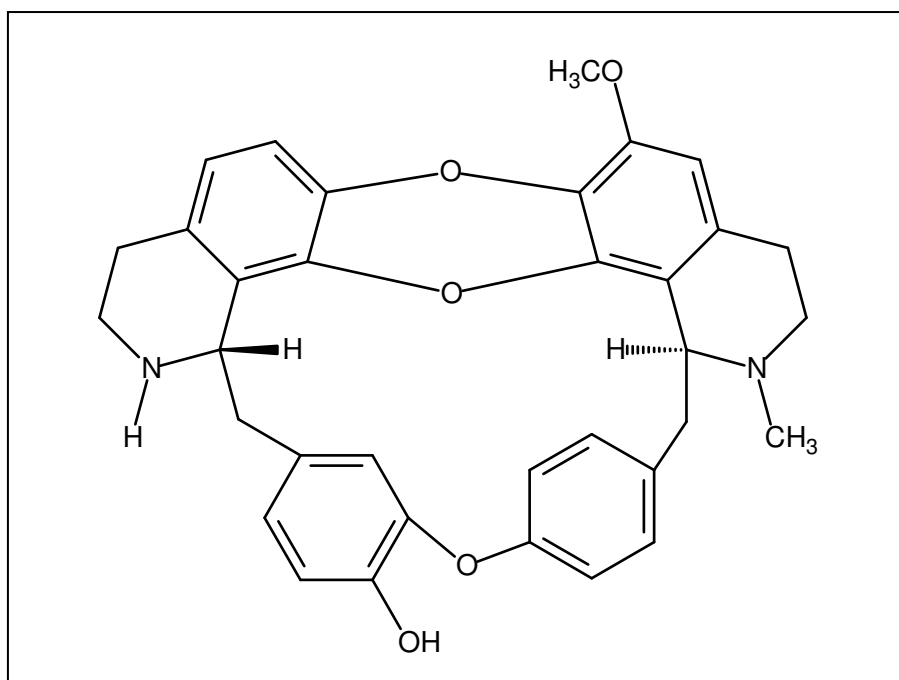


Figura 27: Estrutura química da cocsolina.

Os resultados observados neste trabalho para as bactérias gram-negativas *E. coli* (padrão e multirresistente) e *P. aeruginosa*, são relevantes, visto que geralmente esses tipos de bactérias possuem um perfil maior de resistência a terapia antibiótica devido a algumas características morfológicas, como por exemplo, a membrana externa das bactérias Gram-negativas que representa uma barreira à penetração de inúmeras moléculas, bem como o espaço periplasmático que contém inúmeras enzimas, capazes de quebrar moléculas estranhas a partir do exterior (ASH; MAUCK; MORGAN, 2002).

Além disso, o resultado observado para a FARC e para o ALCS-1 ainda podem ser explicados pela fácil difusão que os alcaloides possuem em membranas biológicas. Os alcaloides possuem características físico-químicas de bases fracas, assim seu pKa é básico e em meios com pH de neutro a alcalino os alcaloides encontram-se em sua forma não-ionizada, o que lhe confere maior lipossolubilidade e assim uma melhor difusão em membranas, como por exemplo a camada de LPS das bactérias Gram-negativas, potencializando sua ação sobre a bactéria.

Estudos sobre a ação antimicrobiana do extrato etanólico das raízes de *C. sympodialis* e de sua respectiva fração alcaloídica não haviam sido anteriormente relatados.

5.3 Atividade moduladora a aminoglicosídeos

A atividade moduladora foi realizada com o EERCs, a FARC, e o isolado ALCS-1, mesmo para os resultados não significativos, já que foram utilizadas concentrações subinibitórias dos produtos a fim avaliar o potencial modulador da ação dos aminoglicosídeos. Os resultados obtidos estão presentes nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do extrato etanólico das raízes de *C. sympodialis* (EERCs). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.

Bactérias		Antibióticos					
		Amicacina		Gentamicina		Neomicina	
		CIM	CIM*	CIM	CIM*	CIM	CIM*
EERCs							
Linhagens Multirresistentes:							
Staphylococcus aureus ATTC 12692	≥ 1024	16,0 ± 1,0	10,08 ± 1,5	4,0 ± 1,0	3,17 ± 1,5	16,0 ± 1,0	8 ± 1,0
Escherichia coli ATCC 25922	≥ 1024	25,4 ± 1,5	16,0 ± 1,0	6,35 ± 1,5	4,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0
Streptococcus mutans ATCC 0046	≥ 1024	40,32 ± 1,5	8,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	64,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	≥ 1024	50,8 ± 1,5	12,7 ± 1,5	8,0 ± 1,0	3,17 ± 1,5	50,8 ± 1,5	10,08 ± 1,5
Linhagens Multirresistentes:							
Escherichia coli 27	≥ 1024	20,15 ± 1,5	8,0 ± 1,0	6,35 ± 1,5	2,0 ± 1,0	25,4 ± 1,5	12,7 ± 1,5
Staphylococcus aureus 358	≥ 1024	64,0 ± 2,0	10,08 ± 1,5	8,0 ± 1,0	2,52 ± 1,5	32,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0

EERCs (concentração inibitória mínima do extrato); CIM (concentração inibitória mínima do antibiótico); CIM* (concentração inibitória mínima combinada entre o antibiótico e a concentração subinibitória do produto natural).

Tabela 9: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e na presença da fração dos alcaloides das raízes de *C. sympodialis* (FARCs). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.

Bactérias	FARCs	Antibióticos					
		Amicacina		Gentamicina		Neomicina	
		CIM	CIM*	CIM	CIM*	CIM	CIM*
Linhagens Multirresistentes:							
Staphylococcus aureus ATTC 12692	256	16,0 ± 1,0	3,17 ± 2,23	4,0 ± 1,0	0,5 ± 1,0	16,0 ± 1,0	2,52 ± 1,5
Escherichia coli ATCC 25922	256	25,4 ± 1,5	10,08 ± 1,5	6,35 ± 1,5	3,17 ± 1,5	32,0 ± 1,0	10,08 ± 1,5
Streptococcus mutans ATCC 0046	≥1024	40,32 ± 1,5	8,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	2,52 ± 1,5	64,0 ± 1,0	5,04 ± 1,5
Pseudomona. aeruginosa ATCC 15442	512	50,8 ± 1,5	16,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	50,8 ± 1,5	10,08 ± 1,5
Linhagens Multirresistentes:							
Escherichia coli 27	512	20,15 ± 1,5	10,08 ± 1,5	6,35 ± 1,5	0,5 ± 1,0	25,4 ± 1,5	8,0 ± 1,0
Staphylococcus aureus 358	256	64,0 ± 2,0	16,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0	32,0 ± 1,0	12,7 ± 1,5

FARCs (concentração inibitória mínima da fração); CIM (concentração inibitória mínima do antibiótico); CIM* (concentração inibitória mínima combinada entre o antibiótico e a concentração subinibitória do produto natural).

Tabela 10: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do alcaloide ALCS-1 isolado das raízes de *C. sympodialis*. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média geométrica (E.P.M.G) da CIM.

Bactérias		Antibióticos					
		Amicacina		Gentamicina		Neomicina	
		CIM	CIM*	CIM	CIM*	CIM	CIM*
ALCS-1							
Linhagens Multirresistentes:							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 12692	256	16,0 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 1,0	4,0 $\pm$ 1,0	1,52 $\pm$ 2,9	16,0 $\pm$ 1,0	2,52 $\pm$ 1,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512	25,4 $\pm$ 1,5	16,0 $\pm$ 1,0	6,35 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 1,0	32,0 $\pm$ 1,0	20,16 $\pm$ 1,5
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 0046	≥ 1024	40,32 $\pm$ 1,5	40,32 $\pm$ 1,5	16,0 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 1,0	64,0 $\pm$ 1,0	32,0 $\pm$ 1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	512	50,8 $\pm$ 1,5	20,16 $\pm$ 1,5	8,0 $\pm$ 1,0	5,04 $\pm$ 1,5	50,8 $\pm$ 1,5	6,35 $\pm$ 2,27
Linhagens Multirresistentes:							
<i>Escherichia coli</i> 27	256	20,15 $\pm$ 1,5	25,39 $\pm$ 1,5	6,35 $\pm$ 1,5	3,17 $\pm$ 1,5	25,4 $\pm$ 1,5	25,4 $\pm$ 1,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	512	64,0 $\pm$ 2,0	40,32 $\pm$ 2,7	8,0 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 1,5	32,0 $\pm$ 1,0	32,0 $\pm$ 1,0

ALCS-1 (concentração inibitória mínima do isolado); CIM (concentração inibitória mínima do antibiótico); CIM* (concentração inibitória mínima combinada entre o antibiótico e a concentração subinibitória do produto natural).

Como parâmetro de análise dos dados, foi considerado sinergismo, quando a presença da concentração subinibitória (CIM/8) do produto natural foi capaz de potencializar a ação do antibiótico, e antagonismo quando foi capaz de diminuir a ação do antibiótico (CANTON e ONOFRE, 2010). Como padrão para análise do fenótipo bacteriano de resistência a aminoglicosídeos foi utilizado o documento M100-S15 (NCCLS, 2010) que avalia os microrganismos da seguinte maneira: resistente a amicacina quando $CIM \geq 32$ e sensível quando $\leq 16 \mu\text{g/mL}$; resistente a gentamicina quando $CIM \geq 8$ e sensível quando $\leq 4 \mu\text{g/mL}$. Esse documento não conta com o padrão de resistência para a neomicina, portanto foi estabelecido neste trabalho para esse antibiótico os mesmos parâmetros que a amicacina.

Para o EERCs, foi observado sinergismo em todas as interações com os antibióticos em todas as linhagens testadas. Os melhores resultados foram observados para a CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a amicacina frente a linhagem multirresistente de *S. aureus*, reduzindo a CIM do antibiótico em 84,25% (de 64 para 10,08 $\mu\text{g/mL}$) revertendo o fenótipo bacteriano de resistente para sensível. Para a CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a gentamicina frente a linhagem de *P. aeruginosa*, reduzindo a CIM em 80,16% (de 50,8 para 10,08 $\mu\text{g/mL}$) revertendo o fenótipo de resistente para sensível. E para a CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente *S. mutans*, reduzindo a CIM em 87,5% (de 64 para 8 $\mu\text{g/mL}$) revertendo o fenótipo de resistente para sensível.

Para a FARCs, também foi observado sinergismo em todas as interações testadas, sendo os melhores resultados observados para: a CIM/8 (32 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a gentamicina frente a linhagem padrão de *S. aureus*, reduzindo a CIM do antibiótico em 87,5% (de 4 para 0,5 $\mu\text{g/mL}$), não houve mudança no fenótipo; para a CIM/8 (64 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a gentamicina frente a linhagem multirresistente de *E. coli*, reduzindo a CIM do antibiótico em 92,12% (de 6,35 para 0,5 $\mu\text{g/mL}$), revertendo o fenótipo de intermediário para sensível; e para a CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente a *S. mutans*, reduzindo a CIM do antibiótico em 92,12% (de 64,04 para 5,04 $\mu\text{g/mL}$), alterando o fenótipo bacteriano de resistente para sensível.

Para o teste de modulação realizado com o alcaloide isolado apenas algumas interações apresentaram sinergismo, observou-se que a presença desse alcaloide junto com a amicacina, na linhagem multirresistente de *E. coli*, gerou um sutil aumento na CIM do antibiótico, ou seja, antagonismo. Das interações que apresentaram sinergismos pode-se destacar os resultados para: a CIM/8 (64 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a gentamicina frente a linhagem multirresistente de *S. aureus*, reduzindo a CIM em 80% (de 8 para 1,6 $\mu\text{g/mL}$), modificando o fenótipo da bactéria de resistente para sensível; para a CIM/8 (32 $\mu\text{g/mL}$)

combinada com a neomicina frente a linhagem padrão de *S. aureus*, reduzindo a CIM em 84,25% (de 16 para 2,52 $\mu\text{g/mL}$), não alterando o perfil de resistência; e para a CIM/8 (64 $\mu\text{g/mL}$) combinada com a neomicina frente a linhagem de *P. aeruginosa*, reduzindo a CIM em 87,5% (de 50,8 para 6,35 $\mu\text{g/mL}$), alterando o fenótipo de resistente para sensível.

As figuras 28 a 33 mostram os gráficos da análise estatística do teste de modulação, evidenciando as variações significativas entre o controle, extrato, fração e o isolado, nas interações com os aminoglicosídeos para cada bactéria.

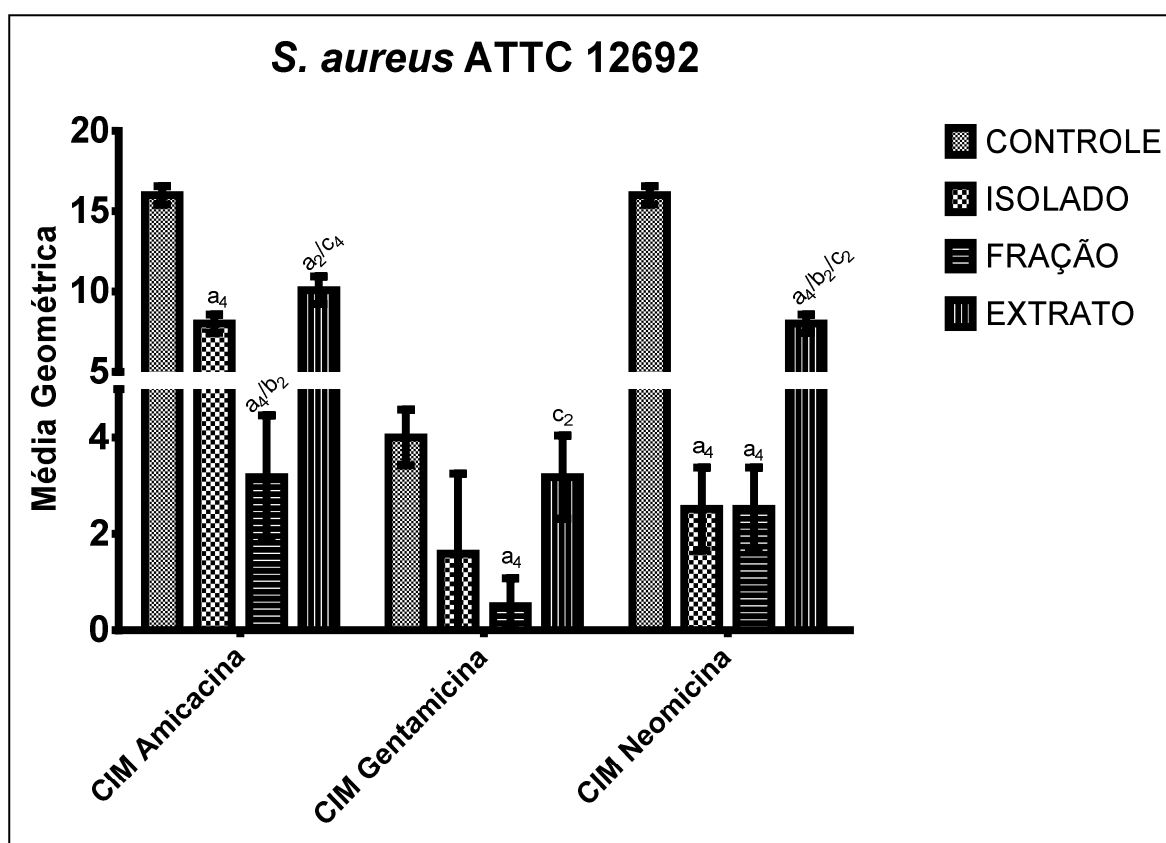


Figura 28: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *S. aureus* ATCC 12692. Legenda: **a** significa análise *versus* controle (a₄= p<0,0001; a₂= p<0,01); **b** análise *versus* o isolado (b₂= p<0,01); **c** análise *versus* a fração (c₂=p<0,01; c₄=p<0,0001)

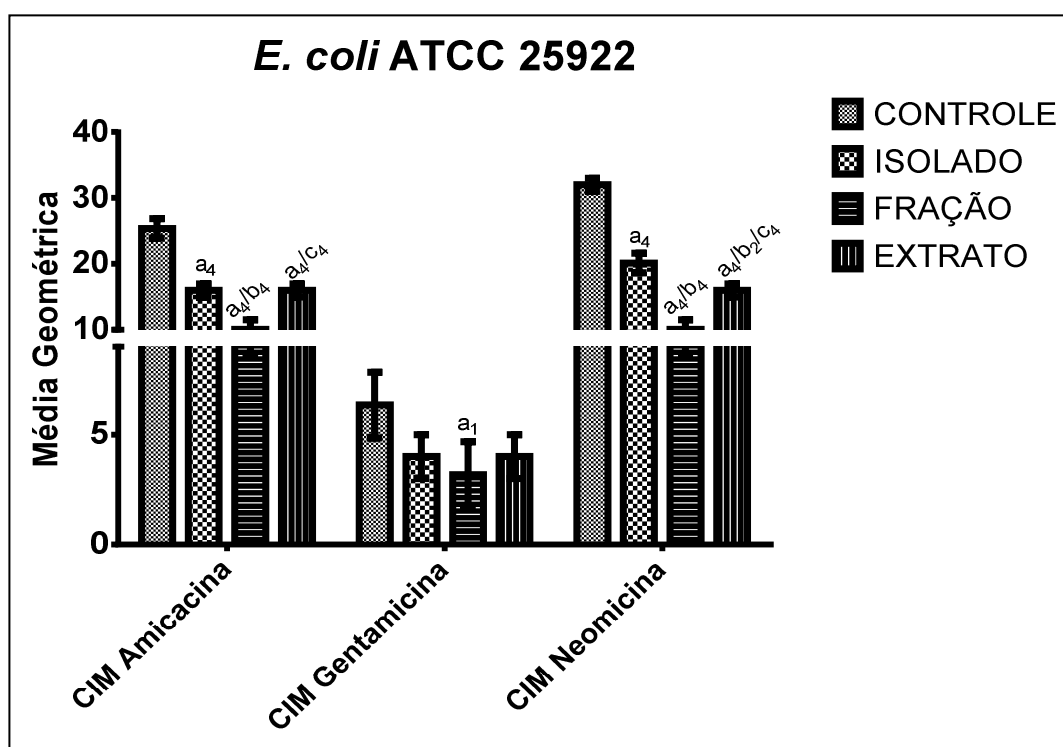


Figura 29: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *E. coli* ATCC 25922. Legenda: **a** significa análise *versus* controle ($a_1 = p < 0,05$; $a_4 = p < 0,0001$); **b** análise *versus* o isolado ($b_2 = p < 0,01$; $b_4 = p < 0,0001$); **c** análise *versus* a fração ($c_4 = p < 0,0001$)

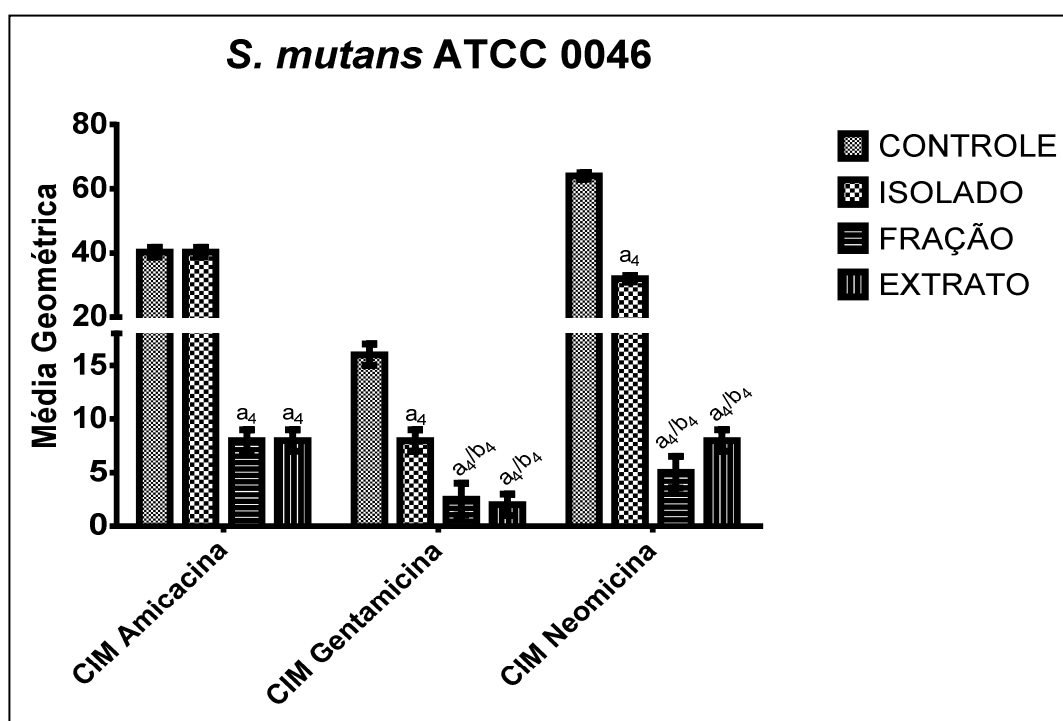


Figura 30: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *S. mutans* ATCC 0046. Legenda: **a** significa análise *versus* controle ($a_4 = p < 0,0001$); **b** análise *versus* o isolado ($b_4 = p < 0,0001$)

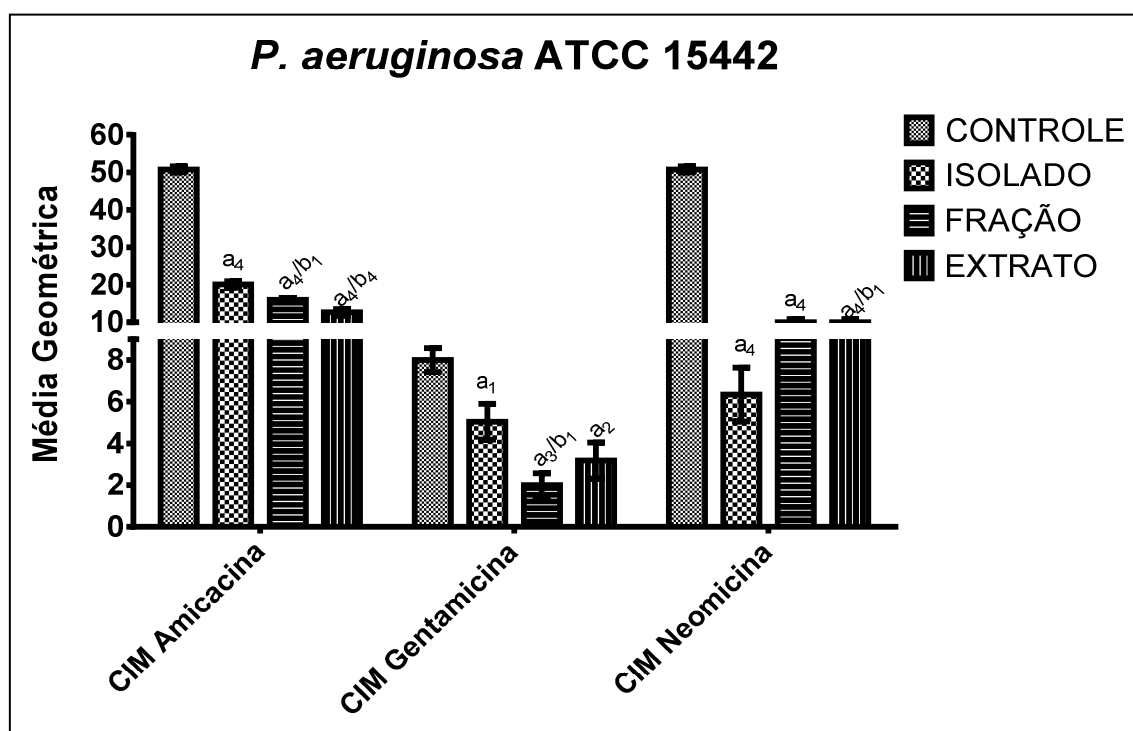


Figura 31: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *P. aeruginosa* ATCC 15442. Legenda: **a** significa análise *versus* controle (a₃=p<0,001; a₄= p<0,0001); **b** análise *versus* o isolado (b₁=p<0,05; b₄=p<0,0001)

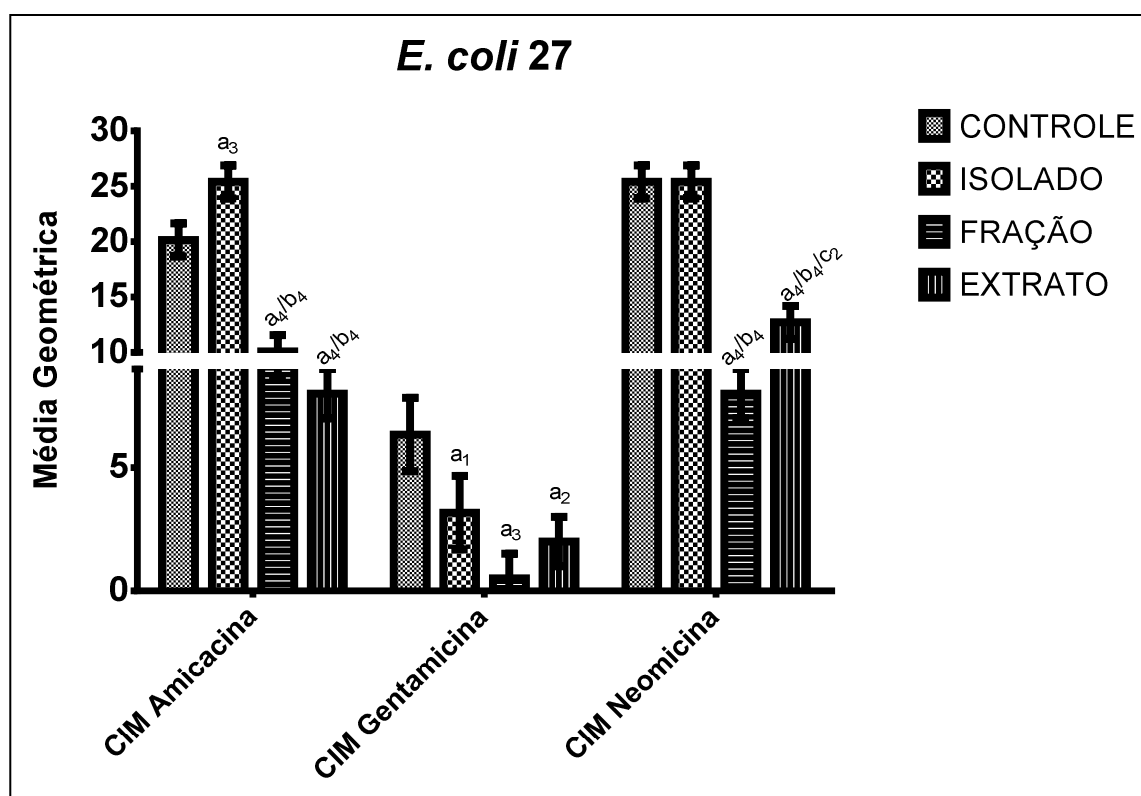


Figura 32: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *E. coli* 27. Legenda: **a** significa análise *versus* controle (a₁= p<0,05; a₂=p<0,01; a₃=p<0,001; a₄= p<0,0001); **b** análise *versus* o isolado (b₄=p<0,0001); **c** análise *versus* a fração (c₂=p<0,01)

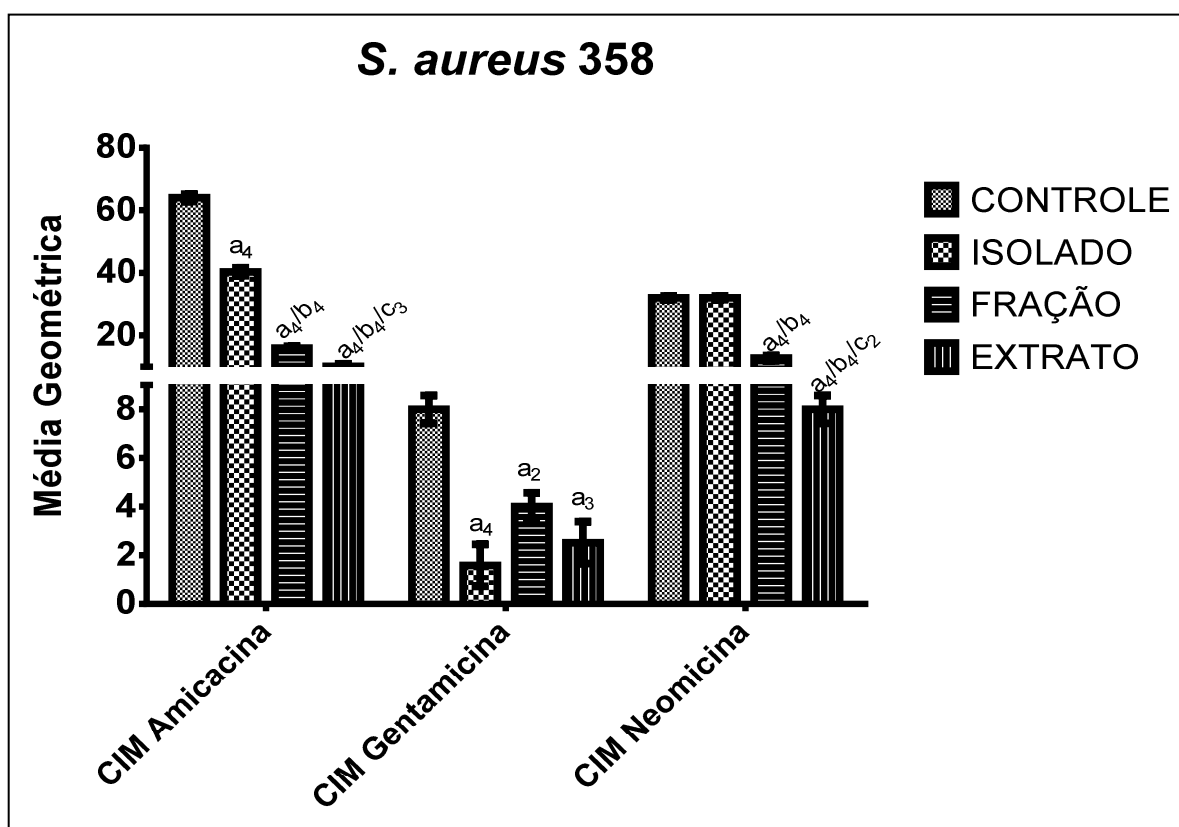


Figura 33: Gráfico do potencial modulador a aminoglicosídeos frente a *S. aureus* 358. Legenda: **a** significa análise *versus* controle ($a_2 = p < 0,01$; $a_3 = 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$); **b** análise *versus* o isolado ($b_4 = p < 0,0001$); **c** análise *versus* a fração ($c_2 = p < 0,01$; $c_3 = p < 0,001$)

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para designar substâncias que modulam ou mesmo reverterem o fenótipo de resistência bacteriana a certos antibióticos, podendo alterar a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (COSTA et al., 2008). Além da bomba de efluxo, produtos naturais podem atuar em outras vias de resistência atuando como modificadores de receptores de antibióticos, inibidores enzimáticos, ou ainda como compostos que aumentam a permeabilidade da membrana (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009).

Diversos produtos naturais têm sido investigados quanto sua propriedade moduladora, muitos dos quais apresentam efeitos sinérgicos importantes, constituindo uma opção no combate ao fenômeno da resistência microbiana (FERNANDES et al, 2014; FIGUEREDO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; ANGELICO et al., 2014; BITU et al., 2014).

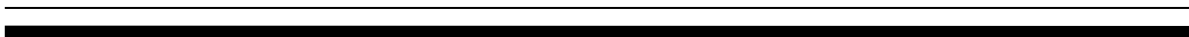
Alguns alcaloides possuem efeito modulador da resistência a antibióticos, como por exemplo, a reserpina, isolada da *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae), apresenta atividade

potencializadora da ação de alguns antibióticos como tetraciclina, norfloxacin e ciprofloxacina em cepas multirresistentes (MDR) que possuem bomba de efluxo como mecanismo de resistência (GIBBONS e UDO, 2000). Outra associação sinérgica observada para alcaloides se dá entre a berberina e o 5-MHC (5'methoxyhydnocarpin). A ação antimicrobiana da berberina já é bastante conhecida, porém esse metabólito é facilmente eliminado da célula bacteriana por meio da bomba de efluxo. Entretanto algumas plantas sintetizam o 5-MHC juntamente com a berberina, o 5-MHC interfere na bomba de efluxo, o que consequentemente acarreta em uma maior concentração desse alcaloide no interior da célula alvo e assim uma maior atividade (BALL et al, 2006).

Os alcaloides, como mencionados anteriormente, são lipossolúveis em sua forma não-ionizada, podendo interagir com a membrana bacteriana e assim facilitar a penetrabilidade da droga no interior da célula bacteriana. Além disso, já é conhecido a ação de alguns alcaloides sobre canais iônicos, como por exemplo a warifteína, cuja ação relaxante do músculo liso brônquico deve-se à sua ação inibitória dos canais de Ca^{+2} operados por receptor (ROCs) e canais de Ca^{+2} operados por voltagem (VOCs) (CÔRTEZ, 1995), portanto pode-se propor que alcaloides dessa classe possam atuar em outros canais, como por exemplo na bomba de efluxo, ou outros canais vitais na membrana bacteriana, sendo esta uma provável via para sua atividade modificadora da ação de aminoglicosídeos.

Estudos sobre a ação moduladora do extrato etanólico e fração de alcaloides das raízes de *C. sympodialis* não haviam sido anteriormente relatados.

CONCLUSÕES



6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O extrato etanólico das raízes de *Cissampelos sympodialis* é particularmente rico em alcaloides, e por meio da revisão de literatura observou-se que dentre o gênero os alcaloides bisbenzilisoquinolínicos são os mais abundantes;
- Foi possível isolar um alcaloide a partir da FARC e elucidar sua estrutura, o ALCS-1 corresponde a um alcaloide aporfínico, isômero da bulbocapnina;
- O EERCs não apresentou atividade antimicrobiana significativa (CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$), já a FARC apresentou atividade frente a *S. aureus* (ATCC 12692), *S. aureus* (358), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (27) e *P. aeruginosa* (15442), com de CIM de 256, 256, 256, 512 e 512 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, o alcaloide também apresentou atividade frente as mesmas bactérias com CIM de 256, 512, 512, 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- O EERCs mesmo não apresentando valores significativos de CIM, quando testados junto com os aminoglicosídeos foi capaz de potencializar a ação dessa classe antibióticos. Tanto o EERCs quanto a FARC mostraram sinergismo em todas as linhagens testadas, em associação com os três aminoglicosídeos testados em vários casos revertendo o fenótipo bacteriano de resistente para sensível, compreendendo promissores agente terapêutico no tratamento antimicrobiano, interferindo na resistência bacteriana. O isolado, porém, mostrou em um caso ação antagônica, e foi menos eficiente em converter o fenótipo bacteriano.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADJANOHOOUN, E. J.; ADJAKIDJE, V.; AHYI, M. R. A.; AKÉ ASSI, L.; AKOEGNINOU, A.; D'ALMEIDA, J.; APOVO, F.; BOUKEF, K.; CHADARE, M.; CUSSET, G.; DRAMANE, K.; EYME, J.; GASSITA, J. N.; GBAGUIDI, N.; GOUDOTE, E.; GUINKO, P.; HOUNGNON, P.; LO, I.; KEITA, A.; KINIFFO, H. V.; KONE-BAMBA, D.; MUSAMPA NSEYYA, A.; SAADOU, M.; SODOGANDJI, TH.; DE SOUZA, S.; TCHABI, A.; ZINSOU DOSSA, C.; ZOHOUN, TH. **Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée.** Agence de Coopération culturelle et technique, Paris, 1989.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, pp. 114-140, 2007.

AHMAD, R.; MALIK, M. A.; ZIA-UL-HAQ, M. Alkaloids of *Cissampelos pareira*. **Fitoterapia**, 282, 1992.

ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** Programa de Pósgraduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Brazil. 1994.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, pp. 1511-1522, 2003.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; ASSIS, T. S.; MEDEIROS, I. A.; THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, pp. 247-252, 1998.

AMRESH, G.; RAO, C. V.; SINGH, P. N. Antioxidant activity of *Cissampelos pareira* on benzo(a)pyrene-induced mucosal injury in mice. **Nutrition Research**, v. 27, pp. 625-632, 2007a.

AMRESH, G.; RAO, C. V.; SINGH, P. N. Evaluation of *Cissampelos pareira* against gastric cancer and enzymes associated with carcinogen metabolism. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 8, pp. 595-603, 2007b.

AMRESH, G.; REDDYA, G. D.; RAO, C. V.; SINGH, P. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, pp. 526–531, 2007.

AMRESH, G.; SINGH, P. N.; RAO, C. V. Toxicological screening of traditional medicine Laghupatha (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, pp. 454–460, 2008.

AMRESH, G.; SINGH, P. N.; RAO, C. V. Antinociceptive and antiarthritic activity of *Cissampelos pareira* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, pp. 531–536, 2007.

ANGELICO, E. C.; RODRIGUES, O. G.; COSTA, J. G. M.; NETO, V. Q.; LUCENA, M. F. A.; MEDEIROS, R. S. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and *Croton* varieties modulator in the Brazilian Northeast semiarid. **African Journal of Plant Science**, v. 8, pp. 392–397, 2014.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids - Secrets of Life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role**. London: Elsevier, 2007.

ANWER, F.; POPLI, S. P.; SRIVASTAVA, R. M.; KHARE, M. P. Studies in medicinal plants. Part III. Protoberberine alkaloids from the roots of *Cissampelos pareira* linn. **Experientia**, v. 24, p. 999, 1968.

ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, pp. 713–716, 2002.

ASSIS, A. C. L.; ARAÚJO, I. G. A.; LIMA, R. P. C.; ALMEIDA, M. M.; MARINHO A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CRUZ, J. S.; SILVA, D. F.; MEDEIROS, I. A. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, induces relaxation by activating potassium channels in vascular myocytes. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, pp. 37–44, 2013.

AYERS, S.; ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUS, S.; STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Anthelmintic activity of aporphine alkaloids from *Cissampelos capensis*. **Planta Medica**, v. 73, pp. 296–297, 2007.

BAFNA, A.; MISHRA, S. Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. **Scientia Pharmaceutica**, v. 78, pp. 21–31, 2010.

BALL, A. R.; CASADEI, G.; SAMOSORN, S.; BREMNER, J.; AUSUBEL, F. M.; MOY, T. I.; LEWIS, K. Conjugating Berberine to a multidrug resistance pump inhibitor creates a effective antimicrobial. **ACS Chemical Biology**, v. 01, pp. 594-600, 2006

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Journal of association for the advancement of Science**, v. 49, pp. 386-394, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the Menispermaceae. **The Alkaloids**, Copyright, v. 54, p. 1-190, 2000.

BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; CORNÉLIO, M. L.; DIAS, C. S.; GRAY, A. I. Cissaglaberrimine, an aporphine alkaloid from *Cissampelos glaberrima*. **Phytochemistry**, v. 44, pp. 959-961, 1997.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais e bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.13, p. 29-39, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, pp. 679-688, 2009.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; BALESTIERI, F. M.; ROSSI-BERGMANN, B.; PEÇANHA, L. M.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1- skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, pp. 191-197, 2004.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; PEÇANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) inhibits anaphylactic shock reaction in murine allergic model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, pp. 287-291, 2005.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, pp. 1152-1160, 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; VIEIRA, G. C.; FILHO, J. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIRES, A. L.; MARTINS, M. A.; SOUZA, H. S.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 13, pp. 148-155, 2012.

BITU, V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G.; MENEZES, I. R. A.; BOTELHO, M. A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Products Research**, v. 1, pp. 1-4, 2014.

BOISSER, J. R.; COMBES, G.; PERRET, R.; DUMONT, C. Menispermaceous alkaloids of Madagascar: *Cissampelos pareira*, *Cycleea madagascariensis*, *Anisocuclea grandieri* e *Spirospermus penduliferum*. **Lloydia**, v. 28, 191-198, 1965.

BRAGA, J. M. A. Menispermaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB163>>.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of Natural Products, C-02174**. Chapman & Hall, London, 1993.

CACERES, A.; GIRON, L. M.; MARTINEZ, A. M. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, pp. 233-245, 1987.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, pp. 348-354, 2010.

CARVALHAES, S. F.; COSTA, D. L.; MAZZEI, J. L.; TADDEI, L. E. M.; D'AVILA, L. A. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian "vinca rosea" using Ion exchange chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, pp. 83-85. 2002.

CAVALCANTE, H. M. M.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, D. F.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; CORREIA, N. A.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects elicited by Milonine, a new 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, pp. 122-130, 2010.

CAVALCANTI, A. C.; MELO, I. C. A. R.; MEDEIROS, A. F. D.; NEVES, M. V. M.; PEREIRA, A. N.; OLIVEIRA, E. J. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, pp. 527-541, 2013.

CERQUEIRA-LIMA, A. T.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; CARVALHO, L. C. P.; COSTA, R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M.; RUSSO, M.; BARBOZA, RENATO; OLIVEIRA, E. J.; MARINHO, A.; FIGUEIREDO, C. A. Effects of *Cissampelos*

sympodialis Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, v. 11, pp. 1458-1467, 2010.

CHAPIN III, F. S.; SCHULZE, E. D.; MOONEY, H. A. The ecology and economics of storage in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21, pp. 423-447, 1990.

CORDELL, G. A.; CHOI, T. Alkaloids and their biosynthesis. In: UNESCO. **Encyclopedia of life support systems**. 2010.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. v. 5. Min. da Agricultura, Rio de Janeiro, 1929.

CORTES, S. F.; ALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**, v. 9, pp. 579-583, 1995.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARTINS, M. A.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology**, v. 8, pp. 519-525, 2008

COSTA, H. F.; LEITE, F. C.; ALVES, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Managing murine food allergy with *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids. **International Immunopharmacology**, v. 17, pp. 300-308, 2013.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, pp. 245-248, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, pp. 328-330, 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, cap. 24, pp. 1250-1318, 2000.

DA-CUNHA, E. V. L.; CORNÉLIO, M. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R.; GRAY, A. Etefine, a Stephaoxocane Alkaloid from *Cissampelos glaberrima*. **Journal of Natural Products**, v. 61, pp. 1140-1142, 1998.

DEFREITAS M. R.; DEALENCAR J. L.; DACUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochem**, v. 40, pp. 1553-1555, 1995.

DENG, Y.; YU, Y.; LUO, H.; ZHANG, M.; QIN, X.; LI, L. Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. **Food Chemistry**, v. 124, pp. 1556-1560, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. Chichester: 3^a ed. John Wiley & Sons, 2009.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, mar. 2005.

DWUMA-BADU, D.; AYIM, J. S. K.; MINGLE, C. A.; TACKIE, A. N.; SLATKIN, D. J.; KNAPP, J. E.; SCHIFF JR., P. L. Alkaloids of *Cissampelos pareira*. **Phytochemistry**, v. 14, pp. 2520–2521, 1975.

EICHLER, A. W. **Flora Brasilienses**, v. 13, p. 121, 1887.

EVANS, W. Alkaloids. In: **Trease and Evans' pharmacognosy**. 16. ed. London: Elsevier, 2009a.

EVANS, W. Plant cell and tissue culture; biochemical conversions; clonal propagation. In: **Trease and Evans' pharmacognosy**. 16. ed. London: Elsevier, 2009b.

FALANA, B. A.; E. CAXTON-MARTINS, A.; OFUSORI, D. A. Microanatomical effects of aqueous extract of the leaves *Cissampelos mucronata* on the kidneys of adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **Scientific Research and Essay**, v. 6, pp. 2619-2623, 2011.

FENG, P. C.; HAYNES, L. J.; MAGNUS, K. E.; PLIMMER, J. R.; SHERRATT, H. S. Pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 14, pp. 556–561, 1962.

FERNANDES, C. N.; FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R.. Evaluation of the modulatory and antibacterial activity of the ethanolic extract and fractions of *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, pp. 16-20, 2014.

FIGUEREDO, F. G.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; LEITE, N. F.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. **Pharmaceutical Biology** (Online), v. 55, pp. 560-565, 2014.

FORMAN, L.L.; SHORT, P.S. Menispermaceae. In: SHORT, P. S.; COWIE, I. D. (eds), **Flora of the Darwin Region**. Vol. 1, pp. 1-8, 2011. Disponível em: <http://www.nt.gov.au/nreta/wildlife/plants_herbarium/index.html>.

FREITAS, M. R.; CORTES, S. F.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Modification of calcium metabolism in rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 48, pp. 335-338, 1996.

GESSLER, M. C.; NKUNYA, M. H.; MWASUMBI, L. B.; HEINRICH, M.; TANNER, M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. **Acta Tropica**, v. 56, pp. 65-77, 1994.

GIBBONS, S.; UDO, E. E. the effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v. 14, pp. 139-140, 2000.

GOGTE, V. M. **Ayurvedic pharmacology and therapeutic uses of medicinal plants (Dravyagunavigyan)**, ed. 1, Bharatiya Vidya Bhavan (SPARC), Mumbai Publications, 2000.

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Novel O-demethylases of morphine biosynthesis in opium poppy. **Nature Chemical Biology**, v. 6, pp. 273-275, 2010.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. 1. reimp. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, J.; CHAMORRO, C. L-tryptophan reacts with naturally occurring and food-occurring phenolic aldehydes to give phenolic tetrahydro-beta-carboline

alkaloids: activity as antioxidants and free radical scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, pp. 2168-2173, 2003.

HOOT, S. B.; ZAUTKE, H.; HARRIS, D. J.; CRANE, P. R.; NEVES, S. S. Phylogenetic patterns in Menispermaceae based on multiple chloroplast data. **Systematic Botany**, v. 34, pp. 44–56, 2009.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, pp. 391-400, 2007

HU, Q.; LUO, X.; CHEN, T.; GILBERT, M. G. Menispermaceae. In: **Flora of China**. V. 07. 2008. Disponível em: <http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10561>.

HULLATTI, K. K.; SHARADA, M. S. Comparative phytochemical investigation of the sources of ayurvedic drug Patha: A chromatographic fingerprinting analysis. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, pp. 39-45, 2010.

JOHNS, T.; MUHORO, E. B.; SANAYA, P.; KIMANANI, E. K. Herbal remedies of the batemi of Ngorongoro District, Tanzania: A Quantitative Appraisal. **Economic Botany**, v. 48, pp. 90-95, 1994.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KHARE, C. P. **Indian Medicinal Plants**, New York, Springer Science, Business Media and LLC, Springer India, New Delhi, 2007.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D. **Indian medicinal plants**, v. 1., second ed. Oriental Enterprises, Dehradun, India, 2001.

KRUKOFF, B. A., SMITH, A. C. Notes on the botanical components of curare-II. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 66, pp-117-121, 1939.

KUMAR, C. P.; CHANDRA, D. S.; KUMAR, D. S. Antimicrobial activity os *Ficus racemosa* L. and *Cissampelos pareira* L. var. *hisurta* (DC) Forman., against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. subtilis*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, pp. 151-153, 2012.

KUMAR, K. A.; SATYANARAYANA, T.; MATHWES, A.; RAO, Y. S.; KIRAN, K. R. Antihyperglycemic activity of methanolic extract of *Cissampelos pareira* Linn roots on blood

glucose levels of Streptozotocin-Induced Diabetic rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, pp. 3399-3401, 2011.

KUPCHAN, S. M.; PATEL, A. C; FUJITA, E. Tumor inhibitors. VI. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, pp. 580-583, 1965.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, pp. 969-978, 1988

LARSON, R. A.; MARLEY, K. M. Quenching of singlet oxygen by alkaloids and related nitrogen heterocycles. **Phytochemistry**, v. 23, pp. 2351-2354, 1984.

LEWIS, W. H.; LEWIS M. **Medical Botany**, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1977.

LIMA, T. F. A.; ROCHA, J. D. B.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DECOTÉ-RICARDO, D.; SARAIVA, E. M.; ARRUDA, L. B.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. Warifteine, an alkaloid purified from *Cissampelos sympodialis*, inhibits neutrophil migration *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Immunology Research**, pp. 1-12, 2014.

LIRA, G. A.; ANDRADE, L. M.; FLORÊNCIO, K. C.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, pp. 356-358, 2002.

LOHOMBO-EKOMBA, M. L.; OKUSA, P. N.; PENGE, O.; KABONGO, C.; CHOUDHARY, M. I; KASENDE, O. E. Antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and cytotoxic activities of *Albertisia villosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, pp. 331-335, 2004.

LOOMIS, C. W.; PENNING, J.; MILNE, B. A Study of the Analgesic Interaction between Intrathecal Morphine and Subcutaneous Nalbuphine in the Rat. **Anesthesiology**, v. 71, pp. 704-710, 1989.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, pp. 2521 – 2529, 2002.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PITA, J. C. L. R.; BRANCO, M. V. S. C.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F.; DA-CUNHA, E. V. L; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Azaphenanthrene alkaloids with antitumoral activity from *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, pp. 7125-7131, 2011.

MARINHO, A. F.; OLIVEIRA, E. J.; TAVARES, J. F.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. ^1H and ^{13}C NMR assignments of two new isomeric bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 5, pp. 312-315, 2013.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MAURYA, R.; SRIVASTAVA, S.; KULSHRESHTA, D. K.; GUPTA, C. M. Traditional remedies for fertility regulation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, pp. 1431-1450, 2004.

MEDEIROS, I. A.; PIRES, S. L. S.; ALMEIDA, R. N.; THOMAS, G. Cardiovascular effects of an aqueous fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in the rat. **Phyromedicine**, v. 5, pp. 97-102, 1998.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, pp. 143-151, 2003.

MENDONÇA-NETTO, S.; VARELA, R. W. B.; FECHINE, M. F.; QUEIROGA, M. N. G.; SOUTO-MAIOR, F. N.; ALMEIDA, R. N. Antidepressant effects of total tertiary alkaloid fraction of *Cissampelos sympodialis* Eichler in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, pp. 165-169, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. S.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research. Pytother. Res.** v. 15, pp. 127-130, 2001.

MORITA, H.; MATSUMOTO, K.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; IITAKA, Y. Azafluranthene alkaloids from *Cissampelos pareira*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, pp. 1307-1308, 1993a.

MORITA, H.; MATSUMOTO, K.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; IITAKA, Y. Structures and solid state tautomeric forms of two novel antileukemic tropoloisoquinoline alkaloids, Pareirubrines A and B, from *Cissampelos pareira*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, pp. 1418-1422, 1993b.

MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. A novel condensed tropone-isoquinoline alkaloid, pareitropone, from *Cissampelos pareira*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, pp. 597-598, 1995.

MUKHERJI, B.; BHANDARI, P. R. *Cissampelos pareria* L.-Source of a new curariform drug. **Planta Medica**, v. 7, pp. 250-259, 1959.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. 6^a ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A6, v. 23, 2005.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo**. Villanova, PA: NCCLS approved standard M100-S15, v. 25, 2005.

NEUWINGER, H. D. **African Ethnobotany: Chemistry, Pharmacology, Toxicology**. London: Chapman and Hill, 1994.

NONDO, R. S. O.; MBWAMBO, Z. H.; KIDUKULI, A. W.; INNOCENT, E. M.; MIHALE, M. J.; ERASTO, P.; MOSHI, M. J. Larvicidal, antimicrobial and brine shrimp activities of extracts from *Cissampelos mucronata* and *Tephrosia villosa* from coast region, Tanzania. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, pp. 2-7, 2011.

NWAFOR, S. V.; OKOYE, C. F. Antiulcer properties of the ethanol root extract of *Cissampelos mucronata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, pp. 396–403, 2005.

OBER, D.; HARTMANN, T. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. **Plant Molecular Biology**, v. 44, pp. 445–450, 2000.

OLIVEIRA JÚNIOR, W. M.; BENEDITO, R. B.; SANTOS, C. C. M. P.; RODRIGUES, L. T. D.; MARINHO, A. F.; MORAIS, L. C. S. L.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Analgesic effect of hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl leaves. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, pp. 333-337, 2011.

OLIVEIRA, A. D. L.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A. Chemical Composition, Modulatory Bacterial Resistance and Antimicrobial Activity of Essential Oil the *Hyptis martiusii* Benth by Direct and Gaseous Contact. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, p. 1, 2014.

OLIVER, B. Selecting local drug plant in Nigeria. Botanical and chemical relationship in three families. **Quarterly journal of crude drug research**, v. 19, pp. 1194–1211, 1969.

ORTIZ, R. C.; KELLOGG, R. A.; VAN DER WERFF, H. Molecular phylogeny of the moonseed family (Menispermaceae): Implications for morphological diversification. **American Journal of Botany**, v. 94, pp. 1425-1438, 2007.

ORTIZ, R. C.; NEE, M. H. A new species of *Cissampelos* (Menispermaceae) from Bolivia and Paraguay. **PhytoKeys**, v. 38, pp. 89–99, 2014.

OTSHUDI, A. L.; APERS, S.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E.; VAN ZEEBROECK, A.; LAUWERS, S.; FRÉDÉRICH, M.; FORIERS, A. Biologically active bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root bark of *Epinetrum villosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, pp. 89-94, 2005.

PARSAEIMEHR, A.; SARGSYAN, E.; VARDANYAN, A. Expression of secondary metabolites in plants and their useful perspective in animal health. **Animal Biology & Animal Husbandry**, v. 3, pp. 115-124, 2011.

PELLETIER, S. W. The nature and definition of an alkaloid. In: **Alkaloid. Chemistry and Biological Perspective**. v.1, New York: John Wiley & Sons. 1983.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, pp. 970-983, 2007.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 2; IBDF: Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro; 1984.

PIO-CORREA, M.. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas**. Min. da Agricultura, Rio de Janeiro, 1929.

PIUVEZAM, M. R; PEÇANHA, L. M. T.; ALEXANDER, J.; THOMAS, G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, pp. 93–101, 1999.

PORTO, N. M.; BASÍLIO I. J. L. D.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, pp. 102-107, 2008.

POTIER, P. Search and discovery of new antitumour compounds. Rhône Poulenc lecture. **Chemical Society Reviews**, v. 21, pp. 113-119, 1992

POWELL, R. G.; WEISLEDER, D.; SMITH Jr, C. R. Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: Structure and activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, pp. 1227–1230, 1972.

PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. **Neurochemical Research**, v. 30, pp. 225-255, 2005.

RAJAN, S.; SETHURAMAN, M.; MUKHERJEE, P. K. Ethnobiology of the Nilgiri Hills, India. **Phytotherapy Research**, v. 16, pp. 98–116, 2002.

RHODES, D. G. A revision of the genus *Cissampelos*. **Phytologia**, v. 30, pp. 415-485, 1975.

RHODES, D. G. Menispermaceae. In: DUKE, J. A. **Flora of Panama IV**, fascicle V., Annals of the Missouri Botanical Garden, v49, pp 137-255, 1962.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 122, pp. 27-31, 1999.

RIVASTAVA, R. M.; KHARE, M. P. Water soluble alkaloids from the root bark of *Cissampelos pareira*. **Chemische Berichte**, v. 97, pp. 2732-2741, 1964.

ROCHA, J. D.; DECOTÉ-RICARDO, D.; REDNER, P.; LOPES, U. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; ARRUDA, L. B.; MARIA TORRES PEÇANHA, L. Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta Medica**, v. 76, pp. 325–330, 2010.

ROJANASONTHORN G. **The isolation and characterization of bisbenzylisoquinoline alkaloid “tetrandrine” from the root of *Cissampelos pareira* L.** (Dissertação de Mestrado). Department Of Chemistry, Faculty Of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1970.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, pp. 311 - 318, 2011.

RUFINO, A. R.; BRANT, A. J. C.; SANTOS, J. B. O.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P. Simple method for identification of skeletons of aporphine Alkaloids from ¹³C NMR data using artificial neural networks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, pp. 645-651, 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa ISSN 1679-6535. Fortaleza, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Embrapa ISSN 1679-6535. Fortaleza, 2006.

SABIR S. M.; ROCHA J. B. T.; Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, 111, 845–851, 2008.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, pp. 293-297, 2001.

SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin – a textbook of pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical, 1994.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. 1. reimp. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SATHIYA, M.; MUTHUCHELIAN, K. Antitumor potential of total alkaloid extract from *Tabebuia rosea*, (Bertol.) DC. Leaves on MOLT-4 cells *in vitro*. **Nature and Science**, v. 8, pp. 77-85, 2010.

SAYANA, S. B.; KHANWELKAR, C. C.; NIMMAGADDA, V. R.; CHAVAN, V. R.; RAMESH, B. H.; KUMAR, N. Evaluation of antiurolithic activity of alcoholic extract of roots of *Cissampelos pareira* in albino rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, pp. HC01-HC04, 2014a.

SAYANA, S. B.; KHANWELKAR, C. C.; NIMMAGADDA, V. R.; DAS, J. M. B.; CHAVAN, V. R.; KUTANI, A.; KOTAGIRI, K. Evaluation of diuretic activity of alcoholic extract of roots of *Cissampelos pareira* in albino rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, pp. HC1-HC4, 2014b.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia da planta**

ao medicamento. 6. ed. 1. reimp. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SCHMELZER, G. H. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1). In: **Plantes médicinales**. PROTA, Wageningen, Netherlands. 2008.

SEIGLER, D. S. **Plant Secondary Metabolism**. Boston MA: Chapman and Hall (Kluwer Academic Publishers), 1998.

SELVANAYAHGAM, Z. E.; GNANEVENDHAN, S. G.; BALAKRISHNA, K.; RAO, R. B. Antisnake venom botanicals from ethnomedicine. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 2, pp. 45-100, 1994.

SEMWAL, D. K.; BADONI, R.; SEMWAL, R.; KOTHIYAL, S. K.; SINGH, G. J. P.; RAWAT, U. The genus *Stephania* (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, pp. 369–383, 2010.

SENNER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from amaryllidaceae. **Phytoterapy Research**, v. 17, pp. 1220-1223, 2003.

SHUKLA, P.; SHUKLA, P.; GOPALAKRISHNA, B. Investigation of in-vitro anthelmintic activity of *Cissampelos pareira* Linn against *Pheretima posthuma*. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 3, pp. 265-267, 2012.

SILVA, E. C.; RAYOL, C. D.; MEDEIROS, P. L.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; PIUVEZAN, M. R.; BRABOSA-FILHO, J. M.; MARINHO, A. F.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G.; CASSILHAS, A. P. P.; ANDRADE, P. P. Antileishmanial activity of Warifteine: A bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **The Scientific World Journal**, pp. 1-5, 2012.

SINGH, B. K.; PILLAI, K. K.; KOHLI, K.; HAQUE, S. E. Effect of *Cissampelos pareira* root extract on isoproterenol-induced cardiac dysfunction. **Journal of Natural Medicines**, v.67, pp. 51-60, 2013.

SINGH, V.; BANYAL, H. S. Antimalarial effect of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook.f. & Thoms and *Cissampelos pareira* L. on *Plasmodium berghei*. **Current science**, v. 101, pp. 1356-1358, 2011.

SNEDDEN, W.; PARKER, R. B.; GORINSKY, C. Electron-impact studies in medicine and biochemistry—II: The mass spectra of the alkaloids from *Cissampelos ovalifolia* D.C. **Organic Mass Spectrometry**, v. 4, pp. 607-614, 1970.

SPARG S. G.; VAN STADEN, J.; JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used south african plants against schistosomiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, pp. 209-214, 2000.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LACLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialites of aporphinoid alkaloids. **Current Medical Chemistry – Anti-Cancer Agents**, v. 5, pp. 173-182, 2005.

THAKUR, P.; RANA, A. C. Effect of *Cissampelos pareira* leaves on anxiety-like behavior in experimental animals. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 3, pp. 188-193, 2013.

THAVAMANI, B.; MATHEW, M.; DHANABAL, S. Anticancer activity of *Cissampelos pareira* against dalton's lymphoma ascites bearing mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, pp. 200-206, 2014.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C; DUARTE, J. C.; SOUZA, D. P. Bronchodilator activity of na aqueous fraction of na ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine**, v. 4, pp. 233-238, 1997.

THOMAS, G.; SELAK, M.; HENSON, P. M. Effects of the aqueous fraction of the etanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in human neutrophils. **Phytotherapy Research**, v. 13, pp. 9-13, 1999.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, pp. 151-156, 2001.

TSHIBANGU, J. N.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. HPLC isolation of the anti-plasmodially active bisbenzylisoquinone alkaloids present in roots of *Cissampelos mucronata*. **Phytochemical Analysis**, v. 14, pp. 13-22, 2003

VAIDYA, B. G.. **Nighantu Adarsh**, vol. 1. Chaukhambha Bharti Academy Publications, Varanasi, India, 1988.

VAN WYK, B. E.; GERICKE, N. **People's Plants. A Guide to the Useful Plants of Southern Africa**. Briza, Pretoria, South Africa, 2000.

VIEIRA, G. C.; LIMA, J. F.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; Piuvezam, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-

regulates airway allergic reaction by reducing lung CD3+T cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, pp. 916-925, 2013.

VON KOENEN, E. **Medicinal, Poisonous, and Edible Plants of Namibia**. Klaus Hess Publishers/Verlag, Windhoek, Namibia. 2001.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-100, 2009.

WARRIER, P. K.; NAMBIER, V. P.; RAMANKUTTY, C. **Indian medicinal plants-A Compendium of 500 species**, v. 5, Orient Longman P. Ltd., Chennai, 2005.

WATSON, L; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Version: 19th, August 2014. Disponível em: <<http://delta-intkey.com/angio/www/menisper.htm>>.

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern AFRICA**, 2 ed.; Livingstone: London, UK, 1962.

WET, H.; HEERDEN, F. R.; WYK, B. E. Alkaloidal variation in *Cissampelos capensis* (Menispermaceae). **Molecules**, v. 16, pp. 3001-3009, 2011.

WET, H.; HEERDEN, F. R.; WYK, B. E. Alkaloids of *Antizoma miersiana* (Menispermaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, pp. 799-807, 2005.

WINK, M. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In: BROSSI, A. **The alkaloids**. v. 43. San Diego: Academic, 1993.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: VASIL, I. K.; CONSTABEL, F. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. v. 4. Academic Press Inc, 1987

ZHANG, S, CHANG, J.; DAMU, G. L. V.; GENG, R.; ZHOU, C. Berberine azoles as antimicrobial agents: synthesis, biological evaluation and their interactions with human serum albumin. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 4, pp. 839-846, 2013.

ZIEGLER, J.; FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, pp. 735–769, 2008.

ZUPKÓ, I.; RÉTHY, B.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J.; OCSOVSZKI, I.; FALKAY, G. Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. **In Vivo**, v. 23, pp. 41-48, 2009.