



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl.
(Menispermaceae)

JOÃO PESSOA
2020

NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

**Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl.
(Menispermaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de MESTRE em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
COORIENTADORA: Profa. Dra. Ivana Maria Fachine

JOÃO PESSOA
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

L732c Lima, Natanael Teles Ramos de.

Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos*
sympodialis Eichl. (Menispermaceae) / Natanael Teles
Ramos de Lima. - João Pessoa, 2020.
135 f. : il.

Orientação: José Maria Barbosa Filho.

Coorientação: Ivana Maria Fachine.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Milona. 2. *Cissampelos*. 3. Flavonoides. 4. Docking.
5. Topoisomerase. 6. Citotoxicidade. I. Barbosa Filho,
José Maria. II. Fachine, Ivana Maria. III. Título.

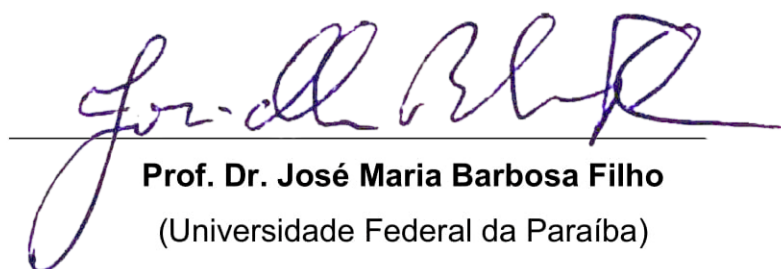
UFPB/BC

NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

**Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl.
(Menispermaceae)**

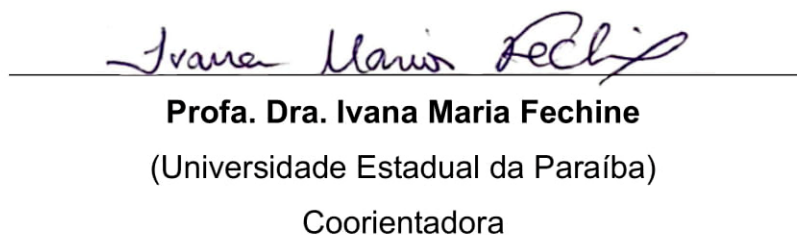
Dissertação aprovada em 14/02/2020.

BANCA EXAMINADORA



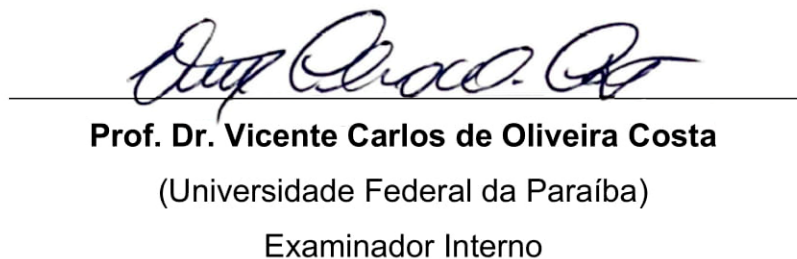
Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
(Universidade Federal da Paraíba)

Orientador



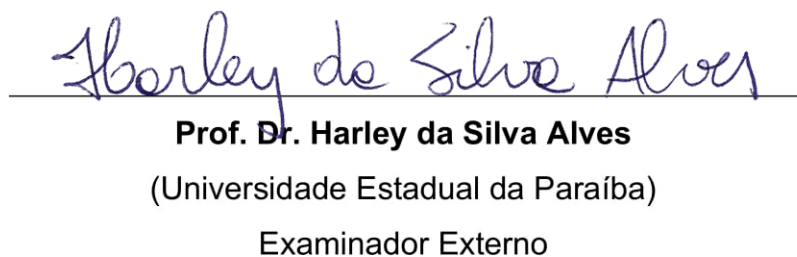
Profa. Dra. Ivana Maria Fechine
(Universidade Estadual da Paraíba)

Coorientadora



Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno



Prof. Dr. Harley da Silva Alves
(Universidade Estadual da Paraíba)

Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Divino por me guiar pelo caminho do bem, me aparar e permitir que chegasse até o final desta etapa.

Aos meus pais, **Maria Helena Teles** e **Antônio Neto de Lima**, por todo o amor, carinho, dedicação e sacrifícios, é um privilégio ter vocês comigo. Nada que eu faça vai ser suficiente para agradecer e retribuir tudo que fazem e fizeram por mim.

Aos meus irmãos, **Alik Teles** e **Rafael Teles**, meus parceiros pra vida.

À minha **tia Meire Teles**, por todo o carinho e por fazer minhas viagens ao Ceará melhores.

À **Universidade Federal da Paraíba**, ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**.

Ao meu orientador Prof. Dr. **José Maria Barbosa Filho**, por ter me aceitado como orientando, pelas oportunidades, ensinamentos, mas principalmente por ser uma inspiração como ser humano, professor e pesquisador.

À minha coorientadora, Profa. Dra. **Ivana Maria Fechine**, por ter me dado a oportunidade de adentrar no mundo da Fitoquímica.

Aos professores doutores **Josean Fechine** e **Marcelo Sobral** por todo o conhecimento repassado e ajuda na pesquisa.

Ao Dr. **Vicente Carlos** por compor a banca, me motivar a continuar no mundo da pesquisa e pela ajuda diária.

Ao Prof. Dr. **Harley da Silva** por fazer parte da banca e desde cedo ser um dos exemplos na área da Fitoquímica.

Aos técnicos do laboratório, **Marcelo** e **Evandro**, pela ajuda com os espectros de RMN e também pelos ensinamentos no cotidiano.

Ao técnico **Raimundo Nonato**, pela amizade e por estar sempre disposto a ajudar, fazendo os dias no laboratório melhores.

À professora **Marianna Vieira Sobral**, **Valgrícia Sousa**, **Camyla Caroliny**, **Ana Luiza de Oliveira** e **Rawny Galdino** do ONCOFAR, que auxiliaram com a realização dos ensaios de citotoxicidade.

À **toda a equipe** do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise – LMCA, todos, em algum ponto, ajudaram na elaboração da pesquisa e da dissertação.

Aos meus amigos de infância **Alana, Anderson, Bruno, Eliab, Felipe, Ilana, Ítalo e LÍlian**, amizades que quero comigo por mais 18 anos, e além.

À **Sonaly Albino** pela amizade e ajuda com os experimentos de *docking*.

À **Natalia Ferreira** pela amizade, por ser imensamente prestativa e por todo auxílio direto e indireto, acadêmico ou não. E à **Mayara dos Santos** pela disponibilidade e boa vontade de contribuir na interpretação do *docking*.

A **Alisson Farias** pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

À **Isabela Motta** aos anos de amizade, pelo ombro amigo, todas as preocupações, apoio e toda a ajuda dentro e fora do mundo acadêmico.

À **Thays Thyara**, por ser essa grande amiga! Agradeço por todo apoio, conselhos e irmandade. Por todos os momentos!

Aos meus amigos que conheci ao chegar em João Pessoa, que se tornaram minha família na cidade: **Vivian Santos** por todas as conversas, todo o suporte, conselhos e orientação espiritual. Você é um ser de luz! A **Erick Bernard** pela amizade e bons momentos compartilhados. E a **Diego Oliveira** pela amizade e pelo convívio.

Agradeço a todos que contribuíram, direta e indiretamente, com a elaboração do trabalho e para o meu bem-estar.

Muito obrigado!

“Tudo começa num ponto.”

Wassily Kandinsky

RESUMO

Cissampelos sympodialis Eichl., conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “abuteira” e “orelha-de-onça”, é rica em alcaloides e tem uso tradicional no tratamento de asma, bronquite, reumatismo e artrite. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi contribuir com o conhecimento químico e farmacológico da espécie, por meio de isolamento de substâncias, espectrometria de massas, estudos *in silico* e ensaios biológicos. As partes aéreas foram coletadas no horto do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IpeFarM da UFPB e uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier sob registro AGRA 1476 e no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob código A9B2EFC. Após a coleta, secagem e trituração foi feita a extração com etanol 95% e em seguida o solvente foi concentrado em rotevaporador, sendo obtido o Extrato Etanólico Bruto (EEB). O EEB foi particionado usando hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fase hidrometanólica foi submetida à cromatografia em coluna aberta usando Sephadex-LH 20, resultando na fração CsFHM 6-7 que foi processada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparativa. Foi realizada uma marcha para alcaloides a fim de obter a Fração de Alcaloides Totais (FAT). Os compostos isolados foram identificados através de Espectrometria de massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e comparação com a literatura. Foi realizado um estudo de *docking* molecular de alcaloides já isolados da milona: laurifolina, milonina, warifteina, metilwarifteina, roraimina, des-7'-O-metilroraimina e epi-des-7'-O-metilroraimina; para avaliar suas interações com a Topoisomerase II α e com o DNA. Realizou-se um ensaio de MTT com amostras de *C. sympodialis* em células câncer de mama, melanoma humano, carcinoma de cólon, adenocarcinoma cervical e em células normais de queratinócitos humanos. A CLAE preparativa permitiu o isolamento de 4 substâncias: o nucleosídeo adenosina e três flavonoides, a vicenina-2, a quercetina-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo e o canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo. Além disso, com auxílio de dados da literatura, foram identificados mais 10 compostos por CLAE-EM: ácido cafeico-hexosídeo, salsolinol, guanosina, ácido siríngico-O-hexosídeo, magnoflorina, álcool benzílico-hexose-pentose, aromadendrina-hexosídeo, apigenina-6-C-glicosídeo, isoquercetina e astragalina. O *docking* apontou que dentre os alcaloides da milona, a roraimina é a que melhor interage com a Topoisomerase II α e com o DNA e a des-7'-O-metilroraimina é melhor como ligante de DNA. O ensaio de MTT indicou que o EEB possui atividade inibitória de células de câncer de cólon e de mama e a FAT foi capaz de inibir fortemente o crescimento de todas linhagens testadas, embora tenha apresentação ação contra células normais. O teste também demonstrou que os flavonoides glicosilados não possuem atividade contra as linhagens testadas. Conclui-se que a milona tem potencial atividade antitumoral e que eventualmente pode ser usada como complemento no tratamento do câncer, além de teoricamente possuir compostos químicos que podem se tornar fármacos atuantes contra neoplasias.

Palavras-chaves: Milona; *Cissampelos*; flavonoides; *docking*; topoisomerase; citotoxicidade.

LIMA, N.T.R. Contribution to the phytochemical knowledge of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). 2020. 135 f. Master's Thesis (Master's Degree in Natural and Synthetic Bioactive Products) – Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba. João Pessoa, 2020.

ABSTRACT

Cissampelos sympodialis Eichl., popularly known as “milona”, “jarrinha”, “abuteira” and “orelha-de-onça”, it is a species rich in alkaloids and has traditional use in the treatment of asthma, bronchitis, rheumatism and arthritis. Thus, the objective of this work was to contribute to the chemical and pharmacological knowledge of the species, through the isolation of substances, mass spectrometry, in silico studies and biological tests. The aerial parts were collected in the garden of UFPB's Research Institute for Drugs and Medicines – IpeFarM and an exsiccate is deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier under AGRA 1476 registration and in the National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under the code A9B2EFC. After harvest, drying and grinding, extraction was performed with 95% ethanol and then the solvent was concentrated in a rotary evaporator, obtaining the Crude Ethanol Extract (CEE). The CEE was partitioned using hexane, chloroform and ethyl acetate. The hydromethanolic phase was subjected to open column chromatography using Sephadex-LH 20, resulting in the CsFHM 6-7 fraction that was processed by preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC). An alkaloids march was performed to obtain the Alkaloid Rich Fraction (ARF). The isolated compounds were identified using Mass spectrometry (MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and comparison with the literature. A molecular docking study was carried out on alkaloids already isolated from milona: laurifolin, milonine, warifteina, methylwarifteina, roraimina, des-7'-O-methylroraimina and epi-des-7'-O-methylroraimina; to evaluate their interactions with Topoisomerase II α and DNA. An MTT assay was performed with samples of *C. sympodialis* in breast cancer cells, human melanoma, colon carcinoma, cervical adenocarcinoma and in normal human keratinocyte cells. The preparative HPLC allowed the isolation of 4 substances: the nucleoside adenosine and three flavonoids, vicianin-2, quercetin-3-O- β -glycopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopyranoside and canferol-3-O- β -glycopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopyranoside. In addition, from the literature, 10 more compounds were identified by LC-MS: caffeic acid-hexoside, salsolinol, guanosine, syringic acid-O-hexoside, magnoflorin, benzyl alcohol-hexose-pentose, aromadendrine-hexoside, apigenin-6-C-glycoside, isoquercetin and astragalin. The docking pointed out that among milona alkaloids, roraimine is the one that best interacts with Topoisomerase II α and with DNA and des-7'-O-methylroraimine is the best as a DNA ligand. The MTT assay indicated that CEE has inhibitory activity in colon and breast cancer cells and ARF was able to strongly inhibit the growth of all tested strains, although it has an action against normal cells. The test also demonstrated that the glycosylated flavonoids have no activity against the tested cell lines. It is concluded that milona has potential antitumor activity and that it can eventually be used as a complement in the treatment of cancer, in addition to theoretically having chemical compounds that can become active drugs against neoplasms.

Keywords: Milona; *Cissampelos*; flavonoids; docking; topoisomerase; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Disitribuição geográfica da família Menispermaceae.	25
Figura 2 – Distribuição de algumas espécies de <i>Cissampelos</i> . (a) <i>Cissampelos pareira</i> ; (b) <i>Cissampelos ovalifolia</i> e <i>Cissampelos owariensis</i> ; (c) <i>Cissampelos sympodialis</i> , <i>Cissampelos mucronata</i> e <i>Cissampelos capensis</i>	26
Figura 3 – Principais esqueletos de alcaloides encontrados em <i>Cissampelos</i> L.	27
Figura 4 – <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichler: Planta adulta (A); Detalhe das folhas deltoides (B).	31
Figura 5 – Biossíntese dos flavonoides.	38
Figura 6 – Esqueletos estruturais de flavonoides.	39
Figura 7 – Posições comuns de glicosilação em flavonoides.	41
Figura 8 – Principais núcleos fundamentais dos alcaloides e aminoácidos precursores.	43
Figura 9 – Topoisomerases I (esquerda) e II (direita), com cadeia A em azul na Topo I e cadeia A em turquesa e cadeia B em vermelho na Topo II, com DNA em amarelo.....	46
Figura 10 – Modos de ligação ao DNA. Ligação ao sulco maior (A), ligação ao sulco menor (B), intercalação (C).	48
Figura 11 – Procedimento geral de <i>docking</i> molecular.	50
Figura 12 – Demonstração de mapa de grades.	52
Figura 13 – Cromatograma da fração CsFHM 6-7 em CLAE preparativo.	58
Figura 14 – Estrutura da adenosina.	65
Figura 15 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-1.	66
Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.	67
Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.	67
Figura 18 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 2,8 – 8,8 ppm.	68
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 3,1 – 6,1 ppm.	68
Figura 20 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.	69
Figura 21 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 3,0 – 6,0 ppm x 45,0 – 95,0 ppm.	69

Figura 22 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-1.	70
Figura 23 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-1 na região de 9,0 – 5,5 ppm x 60,0 – 160,0 ppm.	70
Figura 24 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-1 na região de 7,0 – 8,7 ppm x 110,0 – 160,0 ppm.	71
Figura 25 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-2.	72
Figura 26 – Perfil de fragmentação de Cs-2 por CLAE-EM-ESI em EM ³	74
Figura 27 – Proposta de fragmentação da vicenina-2 no modo negativo (Silva et al., 2014).	75
Figura 28 – Estrutura da vicenina-2.	76
Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-2.	77
Figura 30 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-2 na região de 6,0 – 14,5 ppm.	77
Figura 31 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-2 na região de 2,6 – 5,6 ppm.	78
Figura 32 – Proposta de fragmentação da vicenina-2 (593 [M-H] ⁻) no modo negativo.	79
Figura 33 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-3.	80
Figura 34 – Estrutura da quercetina-3-O- β -glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo.	82
Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3.	84
Figura 36 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 60,0 – 180,0 ppm.	84
Figura 37 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 95,0 – 180,0 ppm.	85
Figura 38 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 60, 0 – 107,0 ppm.	85
Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3.	86
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 5,8 – 7,8 ppm.	86
Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 4,0 – 5,7 ppm.	87
Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 2,70 – 4,00 ppm.	87

Figura 43 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3.	88
Figura 44 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 4,0 – 8,0 ppm x 90,0 – 125,0 ppm.	88
Figura 45 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 2,55 – 4,5 ppm x 50,0 – 80,0 ppm.	89
Figura 46 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3.	89
Figura 47 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 5,0 – 8,5 ppm x 90,0 – 165,0 ppm.	90
Figura 48 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, DMSO- d_6) de Cs-3 na região de 2,5 – 4,5 ppm x 60,0 – 110,0 ppm.	90
Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-4.	91
Figura 50 – Estrutura da canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo.	93
Figura 51 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4.	95
Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 57,0 – 180,0 ppm.	95
Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 97,0 – 180,0 ppm.	96
Figura 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 56,0 – 108,0 ppm.	96
Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4.	97
Figura 56 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 6,0 – 8,5 ppm.	97
Figura 57 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 2,6 – 5,5 ppm.	98
Figura 58 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 2,65 – 4,00 ppm.	98
Figura 59 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4.	99
Figura 60 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 4,0 – 8,5 ppm x 80,0 – 140,0 ppm.	99
Figura 61 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 2,5 – 4,2 ppm x 50,0 – 85,0 ppm.	100

Figura 62 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4.	100
Figura 63 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 5,0 – 9,0 ppm x 90,0 – 180,0 ppm.	101
Figura 64 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de Cs-4 na região de 2,5 – 9,0 ppm x 55,0 – 140,0 ppm.	101
Figura 65 – Cromatograma (BPC) da fração CFTS-1 no modo positivo (A) e no modo negativo (B).	103
Figura 66 – Proposta de substâncias presentes na fração CsFHM 6-7 identificadas por CL-EM/EM.	107
Figura 67 – Sobreposição do etoposídeo (em amarelo) redocado e co-cristalizado (em cinza).	109
Figura 68 – <i>Docking</i> molecular do etoposídeo (A) e roraimina (B) com Topo II α /DNA em 2D.	112
Figura 69 – <i>Docking</i> molecular da Des-7'-O-metilroraimina (A), metilwarifteína (B), roraimina (C) e epi-des-7'-O-metilroraimina (D) com Topo II α /DNA em 2D.	113
Figura 70 – Interação da laurifolina com o B-DNA.	115
Figura 71 – Interação da des-7'-O-metilroraimina com o B-DNA.	115

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fracionamento do EEB das partes aéreas de <i>C. sympodialis</i>	55
Esquema 2 – Extração ácido-base do EEB das partes aéreas de <i>C. sympodialis</i>	56
Esquema 3 – Frações obtidas da CC Sephadex LH-20.	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias não-alcalóidicas isoladas de <i>Cissampelos</i> L.	28
Quadro 2 – Classificação taxonômica de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	32
Quadro 3 – Alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Método processamento da CsFHM 6-7.	58
Tabela 2 – Dados de RMN (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) de Cs-1 comparados com os da literatura (CIUFFREDA; CASATI; MANZOCCHI, 2007).	66
Tabela 3 – Dados de RMN ^1H (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Cs-2 em comparação com a literatura.	73
Tabela 4 – Dados de RMN (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) de Cs-3 comparados com da literatura (NAWWAR; EL-MOUSALLAMY; BARAKAT, 1989).	83
Tabela 5 – Dados de RMN (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) de Cs-4 comparados com a literatura.	94
Tabela 6 – Dados de fragmentação de substâncias identificadas em CsFHM 6-7 por LC-EM. A enumeração é referente aos picos enumerados na Figura 66.	106
Tabela 7 – Dados de <i>redocking</i> da Topoisomerase II α (5GWK).	108
Tabela 8 – <i>Docking</i> molecular dos alcaloides para TopoII α /DNA (PDB ID: 5GWK) e o B-DNA (PDB ID: 1BNA).	110
Tabela 9 – Inibição do crescimento de células pelo EEB (extrato etanólico bruto), FAT (fração de alcaloides totais), vicenina-2 (Cs-2) e canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo (Cs-4).	117
Tabela 10 – Inibição do crescimento em células não-tumorais (HaCat).	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ADT	<i>AutoDock Tools</i>
AG	Algoritmo genético
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografia em coluna
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM/EM	Cromatografia líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massa em tandem
CL-RMN	Cromatografia líquida acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
CsFHM 6-7	Reunião das frações 6 e 7 da CC da fase hidrometanólica
<i>d</i>	Dubleto
Da	Daltons
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPTQ	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de massa
FAT	Fração de alcaloides totais
FAcOEt	Fase acetato de etila
FAq	Fase Aquosa
FC	Fase clorofórmica
FHex	Fase Hexânica
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IES	Ionização por electrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
<i>m</i>	Múltiplo

nm	Nanômetro
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
s	Simpleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sh	Shoulder
s/	Simpleto Largo
UDP	Difosfato de uridina
UFGT	UDP-glicose-flavonoide-O-glicotransferase
uHPLC-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada espectrometria de massa
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
3.1. Considerações sobre a família Menispermaceae Juss.	24
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Cissampelos</i> L.....	25
3.3. Considerações sobre a espécie <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	31
3.4. Considerações sobre flavonoides	37
3.4.1. Flavonoides glicosilados.....	40
3.5. Considerações sobre alcaloides.....	41
3.5.1. Alcaloides isoquinolínicos.....	44
3.6. Considerações sobre o câncer, Topoisomerase e DNA.....	44
3.6.1. Topoisomerasas.....	45
3.6.2. DNA	47
3.7. Estudos <i>in silico</i>	48
3.7.1. <i>Docking</i> molecular	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1. Material vegetal	54
4.2. Processamento do material vegetal e obtenção do extrato etanólico bruto.	54
4.3. Fracionamento do extrato etanólico bruto.....	54
4.4. Marcha para alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	55
4.5. Fracionamento cromatográfico da Fração Hidrometanólica (FHM)	56
4.6. Análise das frações por CLAE analítico	57
4.7. Processamento cromatográfico da CsFHM 6-7 por CLAE preparativo.....	57
4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados.....	58
4.9. Espectrometria de massas (EM)	59
4.9.1. Análise da fração CsFHM 6-7 por CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)	59
4.9.2. Espectrometria de massas de alta resolução	60
4.10. Estudo <i>in silico</i> de alcaloides relatados em <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	60
4.11. Ensaio de citotoxicidade	61

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Identificação estrutural dos compostos isolados	64
5.1.1. Identificação estrutural de Cs-1	64
5.1.2. Identificação estrutural de Cs-2	72
5.1.3. Identificação estrutural de Cs-3	80
5.1.4. Identificação estrutural de Cs-4	91
5.2. Identificação de outros compostos da CsFHM 6-7 por CLAE-EM³	102
5.3. Docking molecular	108
5.3.1. <i>Re-docking</i>	108
5.3.2. <i>Docking</i> molecular dos alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. para Topoisomerase II α	109
5.3.3. <i>Docking</i> molecular dos alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. para DNA.	114
5.4. Teste de citotoxicidade.....	116
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
REFERÊNCIAS	122



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos usados no tratamento de doenças. A busca por novos compostos mais eficazes e com menos efeitos colaterais as tornou foco de estudos graças a sua diversidade química, biológica e, conseqüentemente, abundância de compostos com atividades farmacológicas promissoras (RIBEIRO et al., 2018).

O Brasil é privilegiado pois detém uma extensa biodiversidade, dividida em seis domínios fitogeográficos: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal e a Caatinga. Estão distribuídas neles, mais 45 mil espécies de plantas, compreendendo de 20 a 22% das espécies do planeta (STEHMANN; SOBRAL, 2017; RIBEIRO et al., 2018).

A caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro detentor de uma grande diversidade de espécies. É um ecossistema formado por cerca de 4.322 espécies de plantas com sementes das quais 17,2% são endêmicas da região; essa variedade biológica é extensamente conhecida e utilizada na medicina popular, dando margem ao incentivo à pesquisa de espécies que existem apenas nesse bioma (FORZZA et al., 2012; CORDEIRO; FÉLIX, 2014; SANTOS et al., 2018).

Uma das espécies encontradas na caatinga é *Cissampelos sympodialis* Eichl., Menispermaceae, endêmica do Brasil e encontrada principalmente na região Nordeste, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe, embora também ocorra no Acre e Minas Gerais. É conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira”, e mesmo sendo bastante distribuída pelo Nordeste, existem poucos relatos do seu uso medicinal pela população. Um dos exemplos é o uso da infusão das folhas como tratamento de doenças respiratórias como asma e bronquite, e seu uso contra artrite e reumatismo (CAVALCANTI et al., 2013; BRAGA, 2015).

Inúmeros estudos já foram realizados com o extrato, fases e compostos isolados de *C. sympodialis*. Visto que é uma planta encontrada somente no território brasileiro, é importante o conhecimento profundo e completo da espécie, a fim de esclarecer ao máximo sua constituição química e suas potencialidades farmacológicas. O presente trabalho visa dar continuidade a esses estudos e contribuir com o conhecimento acerca da milona, por meio de isolamento de compostos por técnicas cromatográficas, estudos *in silico* e ensaios biológicos.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir ao conhecimento fitoquímico e farmacológico da espécie *Cissampelos sympodialis* Eichl.

2.2. Objetivos específicos

- Fracionar, por meio de técnicas clássicas (coluna aberta) e técnicas modernas (CLAE preparativa), o extrato etanólico bruto de *Cissampelos sympodialis* Eichl. para isolamento de constituintes químicos;
- Proceder com a extração em meio ácido do EEB para obtenção da FAT;
- Proceder com o estudo fitoquímico de compostos da fase hidrometanólica mediante isolamento e identificação por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrométricas (Espectrometria de Massas);
- Realizar um estudo *in silico* (*docking* molecular) de alcaloides previamente isolados de *C. sympodialis*;
- Disponibilizar extratos, fases, frações e compostos isolados para estudos em ensaios de citotoxicidade.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

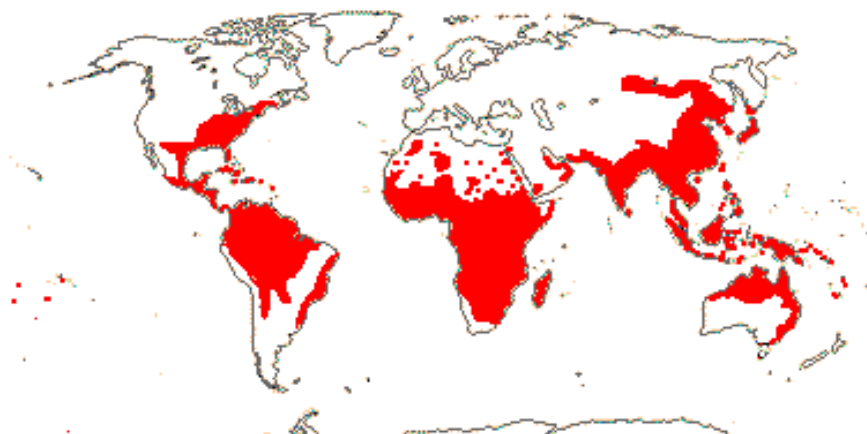
3.1. Considerações sobre a família Menispermaceae Juss.

Menispermaceae é uma família de distribuição pantropical, englobando aproximadamente 500 espécies em 70 gêneros. É uma família bem difundida no Brasil, ocorrendo em todos os estados e encontrada nos principais domínios fitogeográficos do país: Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal; no território brasileiro são encontradas 108 espécies, sendo 29 endêmicas, distribuídas em 15 gêneros, com dois representantes de caráter endêmico (BRAGA, 2015; LIMA; TEIXEIRA, 2018).

Os indivíduos dessa família são basicamente lianas (poucas árvores, arbustos ou ervas), lenhosas ou herbáceas, de folhas alternas, simples, inteiras ou lobadas, cartáceas ou coriáceas. As inflorescências variam entre racemos, espigas, cimeiras ou panículas, sendo auxiliares ou muitas vezes caulifloras, possuindo menos flores as plantas femininas. As flores são pequenas, unissexuais, comumente trímeras, esverdeadas, esbranquiçadas, amareladas, marrons ou raramente rosadas, sendo as flores masculinas e femininas de tamanhos diferentes. Os frutos são drupas com mesocarpo carnoso ou fibroso, o endocarpo é lenhoso e por fora rugoso; alguns frutos podem ser consumidos por humanos (*Curarea toxicofera* e *Abuta grandifolia*) (OTT, 1997).

Menispermaceae é quimicamente e farmacologicamente conhecida pela presença de compostos ativos usados para preparação do “curare”, um veneno usado por tribos indígenas da Amazônia. Os compostos presentes em Menispermaceae são alcaloides de diversos tipos, sendo 22 diferentes classes desses compostos isoladas da família até 1997. Grande parte deles, são derivados de esqueletos benziltetrahidroisoquinolínicos, sendo os alcaloides bisbenzilisquinolínicos os mais comuns encontrados, seguido dos aporfínicos e protoberberínicos (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997; BARBOSA-FILHO; CUNHA; GRAY, 2000).

Figura 1 – Disitribuição geográfica da família Menispermaceae (em vermelho).



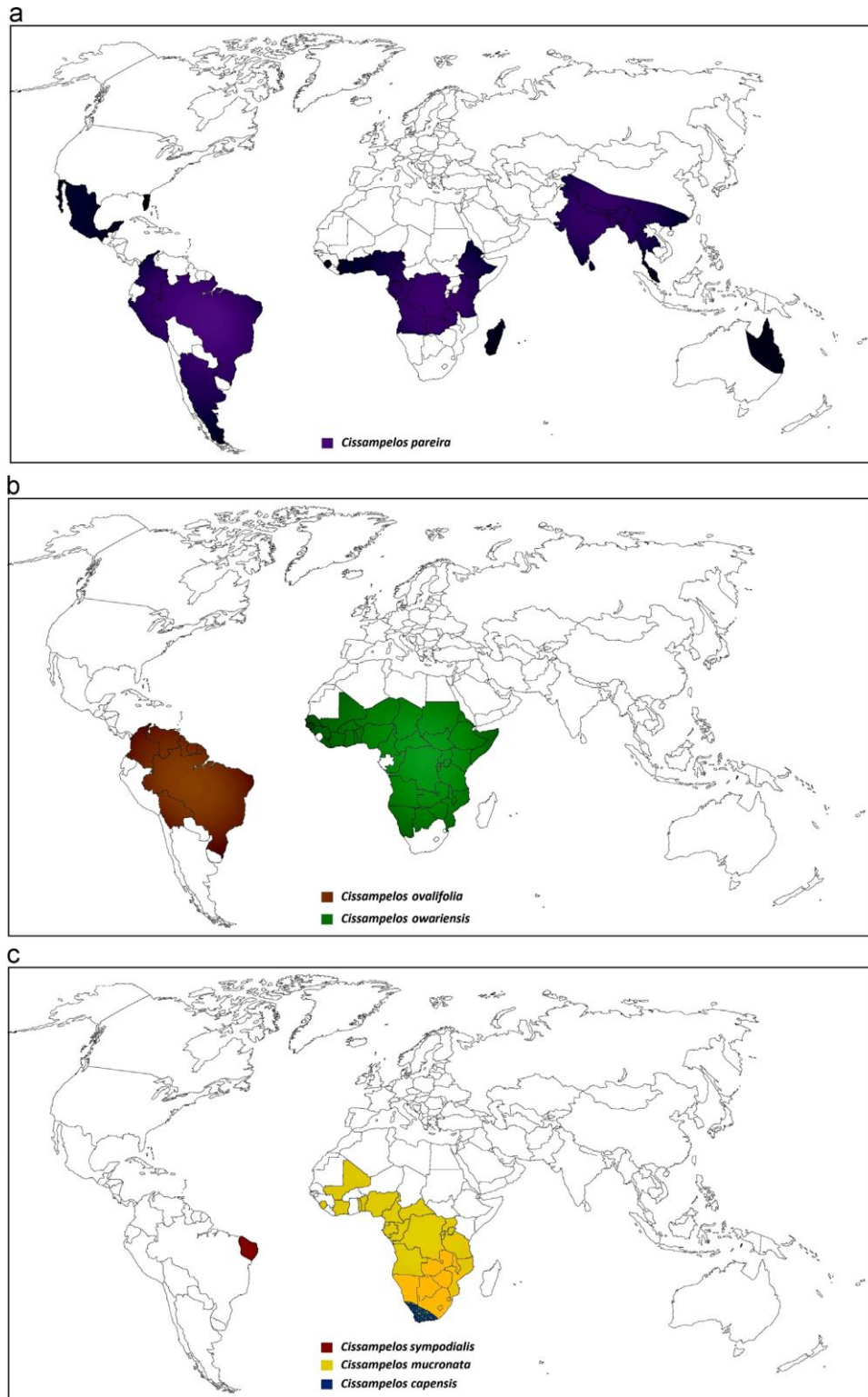
Fonte: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/ranunculalesweb.htm#Menispermaceae>> Acessado em jan. 2020.

3.2. Considerações sobre o gênero *Cissampelos* L.

Cissampelos L. é um dos maiores gêneros da família Menispermaceae, compreendendo 21 espécies, tendo representantes encontrados nas Américas, África, Ásia e ainda uma espécie, *C. parreira*, de distribuição pantropical (Figura 2) (RHODES, 1975; SEMWAL et al., 2014). O Brasil abriga dez dessas espécies, sendo cinco encontradas no Nordeste (*Cissampelos sympodialis* Eichl., *Cissampelos glaberrima* A.St-Hil., *Cissampelos ovalifolia* DC., *Cissampelos parreira* L. e *Cissampelos andromorpha* DC.). Dentre elas, *C. sympodialis* Eichl. é encontrada unicamente no território brasileiro (PORTO et al., 2011).

As plantas do gênero são geralmente trepadeiras herbáceas, apenas *C. ovalifolia* DC. é a única espécie arbustiva; as folhas são alternadas com nervuras actinódromas; o fruto é uma drupa, oboval; as flores chegam a no máximo 2 mm de comprimento, coloridas de amarelo a verde-claro; as flores femininas apresentam uma sépala, uma pétala e um carpelo com estigma trifido; já as flores masculinas apresentam quatro sépalas, uma pétala conada, quatro estames com filetes formando um sinandro (RHODES, 1975).

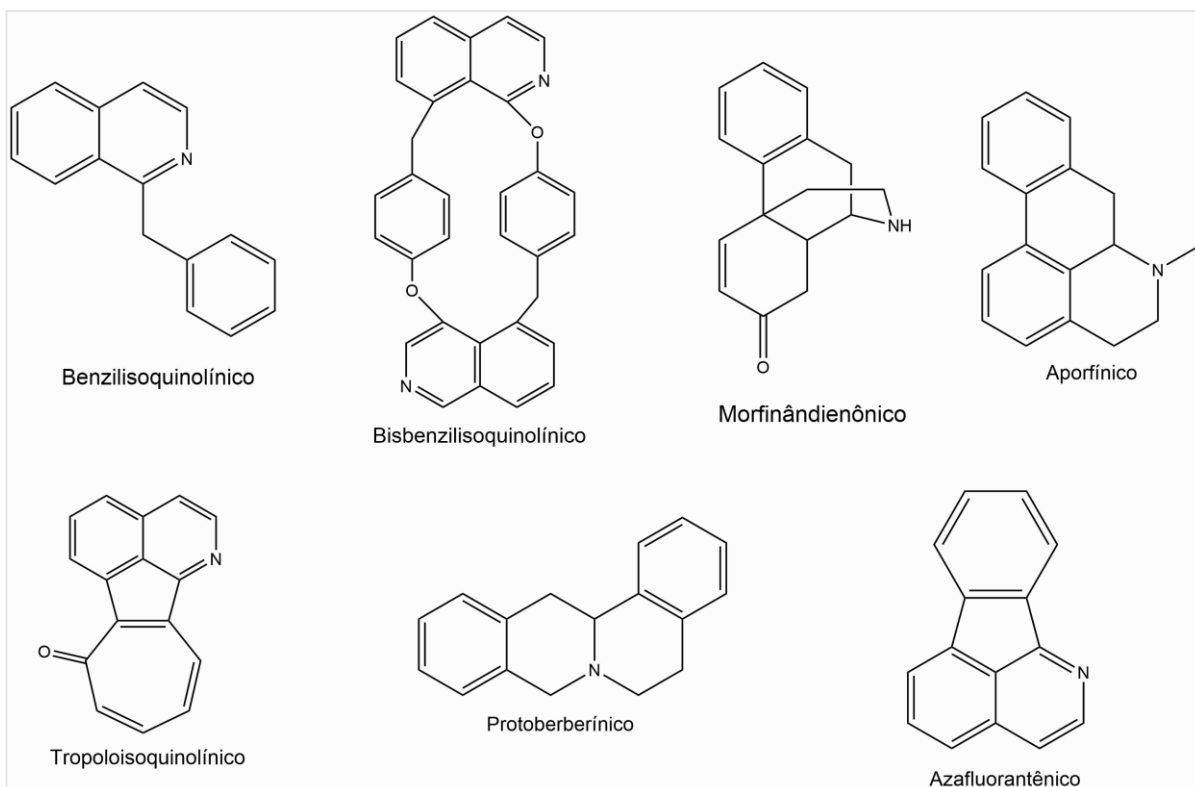
Figura 2 – Distribuição de algumas espécies de *Cissampelos*: (a) *Cissampelos pareira*; (b) *Cissampelos ovalifolia* e *Cissampelos owariensis*; (c) *Cissampelos sympodialis*, *Cissampelos mucronata* e *Cissampelos capensis*.



Fonte: SEMWAL et al., 2014.

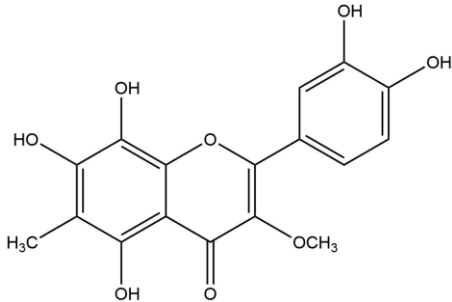
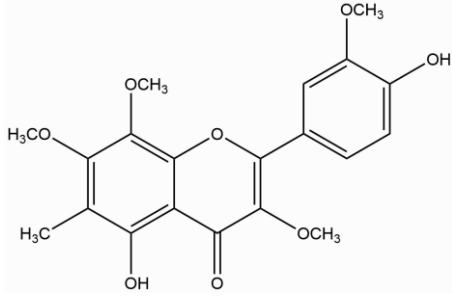
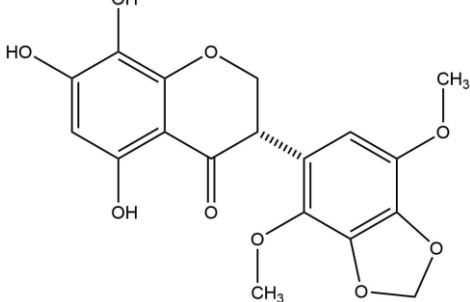
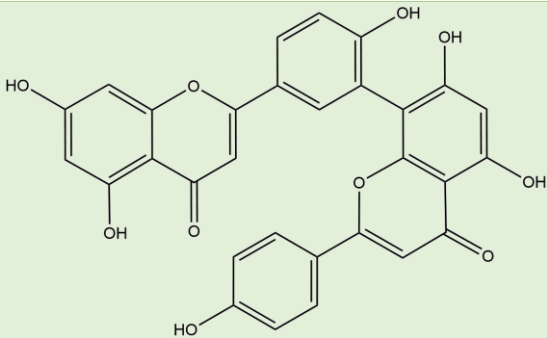
Representantes da família Menispermaceae, bem como do gênero *Cissampelos* L. são lembrados por produzirem variados tipos de alcaloides derivados do núcleo isoquinolínico. Esses compostos se apresentam em sete esqueletos diferentes: benzilisoquinolínico (BIQ); bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ); morfinândienônico (MORFIN); aporfínico (APORFIN); tropoloisoquinolínico (TROPOLI); tetrahidroprotoberberínico (PROTOB) e azafluorantênico (AZAFLU) (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997) (Figura 3). Apesar dos estudos fitoquímicos acerca do gênero serem geralmente concentrados na investigação dos compostos alcaloidicos, outras classes de substâncias já foram isoladas no gênero (Quadro 1).

Figura 3 – Principais esqueletos de alcaloides encontrados em *Cissampelos* L.

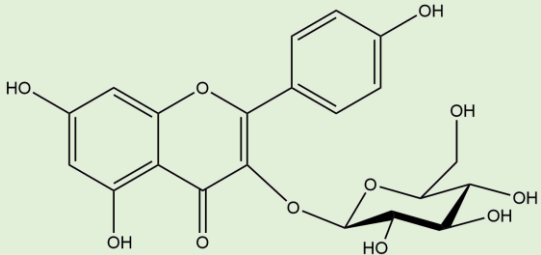
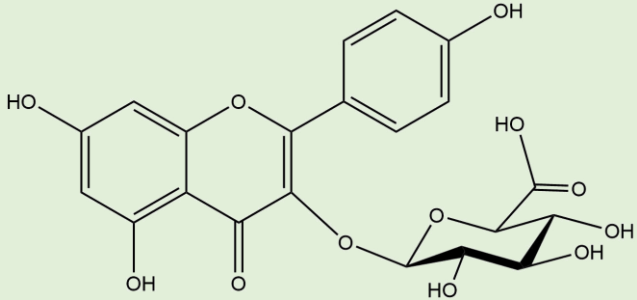
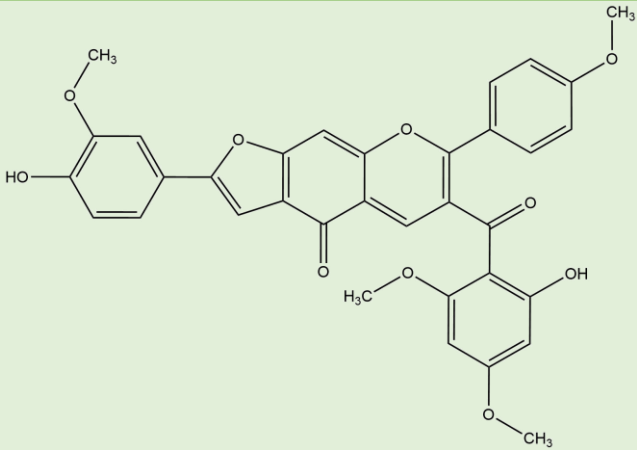
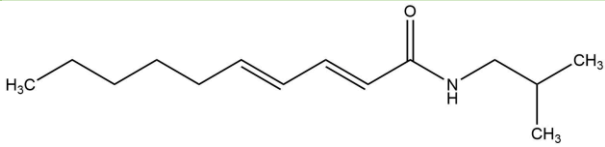
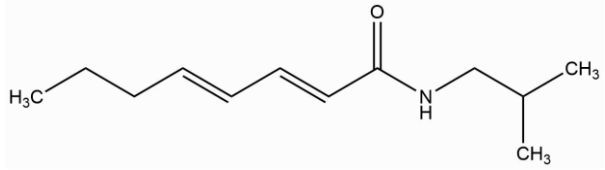


Fonte: Autor.

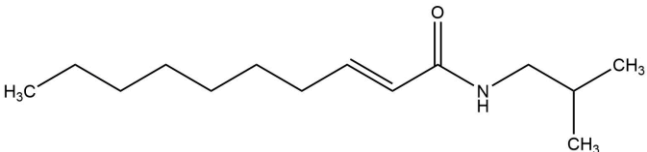
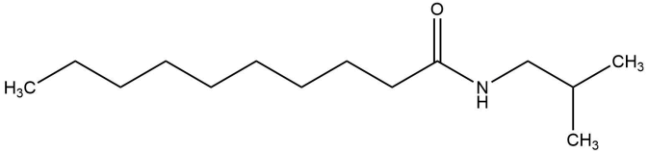
Quadro 1 – Substâncias não-alcalóidicas isoladas de *Cissampelos* L.

Substância	Espécie	Referência
 6-C-metilquercetina-3-éter-metil	<i>Cissampelos capensis</i> (Partes aéreas)	BABAJIDE; MABUSELA; GREEN, 2015.
 6-C-metilquercetina-3-3'-7-8-tetrametil éter	<i>Cissampelos capensis</i> (Partes aéreas)	BABAJIDE; MABUSELA; GREEN, 2015.
 5-7-8-trihidroxi-2'-5'-metoxi-3'-4'-metilenodioxisoflavona	<i>Cissampelos capensis</i> (Raízes)	BABAJIDE; MABUSELA; GREEN, 2015.
 Amentoflavona	<i>Cissampelos pareira</i> (Partes aéreas)	DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017.

(Continuação) **Quadro 1** – Substâncias não-alcalóidicas isoladas de *Cissampelos* L.

Substância	Espécie	Referência
 Canferol-3-β-glicopiranosídeo	<i>Cissampelos pareira</i> (Partes aéreas)	DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017.
 Canferol-3-β-glicoronopiranosídeo	<i>Cissampelos pareira</i> (Partes aéreas)	DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017.
 Cissampeloflavona	<i>Cissampelos pareira</i> (Partes aéreas)	RAMÍREZ et al., 2003.
 Ácido isobutilamida deca-2E,4E-dienoico	<i>Cissampelos glaberrima</i> (Raízes)	ROSARIO; SILVA; PARENTE, 1996.
 Ácido isobutilamida octa-2E,4E-dienoico		

(Continuação) **Quadro 1** – Substâncias não-alcalóidicas isoladas de *Cissampelos* L.

Substância	Espécie	Referência
 Ácido isobutilamida decen-2-oico	<i>Cissampelos glaberrima</i> (Raízes)	ROSARIO; SILVA; PARENTE, 1996.
 Ácido isobutilamida decanoico		

Estudos etnobotânicos demonstram que *Cissampelos* L. é o gênero de Menispermaceae com uso tradicional mais amplo e frequente na Ásia, América e África. Desde os tempos antigos, espécies de *Cissampelos* L. são usadas popularmente em diferentes países no tratamento de diversas doenças e sintomas, como: tosse, delírio, convulsões, febre, desordens gastrointestinais, gonorreia, picadas de cobra, asma, hemorragia uterina, malária, pneumonia, tumores, inflamações, infecções do trato urinário, sífilis, cólera, câncer de pele, queimaduras, uso contra vermes, entre outros (SEMWAL et al., 2014).

As raízes de espécies de *Cissampelos* são amplamente usadas por indígenas na tentativa de curar doenças cardíacas, genitais e urinárias e doenças respiratórias com resfriado e asma (CORNÉLIO et al., 1999). *C. pareira* é usada na Índia contra sintomas associados à menstruação e o balanço de hormônios na mulher; na Guiana como analgésico tópico (AMRESH; SINGH; RAO, 2008); no México é usada no tratamento de inflamações musculares, picadas de cobra, reumatismo e diarreia; no Brasil tem uso também contra sintomas menstruais, redução da febre, alívio da dor, cólicas, má digestão e constipação (SINGH et al., 2010). *Cissampelos capensis* é usada como purificador sanguíneo, contra cânceres de pele e estômago, diabetes e tuberculose (WET; HEERDEN; WYK, 2011). *C. mucronata* tem uso popular em diversas localidades na África no tratamento de feridas, “bicho de pé”, indigestão febre causada pela malária e esquistossomose (NONDO et al., 2011). *C. glaberrima* é utilizada no Brasil para doenças brônquicas, urinárias e picadas de animais peçonhentos (ROSARIO; SILVA; PARENTE, 1996; RODRIGUES; BARNES, 2013).

As raízes e cascas de *C. mucronata* e espécies relacionadas, *C. ovalifolia* e *C. pareira*, possuem relatos de uso na prevenção do aborto, alívio de dismenorreia, anti-helmíntico e sedativo (AKAH; NWAFOR, 1999).

3.3. Considerações sobre a espécie *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Cissampelos sympodialis Eichler (Figura 4), popularmente conhecida como “milona”, “jarrinha”, “abuteira” e “orelha-de-onça”, é uma trepadeira nativa e endêmica do Brasil, com ocorrência confirmada no Acre, Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais; geralmente apresenta-se em áreas abertas e solo argiloso, tendo suas folhas de formato deltoide como uma das principais formas de distinção entre outras espécies do gênero (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997; BRAGA, 2015).

Figura 4 – *Cissampelos sympodialis* Eichler: Planta adulta (A); Detalhe das folhas deltoides (B).



Fonte: Autor.

Porto e colaboradores (2008) descreveram as folhas da espécie da seguinte forma: alternas, pecioladas; lâmina 2,0-6,0 x 1,5-6,5 cm, oval a deltoide, glabra, margens inteiras, ápice obtuso a agudo, base truncada, discolor, face adaxial brilhante, verde-escuro, face abaxial opaca, verde-claro, nervuras do tipo actinódromo-broquidódromo, com 7-11 nervuras, proeminentes na face abaxial, e impressas na adaxial; pecíolo reto, peltado, excêntrico, 2,0-4,0 x 0,1-0,2 cm, cilíndrico, com ápice e base alargados e levemente curvados, pubérulo, tricomas simples, pluricelulares, unisseriados. Além da forma das folhas, o pecíolo espessado nas extremidades em conjunto com a anatomia da epiderme, e a ausência de sacos secretores são características diagnósticas para *Cissampelos sympodialis*.

Classificação taxonômica de *C. sympodialis* pode ser vista no Quadro 2.

Quadro 2 – Classificação taxonômica de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Reino	Plantae
Classe	Equisetopsidae
Sub-classe	Magnoliidae
Superordem	Ranunculanae
Ordem	Ranunculales Juss.
Família	Menispermaceae Juss.
Gênero	<i>Cissampelos</i> L.
Espécie	<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.

Fonte: tropicos.org

As folhas e raízes são utilizadas amplamente na medicina popular e indígena para o tratamento de inflamações, asma e outras desordens respiratórias, tosse e bronquite (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; CORRÊA; MELO; COSTA, 2008).

Extratos e substâncias isoladas de *C. sympodialis* já passaram por diversos estudos farmacológicos, os quais demonstraram atividades interessantes, entre elas: atividade relaxante do músculo liso (DE FREITAS et al., 1996), atividade anti-inflamatória, imunomodulatória, atividade contra asma em modelos animais (CAVALCANTI et al., 2013); ação antinociceptiva (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2011), ação antidepressiva (ALMEIDA et al., 1998; MENDONÇA-NETTO et al., 2008); efeitos

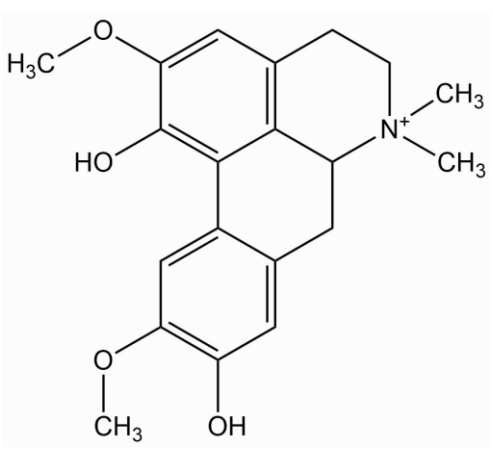
cardiovasculares (MEDEIROS et al., 1998) e efeitos contra psoríase (FEILY; NAMAZI, 2009).

Um *screening* fitoquímico dirigido por Cavalcanti et al. (2014) demonstrou a presença, nas folhas de *C. sympodialis*, de esteroides, flavonoides, cumarinas e saponinas, além de alcaloides que é classe mais relatada na literatura.

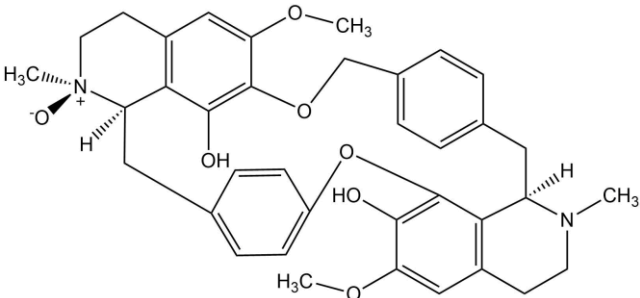
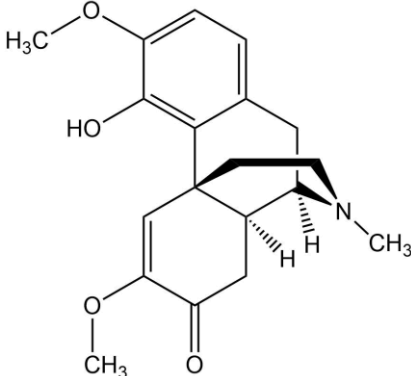
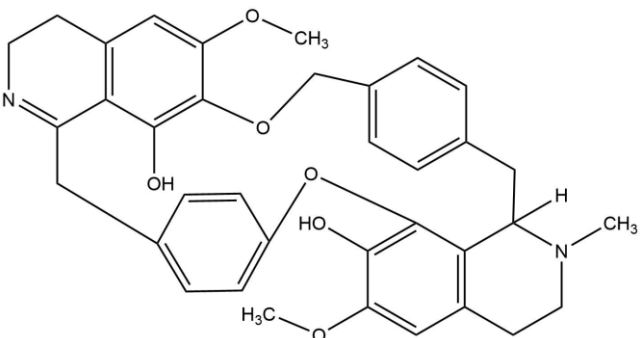
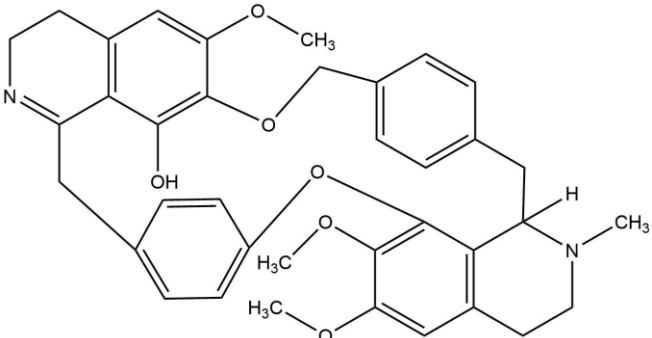
Alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, morfinâmico e aporfínico já foram isolados e identificados nas folhas e raízes da planta. Suas estruturas podem ser visualizadas no Quadro 3: laurifolina, simpodialina- β -N-óxido (ALENCAR, 1994), milonina (DE FREITAS et al., 1994), warifteína (CÔRTEZ et al., 1995), metil-warifteína (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997), coclaurina, liriodenina (LIRA, 2001), roraimina (LIRA et al., 2002), des-7'-O-metilroraimina e seu epímero epi-des-7'-O-metilroraimina (MARINHO et al., 2013), sousina (MEDEIROS, 2013) e fanostenina (CUNHA et al., 2015).

O composto que se apresenta em maior quantidade na milona é o alcaloide bisbenzilisoquilolínico warifteína, presente nas suas folhas e raízes, sendo 1,4% e 0,031% do peso do extrato etanólico bruto, respectivamente (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS et al., 1997).

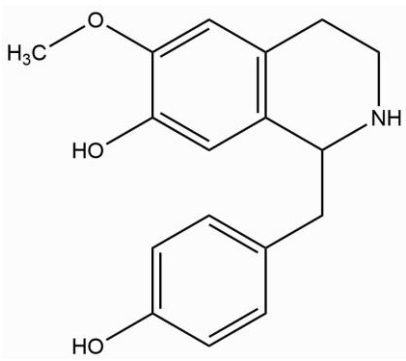
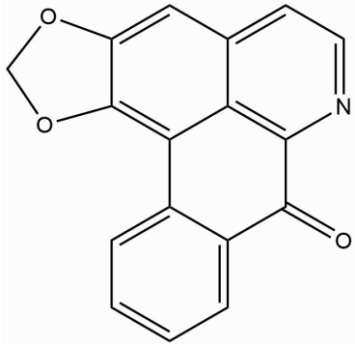
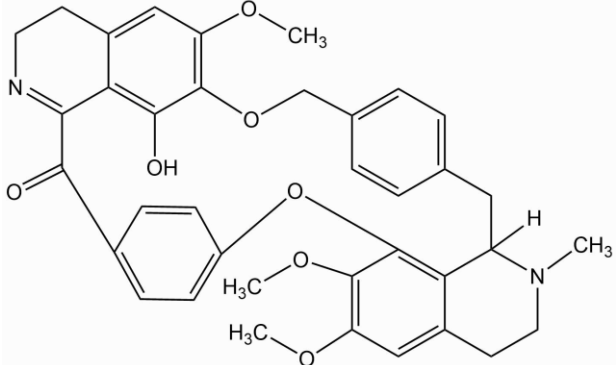
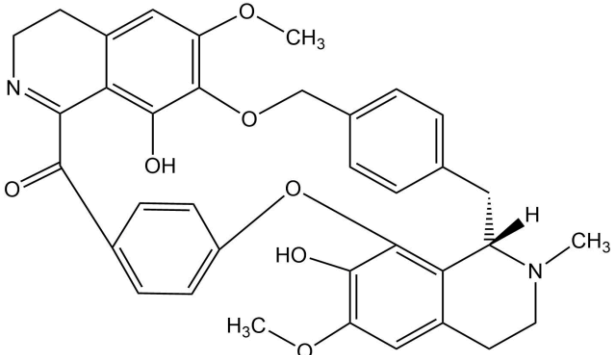
Quadro 3 – Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Alcaloide	Referência
 Laurifolina	ALENCAR, 1994.

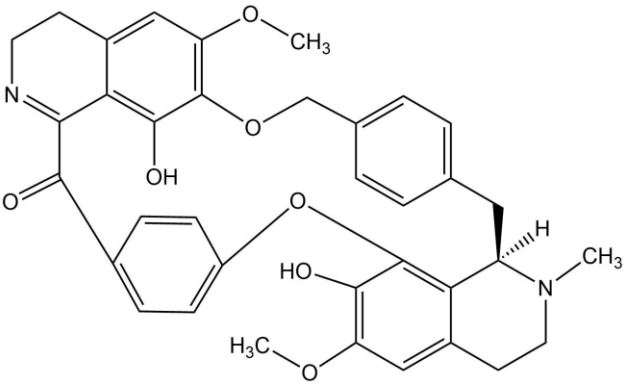
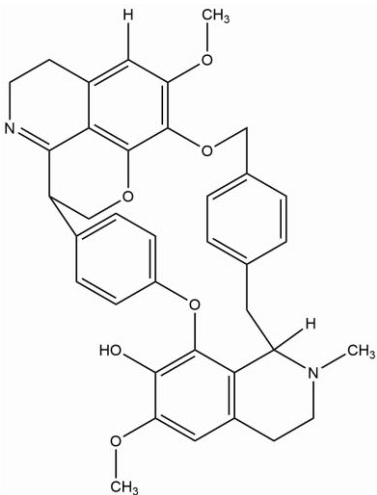
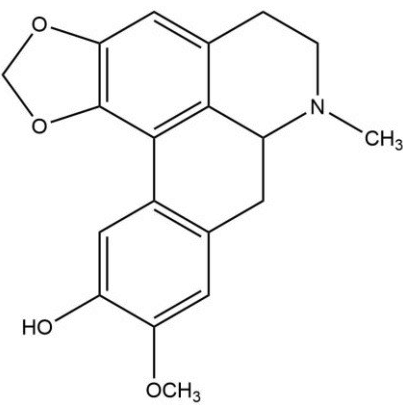
(Continuação) **Quadro 3** – Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Alcaloide	Referência
 Simpodialina-β-N-óxido	ALENCAR, 1994.
 Milonina	DE FREITAS, 1994.
 Warifteína	CÔRTES et al., 1995.
 Metilwarifteína	BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997.

(Continuação) **Quadro 3** – Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Alcaloide	Referência
 Cocclaurina	DE LIRA, 2001.
 Liriodenina	DE LIRA, 2001.
 Roraimina	DE LIRA et al., 2002.
 Des-7'-O-metilroraimina	MARINHO et al., 2013.

(Continuação) **Quadro 3** – Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Alcaloide	Referência
 Epi-des-7'-O-metilroraïmina	MARINHO et al., 2013.
 Sousina	MEDEIROS, 2013.
 Fanostenina	CUNHA et al., 2019.

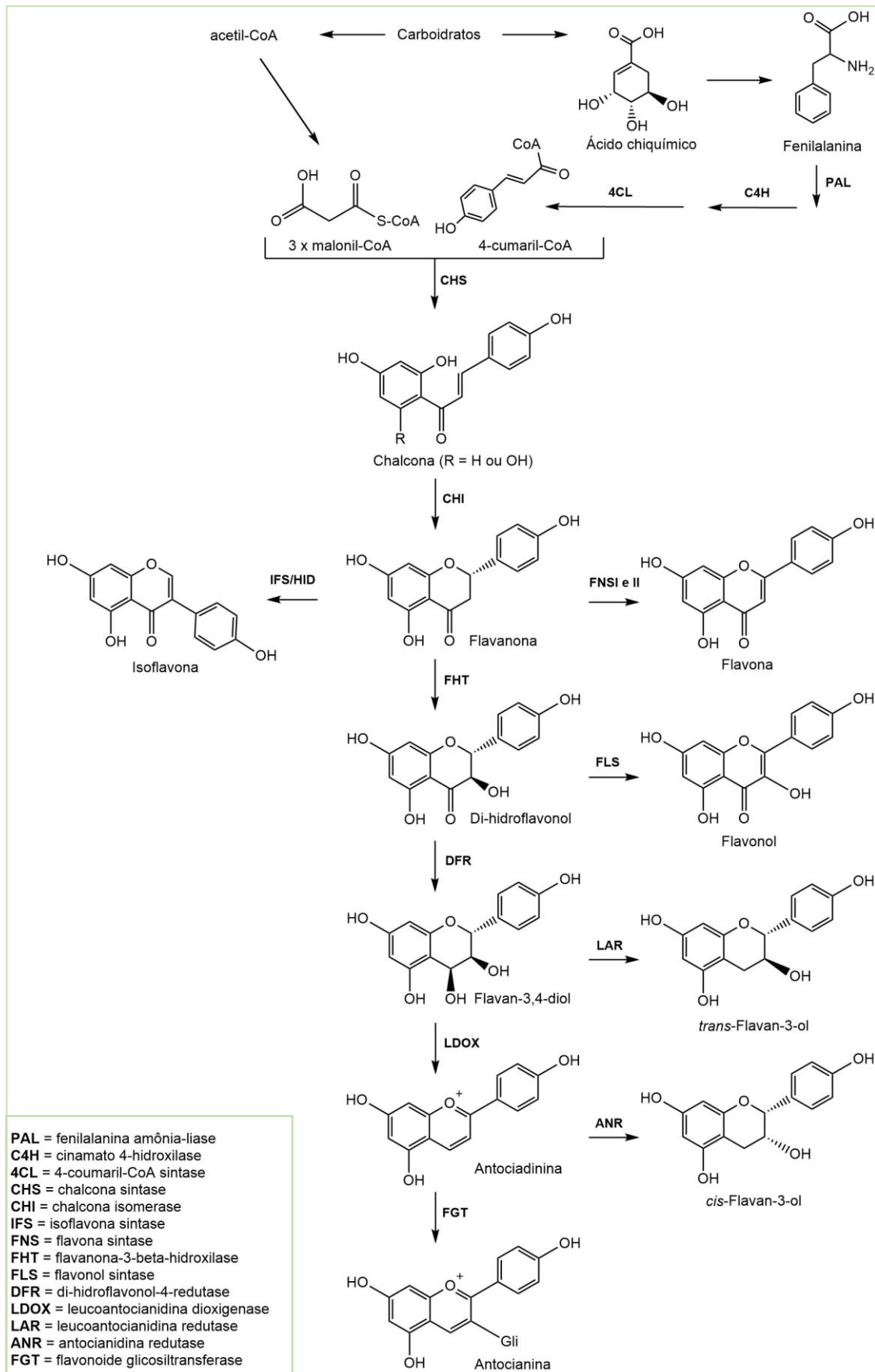
3.4. Considerações sobre flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides (acetato e ácido chiquímico), que passam por uma série de reações de condensação entre o ácido hidroxicinâmico e resíduos de malonil-CoA, resultando numa estrutura base C₆-C₃-C₆ (Figura 5, pág. 38). De modo geral, os flavonoides possuem 15 carbonos, sendo dois anéis benzênicos (aneis A e B) ligados a um anel pirano heterocíclico (anel C). De acordo com o grau de ciclização, insaturação e oxidação desses anéis, os flavonoides podem ser divididos numa variedade de grupos: flavonas, flavonois, flavanonas, flavanonois, isoflavonas, biflavonoides, neoflavonoides, chalconas, flavan-3-óis, auronas, antocianinas, catequinas e pterocarpanos (CUYCKENS; CLAEYS, 2003; KUMAR; PANDEY, 2013; FAGGIO et al., 2017). Na Figura 6 (pág. 39) podem ser vistas as estruturas das principais classes de flavonoides.

O número de flavonoides identificados vem crescendo com os passar dos anos, passando de 10000 estruturas já descritas. Essas diferentes moléculas desempenham diversas funções biológicas para o vegetal que as produzem, como: proteção contra radiação ultravioleta (UV), proteção contra patógenos e insetos, coloração das flores para atração de polinizadores, transporte de auxina (hormônio celular vegetal), entre outros (AGATI et al., 2012; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

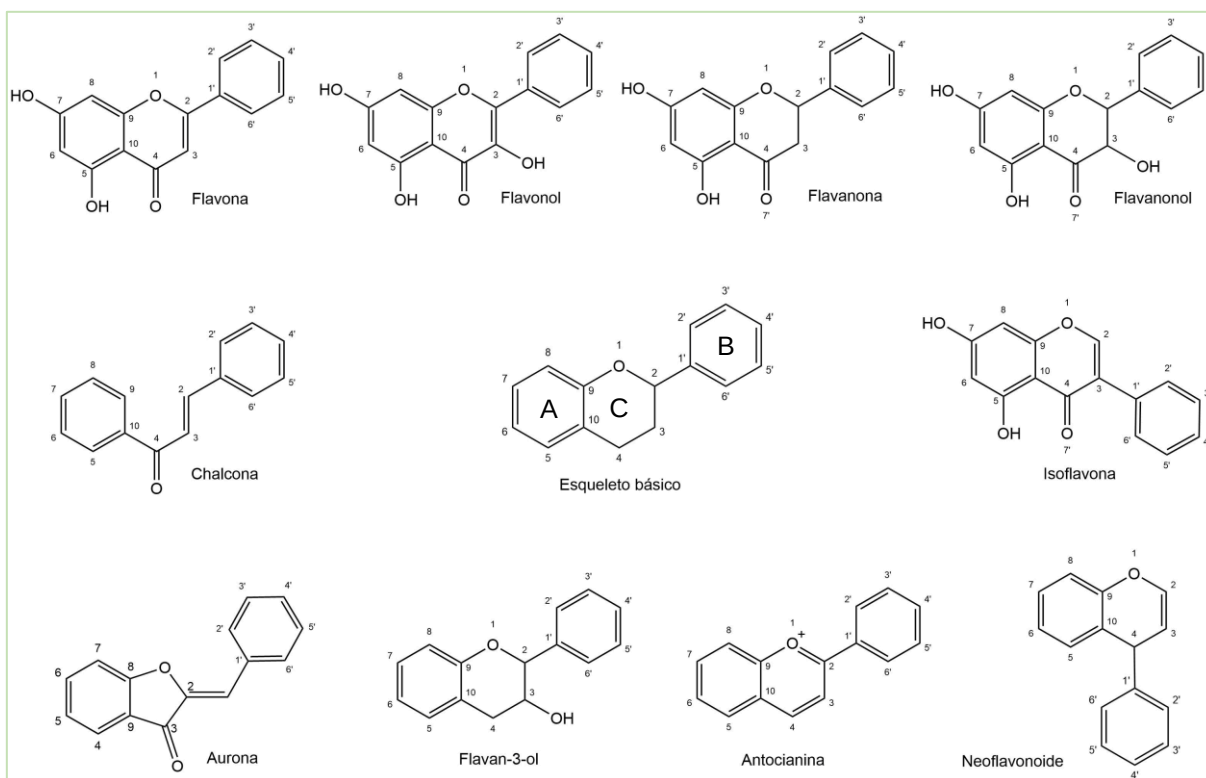
Além disso, os flavonoides têm a função de proteção antioxidante na planta, muitos genes que controlam a síntese de flavonoides são induzidos sob condições de estresse, dessa forma, a quantidade dessas moléculas é aumentada durante a exposição a fatores bióticos e abióticos, como danos mecânicos, seca, privação nutricional, toxicidade provocada por metais, micro-organismos e parasitas. As plantas que estão passando por estresse acumulam preferencialmente flavonoides dihidroxi substituídos no anel B, sendo essa substituição efetiva na neutralização de espécies reativas de oxigênio (HERNÁNDEZ et al., 2009; AGATI et al., 2012).

Figura 5 – Biossíntese dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de HIRUMA-LIMA et al., 2017; SANTOS et al., 2017.

Figura 6 – Esqueletos estruturais de flavonoides.



Fonte: Adaptado de PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016.

Os flavonoides desempenham funções interessantes no tratamento de doenças. Inúmeras pesquisas relatam suas atividades farmacológicas: Lani e colaboradores (2016) demonstraram a ação dos flavonoides baicaleína, fisetina e quercetagina contra o vírus *Chikungunya*; Masuelli e colaboradores (2017) evidenciaram a redução do risco de crescimento tumoral no tecido que reveste os pulmões em ratos pela apigenina; Yuan e colaboradores (2016) descreveram a atividade antibacteriana da isoquercetina e tilirosídeo. Wang e colaboradores (2018) demonstraram a atividade anti-inflamatória do canferol e seus glicosídeos. Os flavonoides ainda são relatados com detentores de efeitos antiateroscleróticos, antitrombogênicos, antiosteoporóticos, anticolinesterásicos, antidiabéticos, hepatoprotetores e efeitos no metabolismo de lipídios (AGRAWAL, 2011; KUMAR; PANDEY, 2013; ROMANO et al., 2013; SANTOS; RODRIGUES, 2017).

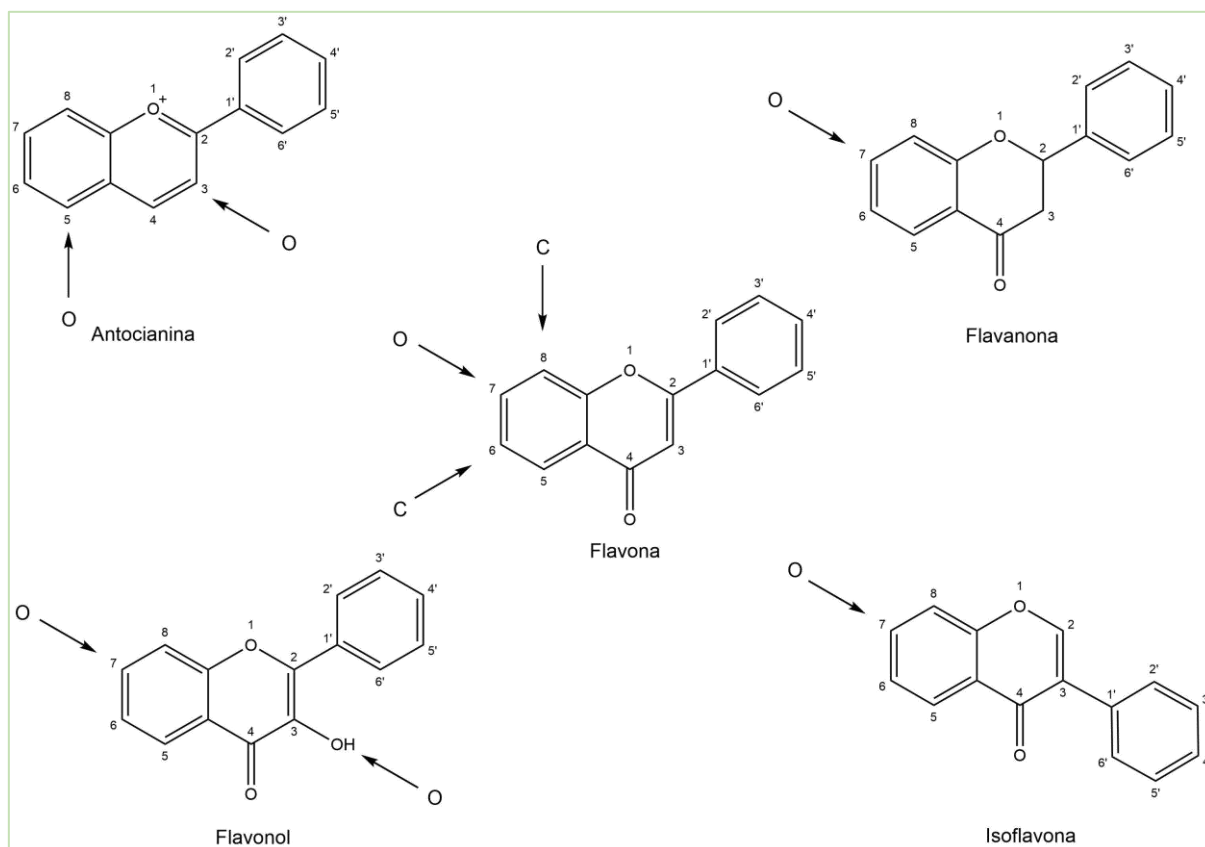
3.4.1. Flavonoides glicosilados

Flavonoides podem ocorrer de várias maneiras nas plantas, por meio de reações de hidroxilação, metilação e mais significativamente, glicosilação. Geralmente a O-glicosilação é a mais frequente e pode ocorrer em um ou mais dos grupos hidroxila da molécula, formando uma ligação hemiacetal glicosídica O–C. A princípio qualquer um dos grupos hidroxila pode ser glicosilado, contudo certas posições são mais favorecidas: a hidroxila na posição 7 em flavonas, flavanonas, isoflavonas; as hidroxilas das posições 3 e 7 em flavonois e flavanois e as posições 3 e 5 em antocianinas. A glicosilação faz com que o flavonoide se torne mais solúvel em água e menos reativo. Essa reação é uma forma essencial de proteção das plantas contra danos citoplasmáticos. O açúcar mais comum encontrado associado às agliconas é a glicose; a galactose, ramnose, xilose e arabinose não são incomuns e mais raros, a manose, frutose e ácidos glicurônico e galacturônico (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Os açúcares também podem estar ligados diretamente ao carbono da aglicona, conhecido como C-glicosídeo, feita entre o carbono anomérico (C-1) do açúcar e carbono(s) do anel A (normalmente os carbonos 6 e/ou 8) (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017). A Figura 7 ilustra as posições de glicosilação mais comumente encontradas em flavonoides.

As UDP-glicotransferases são enzimas capazes de transferir o açúcar ligado a um difosfato de uridina (UDP) a uma gama de moléculas receptoras (LE ROY et al, 2016).

As UFGTs (UDP-glicose-flavonoide-O-glicotransferases) promovem a biossíntese de compostos fenólicos glicosilados em plantas, essa glicosilação confere propriedades bioquímicas e fisiológicas específicas a essas substâncias. Por exemplo, permitindo que as plantas suportem melhor o estresse biótico e abiótico. As glicosiltransferases vegetais utilizam doadores e receptores de açúcar divergentes, os doadores mais comuns reconhecidos pelas UDP-glicosiltransferases de plantas são: UDP-glicose, UDP-galactose, ácido UDP-glucurônico, UDP-xilose, UDP-manose e UDP-ramnose. Elas catalisam reações principalmente nas posições 3-, 5-, 7-, 3'-, 4'-OH dos flavonoides receptores do açúcar (DAI et al., 2017).

Figura 7 – Posições comuns de glicosilação em flavonoides.

Fonte: Adaptado de CUYCKENS; CLAEYS, 2004.

3.5. Considerações sobre alcaloides

Os alcaloides são uma classe de substâncias encontrada em diferentes tipos de organismos, como plantas, organismos marinhos, fungos e animais; são definidos atualmente como compostos orgânicos cíclicos que contém nitrogênio em um estado de oxidação negativo e tem distribuição limitada entre os organismos vivos. Com o intuito de organizar as estruturas de alcaloides, eles foram divididos em três subclasses: os alcaloides verdadeiros, os protoalcaloides e os pseudoalcaloides; os primeiros são estruturas que derivam de um aminoácido e possuem átomos de nitrogênio em um heterocíclico; os segundos são derivados de aminoácidos porém possuem o átomo de nitrogênio fora de um anel heterocíclico; e os pseudoalcaloides não são originados de aminoácidos, mas de outras vias biossintéticas (acetato, mevalonato, chiquimato) (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017; ROY, 2017).

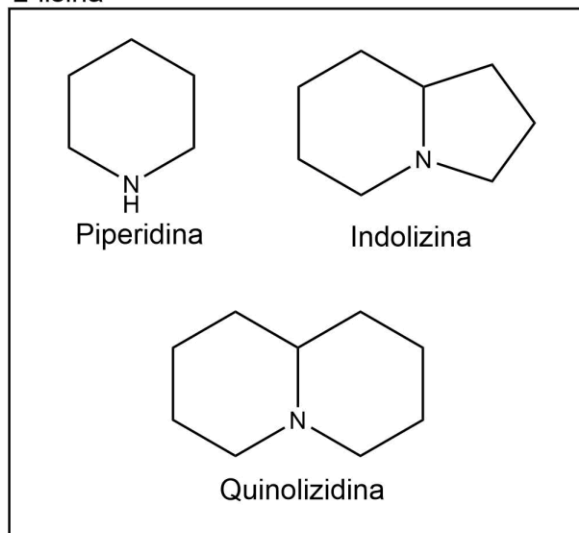
Alcaloides são normalmente encontrados nas ordens Centrospermae (Chenopodiaceae), Magnoliales (Lauraceae, Magnoliaceae), Ranunculales (Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae), Papaverales (Papaveraceae, Fumariaceae), Rosales (Leguminosae), Rutales (Rutaceae), Gentiales (Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae), Tubiflorae (Boraginaceae, Convolvulaceae, Solanaceae) e Campanulales (Campanulaceae, Compositae) (EVANS, 2009).

A diversidade estrutural dos alcaloides varia de acordo com a família/gênero do organismo. Essa variedade está relacionada a via biossintética e as unidades precursoras utilizadas para composição do alcaloide. Por exemplo, diferentes tipos de aminoácidos originam esqueletos básicos diferentes; os aminoácidos mais comuns que participam na biossíntese de alcaloides são a fenilalanina, tirosina e triptofano, apesar disso, aminoácidos como lisina e ornitina também estão envolvidos (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Dependendo desses fatores, são produzidos os esqueletos básicos dos tipos: indólicos, tropânicos, piperidínicos, imidazólicos, pirrolidínicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos e isoquinolínicos (Figura 8) (KAUR; ARORA, 2015).

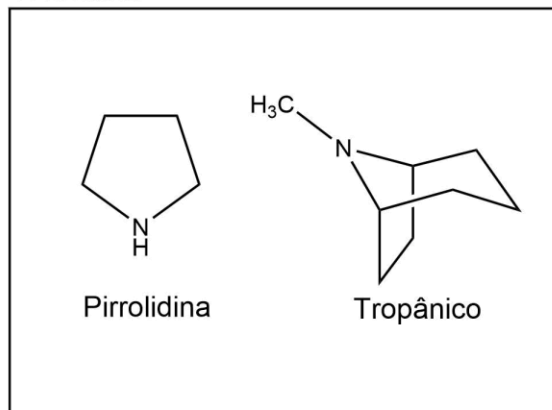
Como outras classes de metabólitos secundários, os alcaloides desempenham papéis importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas. Estas funções são: estimulantes e inibidores do crescimento vegetal, proteção contra fungos e bactérias, promoção da resistência da planta contra vírus, reserva de nitrogênio, proteção contra predadores, entre outros (WALLER; NOWACKI, 1978).

Figura 8 – Principais núcleos fundamentais dos alcaloides e seus aminoácidos precursores.

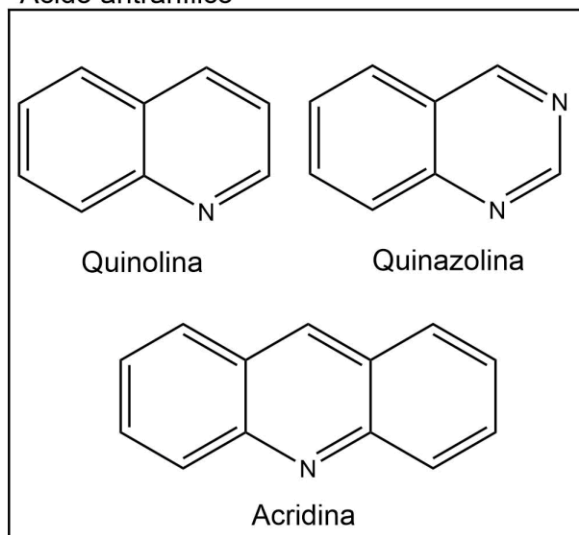
L-lisina



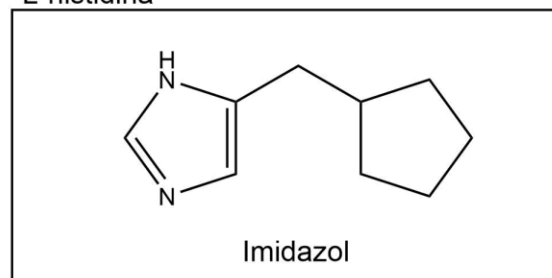
L-ornitina



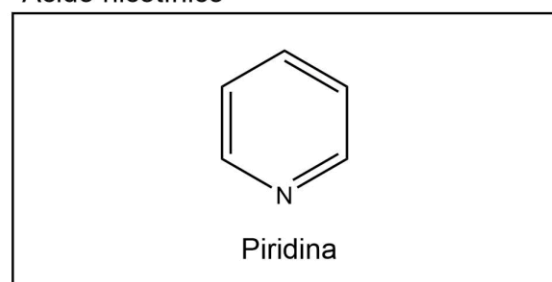
Ácido antranílico



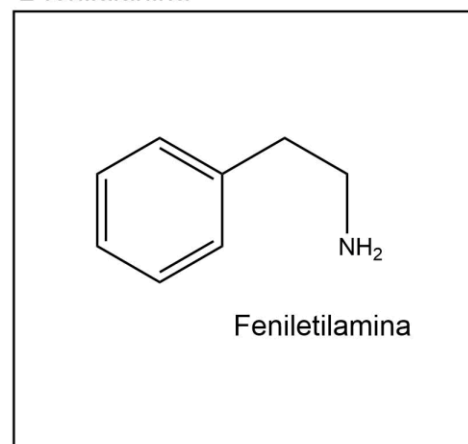
L-histidina



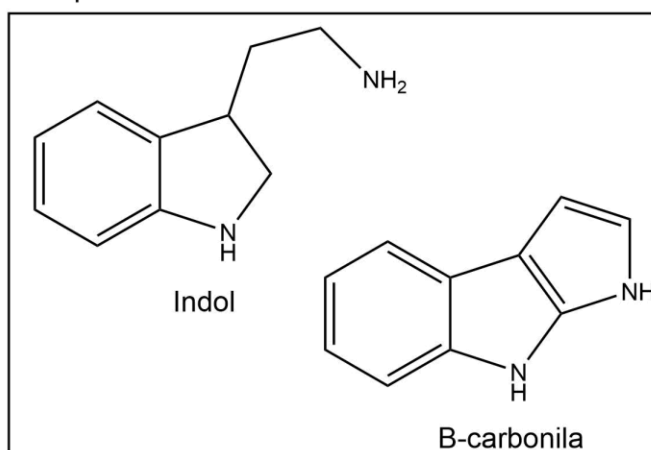
Ácido nicotínico



L-fenilalanina



L-triptofano



Fonte: Adaptado de KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017.

3.5.1. Alcaloides isoquinolínicos

Os alcaloides com esqueleto isoquinolínico são um grupo de metabólitos secundários com inúmeros subgrupos químicos, sendo todos derivados da dopamina e conhecidas pelo menos 4000 substâncias dessa classe estrutural. Eles ocorrem predominantemente nas famílias Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae e Menispermaceae, e podem ser divididos em oito grupos: benzilisoquinolínicos, aporfínicos, protoberberínicos, benzo[c]fenantridínicos, protopínicos, ftalidaisoquinolínicos, morfinâmicos e emetínicos (KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017; SANTOS; REICHERT, SANTOS, 2017).

É notável a relevância medicinal dos alcaloides isoquinolínicos, muitas plantas ricas desse tipo de metabólitos foram e são usadas extensamente pela medicina tradicional. Vários desses alcaloides tem emprego farmacêutico, a exemplo da morfina e codeína (analgésicos narcóticos), papaverina (antiespasmódico), tubocurarina (bloqueador neuromuscular), galantamina (tratamento da Doença de Alzheimer), berberina (sedativo e descongestionante) e da boldina (colerético e colagogo) (KHAN; KUMAR, 2015; SANTOS; REICHERT, SANTOS, 2017).

Os ácidos nucleicos são um dos alvos de interação dos alcaloides isoquinolínicos, dessa forma, eles exibem potencial atividade antitumoral. Khan e Kumar (2015) evidenciaram a importância desse tipo de alcaloide na interação com proteínas funcionais, soroalbuminas, hemoglobina e lisossomos. Os autores concluíram que esses alcaloides têm excelentes atividades anticâncer, devido a afinidade com ácidos nucleicos e interação das estruturas com a Topoisomerase; a maior afinidade com os ácidos nucleicos do que as proteínas séricas, os tornam candidatos adequados para distribuição sistêmica pelas proteínas séricas.

3.6. Considerações sobre o câncer, Topoisomerase e DNA

O câncer é um vasto grupo de doenças que pode acometer quase todos os órgãos ou tecido do organismo e se estabelece quando ocorrer um crescimento desordenado de células, que vão além dos seus limites usuais e invadem outras regiões do corpo e/ou se espalham para outros órgãos, em um processo conhecido como metástase. É a segunda maior causa de morte no mundo, estimando-se 9,9 milhões de mortes em 2018. Os cânceres de próstata, colorretal, estômago e fígado

são os mais comuns em homens, já as mulheres são mais atingidas pelos cânceres de mama, pulmão, cervical e tireoide (*World Health Organization*, 2019).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA (2020), a estimativa de incidência de câncer entre homens e mulheres foi de mais de 300 mil novos casos para cada gênero.

Pelo aumento de novos casos de câncer e pelas constantes descobertas de fatores carcinogênicos, a pesquisa de novas fontes de compostos com ação antitumoral é de grande importância para aumentar a gama de tratamentos quimioterápicos.

Dessa forma, os potenciais terapêuticos de plantas e produtos derivados (alcaloides, flavonoides e terpenoides) são uma alternativa na pesquisa de sua ação sobre alvos relacionados ao tratamento antineoplásico. Alguns exemplos de alvos estudados são as Topoisomerases (Topo), o próprio (DNA), ciclo-oxigenases (COX), lipoxigenase, aromatase, tubulinas, xantina oxidase, receptor de estrogênio, entre outros (SETZER; BYLER, 2018; SCOTTI et al., 2018).

3.6.1. Topoisomerases

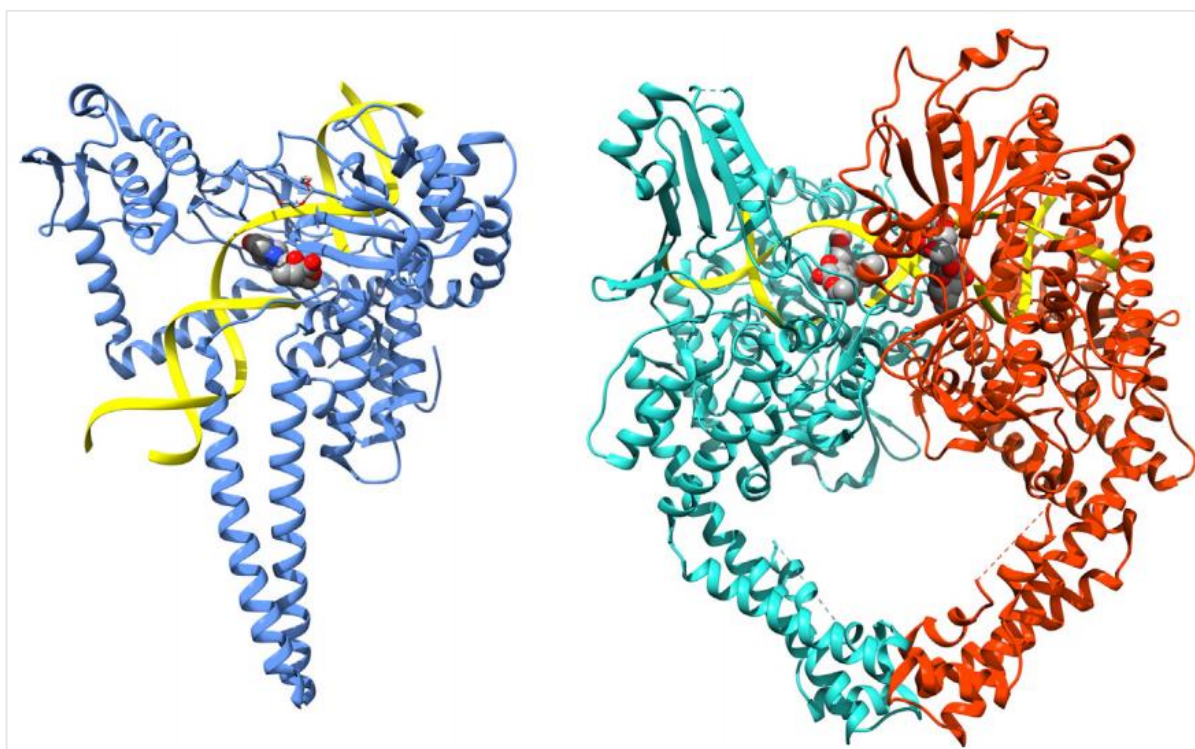
As enzimas Topo são fundamentais para que o processo de replicação ocorra adequadamente, evitando o emaranhamento do DNA. Durante os processos de replicação e transcrição, as fitas são separadas em forma de Y, gerando tensão devido a super-helicoidização provocada. Essa tensão deve ser relaxada para que não ocorra quebra e consequente apoptose da célula (CHAMPOUX, 2001; CHEN; CHAN; HSIEH, 2013). As Topoisomerases promovem o relaxamento do DNA por meio de quebras transitórias nas fitas de DNA usando um mecanismo de transesterificação, que é altamente reversível e diminui os riscos para estabilidade gênica (POMMIER et al., 2016).

Elas são classificadas de acordo com a forma com que clivam as cadeias de DNA e a localização do sítio de ligação covalente entre a enzima e as fitas. As Topo do tipo I quebram apenas uma das cadeias de DNA, passando-a pela fita intacta e em seguida religando-a; elas são divididas em Topo I α e I β . A primeira liga por uma ligação covalente a porção 5' do DNA e não necessita de cofatores, a segunda se liga covalentemente com a porção fosfato 3' usando a fita e os cofatores Mg²⁺ ou Zn²⁺. As topoisomerases II, executam o processo de forma semelhante às do tipo I, contudo,

em vez de uma cadeia simples de DNA, os dois filamentos são quebrados (POMMIER et al., 2016; SCOTTI et al., 2018). A Figura 9 mostra a estrutura 3D das topoisomerasas I e II.

Agentes naturais, como a camptotecina, um alcaloide quinolínico, antraciclina e podofilotoxina, tem sido largamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer. A topoisomerase, como enzima alvo, continua sendo altamente ativa na pesquisa básica e clínica, visto que alguns estudos mostraram que as topoisomerasas se encontram mais concentradas em tumores do que em tecidos com funcionamento normal (HEVENER et al., 2018; SCOTTI et al., 2018).

Figura 9 – Topoisomerasas I (esquerda) e II (direita), com cadeia A em azul na Topo I e cadeia A em turquesa e cadeia B em vermelho na Topo II, com DNA em amarelo.



Fonte: HEVENER et al., 2018.

A inibição das topoisomerasas podem ocorrer por um de alguns mecanismos que são geralmente aceitos. Um deles é a inibição competitiva do substrato: a ligação de um composto inibidor aos sítios ativos da topoisomerase impede a ligação da proteína com os resíduos do DNA. Outro mecanismo bastante discutido é dos chamados “venenos de topoisomerase”, que se caracterizam pelo complexo proteína-droga-DNA que impossibilita a religação do DNA e bloqueia a enzima em um

‘complexo de clivagem’, resultando no aumento do complexo citotóxico dentro da célula. Um terceiro mecanismo é a inibição competitiva do local de ligação de ATP, visto somente para Topo II, que impede a ação enzimática (HEVENER et al., 2018).

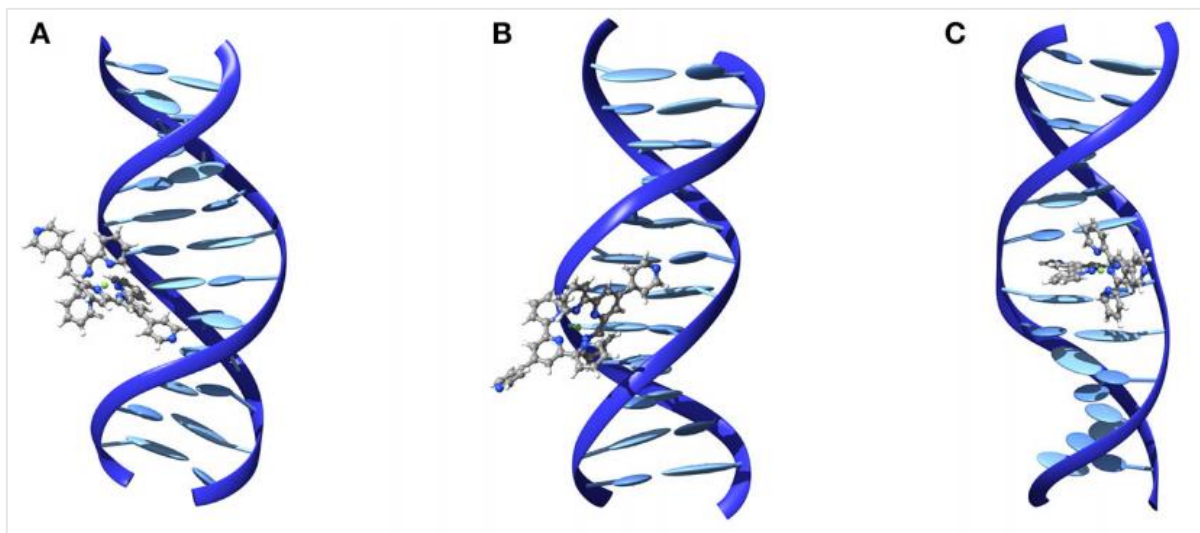
3.6.2. DNA

Devido ao seu papel crucial para o funcionamento e sobrevivência da célula, o DNA é um dos alvos de compostos que possam influenciar no seu metabolismo, moléculas estas que se ligam ao DNA e modificam suas funções fisiológicas usuais, impedindo a transcrição, replicação ou a expressão gênica, levando a interrupção do crescimento e/ou morte celular. Os tipos de interação com o DNA são classificados em seis categorias: atração eletrostática com o ânion fosfato de açúcar, interações com os sulcos maiores do DNA, interação com os sulcos menores, intercalação entre pares de bases e intercalação em cadeia (ALMEIDA et al., 2017).

Os modos de ligação ao DNA mais comuns são por intercalação e por interação com os sulcos menores. A intercalação ocorre por uma interação não-covalente onde a molécula com um núcleo aromático planar se posiciona entre os pares de bases do DNA. Geralmente, a intercalação causa estabilização, desenrolamento local, alongamento, entre outras mudanças estruturais. Esse processo tem uma notável implicação terapêutica e os agentes intercaladores são geralmente usados como agentes anticâncer, e ainda em infecções bacterianas e parasitárias (MUKHERJEE; SASIKALA, 2013).

A ligação com os sulcos do DNA é mais facilitada quando a molécula apresenta carga positiva, sendo a maioria das moléculas ligantes dos sulcos menores, embora existam relatos de ligação com os sulcos maiores; essas ligações são geralmente um estado intermediário que leva a modos de ligação finais, como a intercalação. Por exemplo, quando em baixas concentrações, alguns medicamentos se ligam aos sulcos menores do DNA, já em concentrações maiores eles são capazes de intercalar as fitas. As forças que comandam as ligações aos sulcos menores são forças eletrostáticas, de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (ALMAQWASHI et al., 2016). Nesse modo de ligação a molécula é geralmente flexível, contem ligações rotativas e é capaz de se orientar ao longo do sulco maior ou menor do DNA inibindo sua atividade regular (AL-RASHIDA; AHSEN, 2015). Exemplos de modo ligação ao DNA podem vistos na Figura 10.

Figura 10 – Modos de ligação ao DNA. Ligação ao sulco maior (A), ligação ao sulco menor (B), intercalação (C).



Fonte: Adaptado de GATTUSO et al., 2015.

3.7. Estudos *in silico*

As universidades e indústrias vem usando progressivamente os métodos *in silico* a fim de compreender as interações moleculares dos pontos de vista quantitativo e qualitativo. Esses estudos fornecem informações e previsões essenciais do potencial bioativo das substâncias estudadas. A análise computacional da estrutura molecular de um dado sistema pode ser realizada por meio de métodos que geram e manipulam a conformação tridimensional da mesma, pelo cálculo de descritores e propriedades moleculares, construção de modelos e inúmeras outras metodologias na pesquisa quimioinformática de drogas (ALVES et al., 2017).

Uma substância química, isolada de uma fonte natural, é representada pela sua estrutura química, que pode ser usada para calcular propriedades conhecidas na área como descritores estruturais. Um descritor pode ser definido como um processo lógico e matemático que codifica numericamente a informação estrutural da molécula de uma representação simbólica (descritor teórico) ou essa conversão pode ocorrer com um experimento padronizado (descritor experimental); com isso o termo também inclui a previsão de propriedades biológicas, conformacionais, tempo de retenção, deslocamento químico de RMN, propriedades físicas e farmacocinéticas (TODESCHINI; CONSONNI, 2000; OLIVEIRA; RODRIGUES; COSTA, 2017).

O uso de análises tridimensionais são úteis para compreender a topografia dos ligantes, o que pode ser explorado para identificar compostos de interesse pela ancoragem do composto natural com o sítio de ligação. Essas análises podem se apoiar na abordagem baseada no ligante e na abordagem baseada na estrutura do alvo. A primeira fornece informações sobre o ligante usando algoritmos designados para determinar o conjunto de interações estéricas e eletrostáticas que são necessárias para que ocorra a interação com o alvo, dentre diversos compostos, possibilitando a assimilação de interações chave mais eficientes, mesmo sem o total conhecimento da estrutura do alvo biológico. A segunda se baseia nos sítios ativos da macromolécula ou alvo biológico e, assim, torna possível desenvolver e/ou selecionar os prováveis compostos que apresentariam melhores interações com seus resíduos (ROLLINGER; LANGER; STUPPNER, 2006).

3.7.1. *Docking* molecular

Docking molecular é uma técnica *in silico* que se fundamenta em analisar a conformação e interação (posição) de moléculas nos sítios de ligação de macromoléculas biológicas (Figura 11). Os *softwares* de *docking* (*AutoDock*, *AutoDock Vina*, *DockThor*, *GOLD*, *FlexX* e *Molegro Virtual Docker*) empenham-se na predição da afinidade ligante-proteína e a conformação de ligação, envolvendo duas etapas: busca e pontuação. No algoritmo de busca, várias conformações do ligante são geradas, sendo guiadas por funções que avaliam o encaixe entre a proteína e o ligante. Na etapa de pontuação, é avaliada a afinidade ligante-proteína, gerando uma pontuação que será usada na seleção das conformações finais (TERAMOTO; FUKUNISHI, 2006; TORRES et al., 2019).

De acordo com Teramoto & Fukunishi (2006), existem três grupos de funções de pontuação:

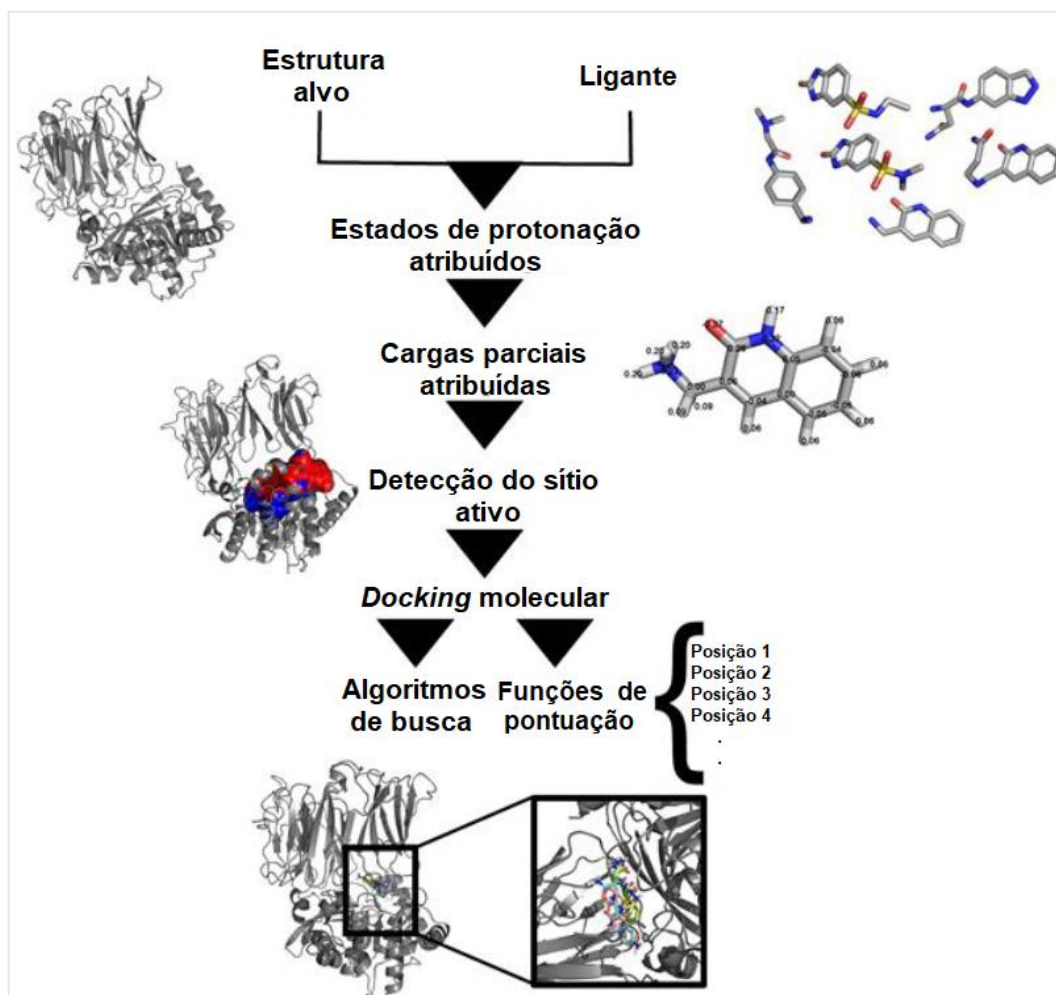
- Campo de força: nessa função, a pontuação é marcada por parâmetros de mecânica molecular clássica capazes de quantificar a energia das interações ligante-receptor. A energia livre de ligação das interações é aproximada por uma soma de interações de van der Waals e eletrostáticas, a distância e ângulos moleculares também são levados em consideração;
- Funções empíricas: essas funções estimam a energia livre de ligação por meio de parâmetros estruturais ponderados. Os parâmetros são determinados pelo

ajuste da função de pontuação de acordo com as constantes de ligação experimentais de um conjunto ensaios ligante-proteína previamente realizados;

- Baseado no conhecimento: refletem a afinidade de ligação como uma soma das interações entre átomos de proteínas e ligantes. É basicamente uma análise estatística onde as potenciais ligações são derivadas de complexos de proteínas com substâncias conhecidas, ou seja, comparam as interações mais prováveis a partir de dados existentes.

A ligação de uma molécula com seu local ativo na proteína é um processo complicado, é preciso levar em consideração fatores entrópicos e entálpicos que influenciam na interação entre as duas estruturas. A dificuldade se dá pela mobilidade do ligante e do receptor, o efeito do meio protéico na distribuição de cargas do ligante e a interação com moléculas de água e outras substâncias que rodeiam as estruturas (ALONSO et al., 2006).

Figura 11 – Procedimento geral de *docking* molecular.



Fonte: Adaptado de TORRES et al, 2019.

Para usar o AutoDock é necessário seguir os passos: (1) preparar os arquivos de receptor e ligante; (2) calcular os mapas de afinidade usando uma grade 3D; (3) definir os parâmetros e executar a simulação de docking (PRIYADARSHINI, 2014).

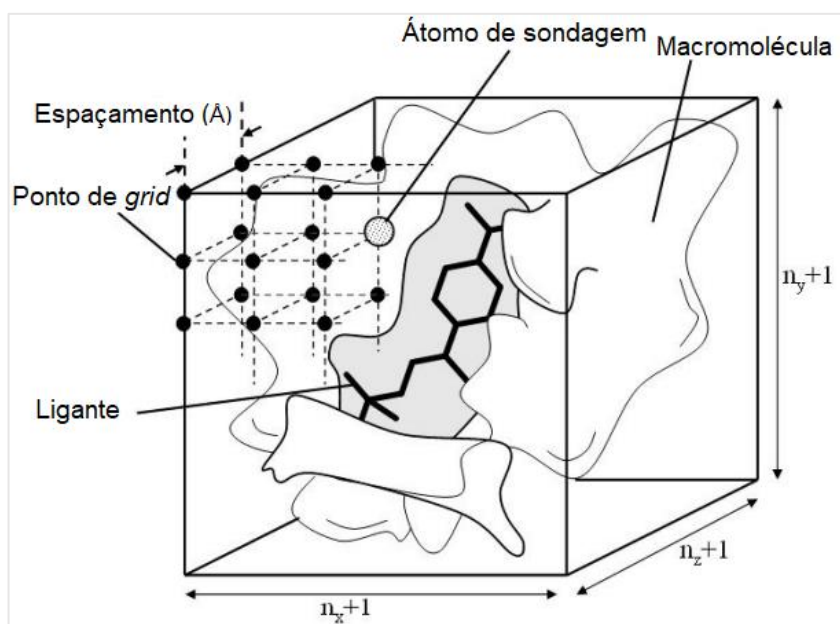
A obtenção da estrutura alvo, sendo geralmente proteínas, DNA ou RNA, é feita pela pesquisa no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank* – PDB), o qual dispõe acesso às coordenadas atômicas 3D que são alcançadas por métodos experimentais (difração de raios-X, difração de nêutrons, RMN) (TORRES et al., 2019).

A proteína deve ser preparada para o *docking* estabilizando cargas, removendo os interferentes como moléculas de água, preenchendo os resíduos vazios e gerando cadeias laterais, tudo de acordo com parâmetros disponíveis. A eficiência de algoritmos de *docking* em prever a posição em que o ligante vai se acoplar à proteína é medida pelo desvio da média quadrática (root-mean-square deviation – RMSD) (geralmente valores menores que 2 Å mostram um bom desempenho) entre as posições dos átomos do ligante observadas experimentalmente e a posição predita pelos algoritmos (HERNÁNDEZ-SANTOYO, et al., 2013).

O AutodockTools conta com o *AutoGrid* e o *AutoDock*. A realização dos mapas de *grid* com o *AutoGrid* é necessária para em seguida o *docking* propriamente dito ser executado pelo *AutoDock*. O *AutoGrid* calcula grades de energia de interação com base no alvo protéico, em que uma grade tridimensional é construída envolvendo as coordenadas do alvo macromolecular, depois, um átomo de sondagem analisa cada ponto da grade e a energia é calculada e armazenada (Figura 12). Tabelas são geradas após a análise de cada ponto da grade para avaliação rápida das energias de interação, para cada tipo de átomo, incluindo energias de repulsão e dispersão e ligação de hidrogênio (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996).

O AutoDock usa algoritmo genético Lamarckiano (LGA) para encaixar ligantes flexíveis em locais de ligação a proteínas. Os algoritmos genéticos (AG) são usados para explorar a energia livre entre a molécula estudada e a proteína a fim de encontrar as melhores conformações. Eles funcionam gerando diversos ligantes dispostos de forma aleatória, em seguida, é calculado a energia de ligação das interações ligante-proteína e as melhores conformações são selecionadas para aplicação do algoritmo genético. Várias gerações são apresentadas até que chegue ao limite o número máximo de gerações (SILVA, 2017).

Figura 12 – Demonstração de mapa de grades.



Fonte: Adaptado de PRIYADARSHINI, 2014.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

O material vegetal de *Cissampelos sympodialis* Eichl. foi coletado no horto do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IpeFarM da UFPB e identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, sob registro AGRA 1476.

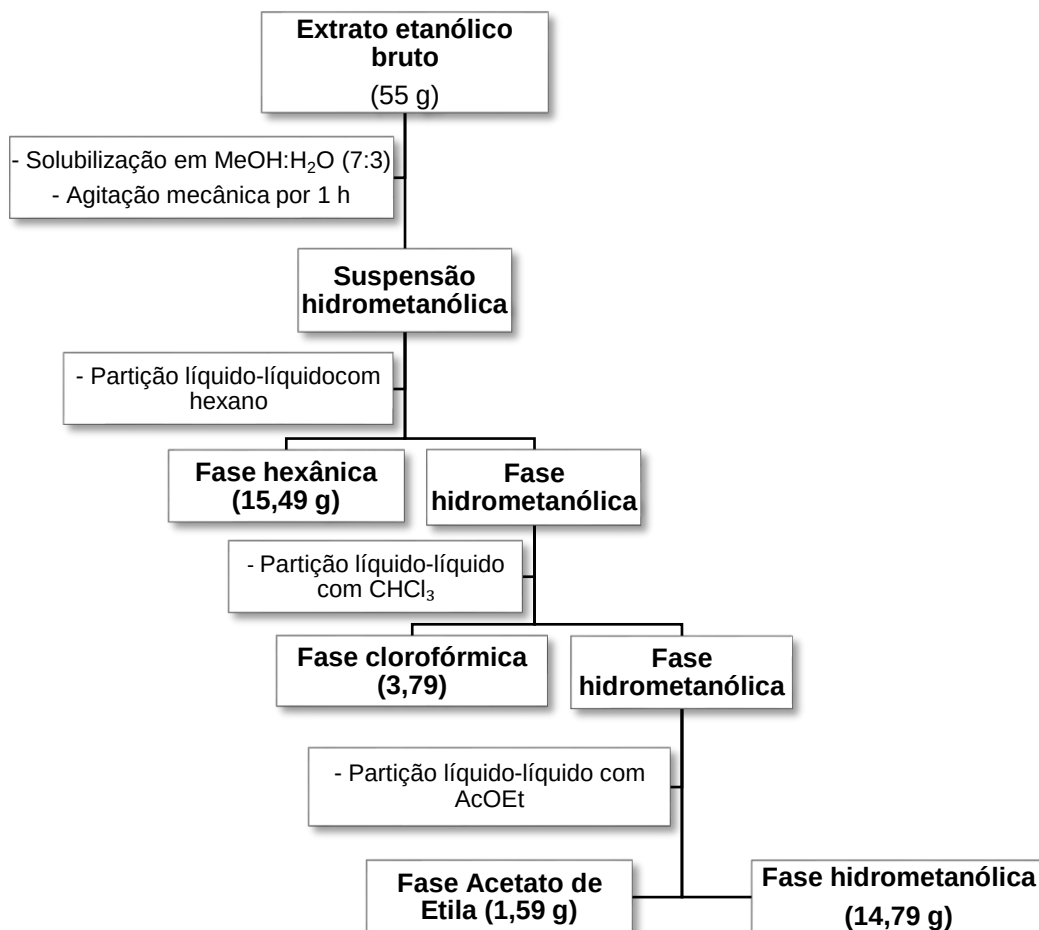
A pesquisa encontra-se registrada no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob código A9B2EFC.

4.2. Processamento do material vegetal e obtenção do extrato etanólico bruto

As partes aéreas frescas *Cissampelos sympodialis* Eichl. Foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C. Em seguida, foram trituradas e submetidas a três macerações consecutivas com etanol 96° GL com 72 h de intervalo entre cada extração. Ao final do processo extrativo, a solução etanólica teve o solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo BÜCHI a 45°C, obtendo-se o extrato etanólico bruto.

4.3. Fracionamento do extrato etanólico bruto

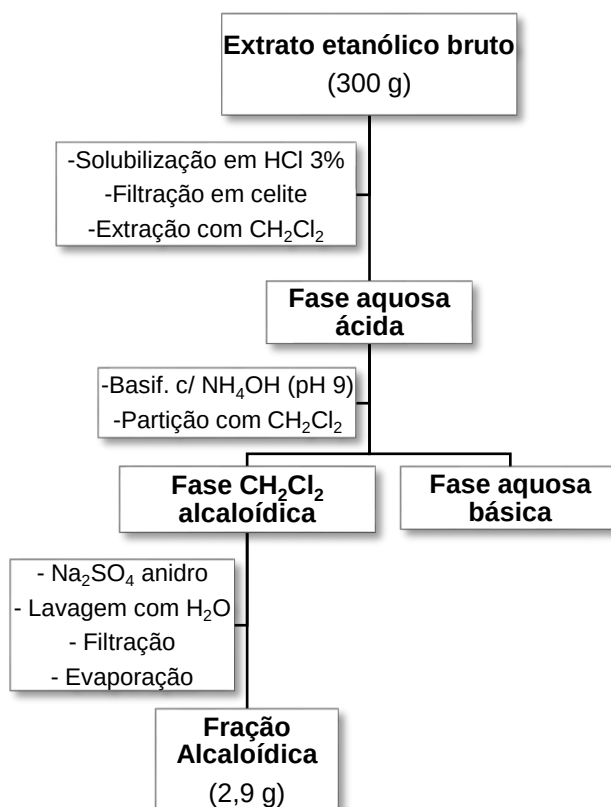
O EEB (55 g) foi solubilizado em uma solução de metanol/água (7:3 v/v) e homogeneizado sob agitação mecânica por 60 minutos, a fim de obter a solução hidrometanólica. Subsequentemente, a solução obtida foi particionada em ampola de separação, utilizando solventes em gradiente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As soluções provenientes da partição passaram por um processo de desidratação com sulfato de sódio anidro e em seguida foram filtradas e concentradas em rotaevaporador BÜCHI a 45°C. Ao final dos procedimentos foram obtidas a fase hexânica (FHex), clorofórmica (FC), acetato de etila (FACOEt) e hidrometanólica (FHM) (Esquema 1).

Esquema 1 – Fracionamento do EEB das partes aéreas de *C. sympodialis*.

4.4. Marcha para alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Foi utilizada a metodologia clássica para obtenção da fração de alcaloides. O EEB foi tratado com uma solução de ácido clorídrico a 3% sob agitação até pH 2-3. Posteriormente, a solução ácida foi filtrada em funil de Buchner com celite. O filtrado aquoso foi submetido a diversas extrações com diclorometano e, em seguida, foi basificado com hidróxido de amônio sob agitação até pH = 9, sendo particionado exaustivamente com diclorometano até reação negativa com o reagente de Dragendorff. A fase orgânica passou por procedimentos de lavagem com água destilada, desidratação com Na₂SO₄ anidro, filtração e evaporação do solvente em rotaevaporador, resultando na obtenção da FAT (2,9 g) (Esquema 2).

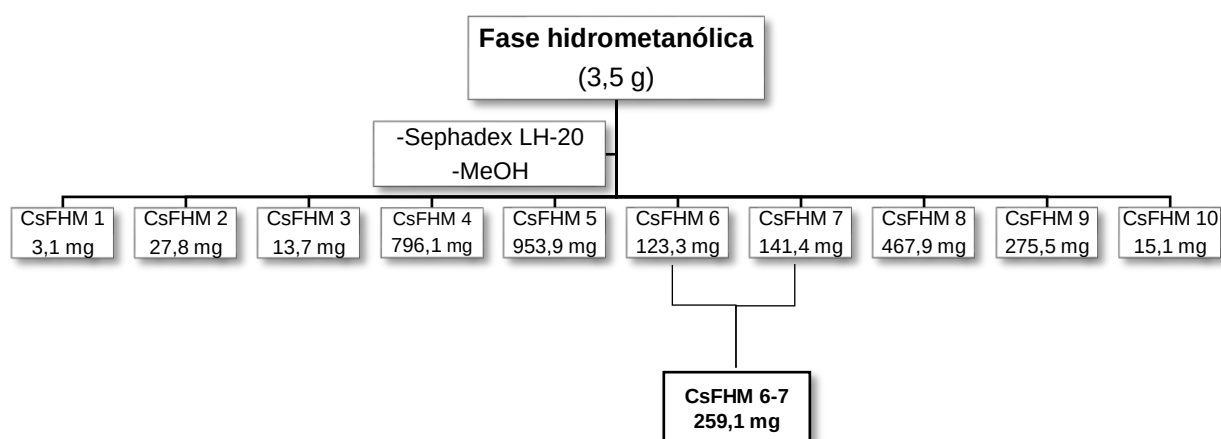
Esquema 2 – Extração ácido-base do EEB das partes aéreas de *C. sympodialis*.



4.5. Fracionamento cromatográfico da Fração Hidrometanólica (FHM)

A FHM (3,5 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 como fase fixa e MeOH como fase móvel, rendendo 10 frações (CsFHM 01 a 10) (Esquema 3). As frações tiveram o solvente evaporado à temperatura ambiente e foram monitoradas por CLAE-DAD em escala analítica e reunidas por similaridade.

Esquema 3 – Frações obtidas da CC Sephadex LH-20.



4.6. Análise das frações por CLAE analítico

Para a análise por CLAE, utilizou-se um cromatógrafo analítico Shimadzu com controlador de sistema modelo CBM-20A, equipado com uma coluna de fase reversa C18 Kromasil 100-10-C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 10 μm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 10 μm), bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A_{HT} e detector UV-VIS SPD-M20A. Como fase móvel foi utilizado água ultrapura acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC.

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹, sendo solubilizadas em metanol grau HPLC. O método empregado para análise consiste em um gradiente exploratório partindo de 5% até 100% de metanol em 95 minutos, em um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e volume de injeção 20 μL .

Após as análises, as amostras CsFHM 06 e 07 (CsFHM 6-7) foram reunidas, resultando em um peso final de 259,1 mg.

4.7. Processamento cromatográfico da CsFHM 6-7 por CLAE preparativo

Para isolamento dos compostos foi utilizado um equipamento de CLAE preparativo Shimadzu composto por controlador de sistema SLC-10A vp, duas bombas LC-6AD, injetor manual Rheodyne e detector DAD SPD-M10A. A coluna conectada ao equipamento foi uma YMC-Actus Triart C18 (250 mm x 20,0 mm e partículas de 5 μm).

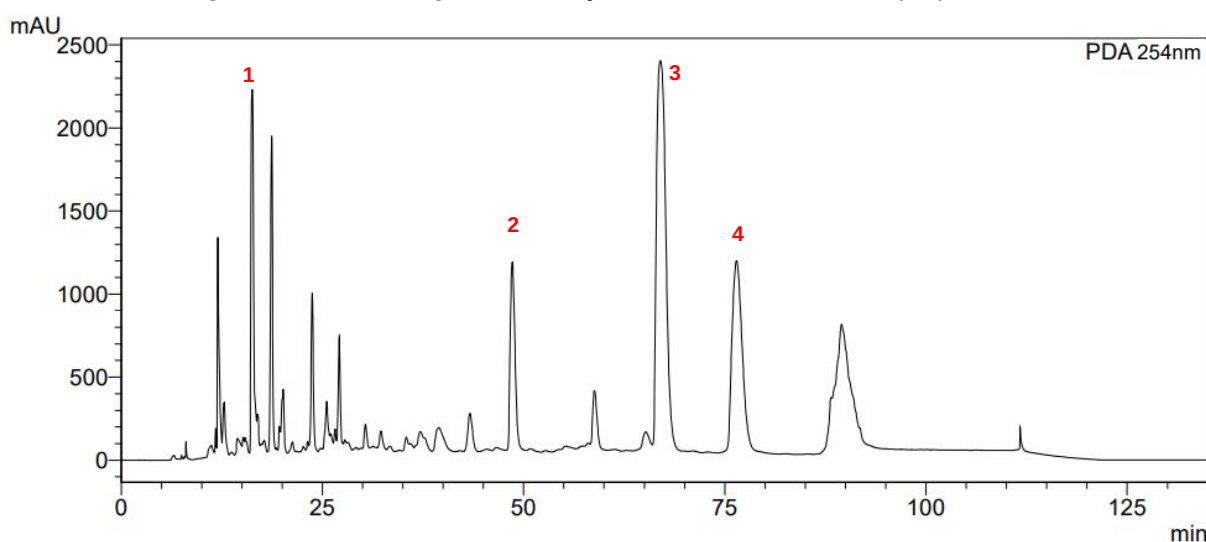
Como fase móvel foi utilizado água milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC. O fluxo utilizado da fase móvel foi de 8,0 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 100 μL . A amostra (259,1 mg) foi solubilizada em 1 mL de metanol grau HPLC. Em seguida, foi levada à centrífuga com 15000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa PTFE (13 mm x 0,22 μm) e o filtrado foi usado na injeção para isolamento dos compostos.

O método cromatográfico desenvolvido para isolamento dos constituintes encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Método de processamento da CsFHM 6-7.

Tempo (min.)	% de MeOH (Solvente B)
0,01	2
20,00	30
23,00	30
45,00	40
50,00	45
80,00	45
85,00	100
105,00	100
115,00	2

Foram coletados 18 picos evidenciados no cromatograma (Figura 13), dos quais, quatro amostras foram analisadas e codificadas como Cs-1, Cs-2, Cs-3 e Cs-4.

Figura 13 – Cromatograma da fração CsFHM 6-7 em CLAE preparativo.

4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados

Técnicas espectroscópicas e espectrométricas foram utilizadas para caracterização dos compostos.

Os espectros de RMN foram registrados no equipamento BRUKER Ascend 400 operando a 400 MHz para hidrogênio ^1H e 100 MHz para carbono ^{13}C e Varian-System, operando a 500 MHz (^1H) e 125 (^{13}C). Para dissolução das amostras foi utilizado o solvente deuterado dimetilsulfóxido (DMSO). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento J em Hz. Para os sinais do espectro de RMN de ^1H , as multiplicidades foram atribuídas de acordo com as convenções *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplete de duplo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete).

4.9. Espectrometria de massas (EM)

4.9.1. Análise da fração CsFHM 6-7 por CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

Nas análises por CLAE-EM, foi utilizado o equipamento CLAE Shimadzu composto por controlador de sistema CBM-20A, duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A3, auto-injetor SIL-20A, acoplado a um espectrômetro de massa de baixa resolução Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX com ionização por eletrospray (ESI), operando nos modos de aquisição positivo e negativo. A fragmentação por CID foi realizada no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS e os espectros (m/z 50 – 1.500) foram registrados a cada 2 s. A coluna analítica empregada foi uma Kromasil 100-5-C18 (250 mm x 4,6 mm, com partículas de 5 μm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm, partículas de 5 μm).

Para análise, 1 mg da CsFHM 6-7 foi solubilizado em 1 mL de MeOH grau HPLC, sendo a solução obtida filtrada em filtro de seringa PVDF (13 x 0,45 μm). Para desenvolvimento do método cromatográfico utilizou-se como fase móvel um gradiente de metanol grau HPLC (solvente B) e água ultrapura (Mili-Q) acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), de 5 a 100% de solvente B em 95 minutos, fluxo de 0,6 mL/min e volume de injeção da amostra de 20 μL . No espectrômetro de massas as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM³.

4.9.2. Espectrometria de massas de alta resolução

A obtenção do espectro de alta resolução das substâncias foi feita por espectrômetros de massas Bruker, modelo microTOF II, pela técnica de IES, modo negativo, seguindo os seguintes parâmetros: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 49.3 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8,0 mL.min⁻¹ e temperatura de 300 °C.

As amostras foram analisadas por injeção direta. Para isso, 1 mg de cada amostra foi solubilizado em 1 mL de metanol grau HPLC (Solução A). Logo depois, 200 µL da solução A foram retirados e completou-se o volume para 1000 µL, sendo adicionados 800 µL de metanol (Solução B). Foi utilizada uma terceira solução para injeção direta (Solução C), a qual foi preparada adicionando-se 490 µL de metanol, 490 µL de água Milli-Q e 20 µL da solução B, resultando em um volume final de 1 mL.

4.10. Estudo *in silico* de alcaloides relatados em *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Foi realizado um estudo teórico sobre a capacidade de alcaloides já relatados em *Cissampelos sympodialis* interagirem com o DNA e a proteína Topoisomerase II α , com isso, investigar a possibilidade de os alcaloides apresentarem atividade antitumoral. Os alcaloides estudados foram: laurifolina, milonina, warifteina, metilwarifteina, roraimina, des-7'-O-metilroraimina e epi-des-7'-O-metilroraimina.

Utilizando o software ChemDraw 12.0, realizou-se o desenho das moléculas que em seguida foram submetidos, no programa Chem3D 15.1, à análise conformacional por meio do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2), a fim de obter a conformação com menor energia e, então, sendo salvas no formato MOL2.

As estruturas tridimensionais dos alvos foram obtidas pelo *RCSB Protein Data Bank* (PDB) (www.rcsb.org/), sendo elas: DNA (PDB ID: 1BNA) e Topoisomerase II α complexado com DNA (PDB: 5GWK, R: 3,152 Å). Os mesmos foram tratados por meio do software PyMOL, isolando as cadeias das macromoléculas, retirando interferentes como moléculas de água e de solvente.

O *docking* molecular dos alcaloides em seus respectivos alvos foi desenvolvido utilizando o programa AutoDockTools (ADT) 1.5.6. Os parâmetros do grid foram

gerados pelo algoritmo Autogrid 4.2, com o espaçamento de 0,375 Å em cada dimensão. Para o DNA, o centro do grid foi configurado nas dimensões de 96 x 96 x 126 Å nos eixos X, Y e Z e para a Topoisomerase II α , as dimensões do grid consistiram em 60 x 60 x 60 Å nos eixos X, Y e Z, sendo o centro ajustado para posição do ligante cocrystalizado (Etoposídeo) localizado na cadeia A. O algoritmo genético Lamarckiano no AutoDock 4.2 foi aplicado na procura da melhor conformação e orientação dos ligantes nas simulações. A otimização foi iniciada com uma população de 150 indivíduos posicionados de modo aleatório com um máximo de 2500000 avaliações de energia e um máximo de 27000 gerações. Durante cada experimento de *docking*, foram realizadas 50 execuções, gerando 50 conformações para cada um dos alvos. Os valores foram obtidos na forma de Energia Livre de Ligação (ΔG) e Constante de Inibição Estimada (K_i). Os resultados do ensaio foram analisados e visualizados utilizando o programa Discovery Studio Visualizer 2017 R2 Client (SILVA FILHO et al., 2019).

Para validação do método foi realizado um *re-docking*, em virtude da cocrystalização da estrutura cristalográfica da topoisomerase II α com o etoposídeo. No *re-docking*, o mesmo ligante cocrystalizado na macromolécula, no caso o etoposídeo, é submetido aos métodos previamente desenvolvidos, sendo então verificados se são mantidas a conformação espacial e as interações com os resíduos ativos da proteína. Para isso são avaliados os valores do desvio médio da raiz quadrada (do inglês “*Root Mean Square Deviation*” – RMSD) da estrutura cristalina e sua respectiva pose, considerando o menor valor possível, constatando a capacidade preditiva do modelo *in silico* (MOURA, 2019).

4.11. Ensaio de citotoxicidade

Foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) para avaliar a citotoxicidade das amostras de *C. sympodialis* Eichl. (MOSMANN, 1983).

As linhagens celulares, HCT-116 (carcinoma do cólon humano) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina a 37°C em atmosfera umidificada com CO₂ a 5%. As linhagens celulares SK-MEL (melanoma humano), MDA-MB-231 (câncer de mama humano) e HaCat (queratinócito humano) foram cultivadas em meio

DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3 x 10⁵ células/poço. Após um período de 24 h, as células foram incubadas com as amostras (concentrações de teste de 200 µg/mL para o EEB e FAT e, 25 µM para Cs-2 e Cs-4) dissolvidas em DMSO. Cada experimento foi realizado em triplicata. Os controles negativos foram tratados com DMSO e os controles positivos com doxorrubicina. Após cultura por 72 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) foi adicionada e incubada por mais 3 h. Os cristais de formazan depositados foram dissolvidos com dodecil sulfato de sódio (SDS) (100 µL) (MOSMANN, 1983). As densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek).

Os resultados da avaliação do potencial citotóxico foram interpretados de acordo com uma escala de intensidade de inibição, considerando: sem atividade (1 a 20% de inibição), baixa atividade (inibição de crescimento entre 20 a 50%), atividade moderada (inibição de crescimento celular entre 50 a 70%) e atividade alta (inibição de crescimento entre 70 a 100%).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação estrutural dos compostos isolados

5.1.1. Identificação estrutural de Cs-1

A substância Cs-1, com tempo de retenção 16,27 min. (Pico 1, Figura 13, pág. 58), foi isolada na forma de cristais brancos, pesando 5,4 mg. O espectro de massas de alta resolução exibiu um pico de íon molecular com m/z 268,1048 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{13}N_5O_4$ (massa calculada m/z 268,1040 e erro de -2,8 ppm) (Figura 15, pág. 66).

No espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz), utilizando a técnica DEPTQ-135 (Figura 16, pág. 67) foi possível observar a presença de 10 sinais, sendo um deles para um carbono metilênico oxigenado (δ_c 61,7), seis sinais em δ_c 152,4, δ_c 139,9, δ_c 87,9, δ_c 85,9, δ_c 73,5 e δ_c 70,7 para carbonos metínicos e três sinais em δ_c 156,1, δ_c 149,1 e δ_c 119,3 atribuídos a carbonos não hidrogenados. Os sinais em δ_c 156,1 (C-6), δ_c 152,4 (C-2), δ_c 149,1 (C-4), δ_c 139,9 (C-8) e δ_c 119,3 (C-5) são relativos a aglicona, e encontram-se na região de carbonos sp^2 , porém são vistos valores maiores, indicando desproteção e sugerindo a ligação dos carbonos a heteroátomos (PAVIA et al., 2015). Os cinco sinais entre δ_c 87,9 e δ_c 61,7 foram atribuídos à presença de uma pentose na molécula (AKHREM; MIKHAILOPULO; ABRAMOV, 1979).

O espectro de RMN de 1H (Figuras 17 – 19, pág. 67 e 68), obtido em DMSO- d_6 a 400 MHz, demonstrou dois simpletos na região de prótons aromáticos em δ_H 8,33 e δ_H 8,13, relativos aos hidrogênios H-8 e H-2, respectivamente. Em δ_H 7,32, é visto um simpleto largo indicativo de amina ($-NH_2$). Sinais de hidrogênios hidroximetínicos entre δ_H 4,59 – 3,55 e um sinal em δ_H 5,87 integrando para um hidrogênio (d, $J = 6,4$ Hz), reforçam a presença de uma unidade osídica, sendo esse último referente ao hidrogênio anomérico (LIMA, 2013). Os sinais alargados entre δ_H 5,42 – 5,18 foram atribuídos aos hidrogênios das hidroxilas da pentose. Os dados de RMN unidimensional sugerem que Cs-1 trata-se de um nucleosídeo.

No mapa de contorno heteronuclear HSQC (Figuras 20 e 21, pág. 69), observou-se a correlação do hidrogênio anomérico em δ_H 5,87 com δ_c 87,9 (C-1'), do hidrogênio H-2' em δ_H 4,59 com δ_c 73,5 (C-2'), H-3' em δ_H 4,14 com δ_c 70,7 (C-3'), H-

4' em δ_H 3,96 com δ_C 85,9 (C-4') e os hidrogênios da posição 5' em δ_H 3,65 e 3,55 com δ_C 61,7 (C-5'), correlações referentes ao fragmento de açúcar.

No mapa de contorno heteronuclear HMBC (Figuras 22 – 24, pág. 70 e 71), correlações entre o hidrogênio anomérico em δ_H 5,87 com δ_C 139,9 (C-8), δ_C 149,1 (C-4) e δ_C 73,5 (C-2'), constataam a ligação da função osídica na posição 9, e ainda, é vista a correlação de H-1' com δ_C 73,5 (C-2'). Foram vistas três correlações entre os sinais em δ_H 8,33 e δ_H 8,13 com δ_C 119,3, δ_C 149,1 e δ_C 156,1 corroborando esses valores para os carbonos 5, 4 e 6, respectivamente e δ_H 8,33 e δ_H 8,13 para os H-8 e H-2. Uma correlação a longa distância entre δ_H 7,32 e δ_C 119,3 confirmou a presença do grupamento amino no C-6.

A partir das análises dos espectros e comparação dados descritos na literatura (Tabela 2) foi possível identificar a substância Cs-1 como sendo a adenosina (CIUFFREDA; CASATI; MANZOCCHI, 2007); previamente isolada de espécies como *Allium tuberosum* (Amaryllidaceae) (PARK et al., 1992), *Oxytropis myriophylla* (Fabaceae) (LU et al., 2004), *Hosta longipes* (Asparagaceae) (KIM; KIM; LEE, 2014) e *Tinospora crispa* da família Menispermaceae (PRAMAN et al., 2012), este é seu primeiro relato em *Cissampelos sympodialis* Eichl.

Figura 14 – Estrutura da adenosina.

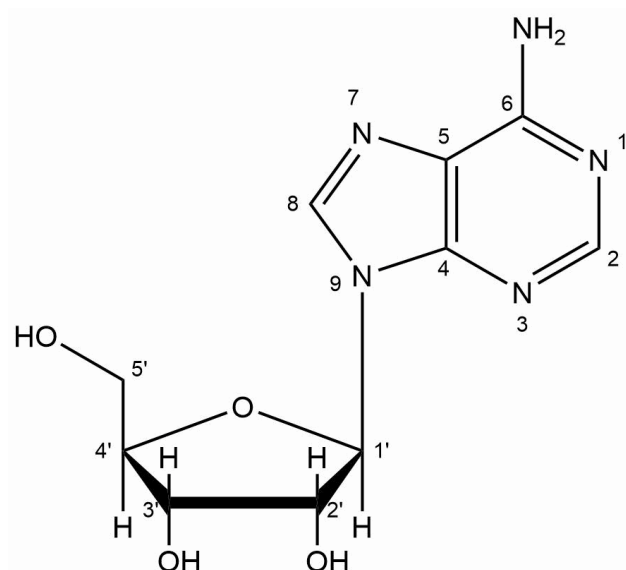


Tabela 2 – Dados de RMN (J em Hz, δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , em $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 comparados com os da literatura (CIUFFREDA; CASATI; MANZOCCHI, 2007).

Posição	HSQC		HMBC	(CIUFFREDA et al., 2007)	
	δ_{H}	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-	-
2	8,13 (s, 1H)	152,4	-	8,13 (s)	152,4
3	-	-	-	-	-
4	-	149,1	H-1', H-2, H-8	-	149,0
5	-	119,3	H-8, -NH ₂	-	119,3
6	-	156,1	H-2	-	156,2
7	-	-	-	-	-
8	8,33 (s, 1H)	139,9	H-1'	8.34 (s)	139,9
9	-	-	-	-	-
1'	5,87 (d, $J = 6,4$ Hz)	87,9	-	5,87 (d, $J = 6,2$ Hz)	87,9
2'	4,59 (m)	73,5	-	4,61 (ddd, $J = 5,1; 6,2; 6,3$ Hz)	73,4
3'	4,14 (m)	70,7	H-4'	4,14 (ddd, $J = 3,0; 4,6; 5,1$ Hz)	70,6
4'	3,96 (m)	85,9	-	3,96 (ddd, $J = 3,0; 3,6; 3,7$ Hz)	85,9
5'	a 3,65 (m) b 3,55 (m)	61,7	-	a 3,67 (ddd, $J = 3,6; 4,4; -12,1$ Hz) b 3,55 (ddd, $J = 3,7; 7,2; -12,1$ Hz)	61,6
-NH₂	7,32 (sl)	-	-		

Figura 15 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-1.

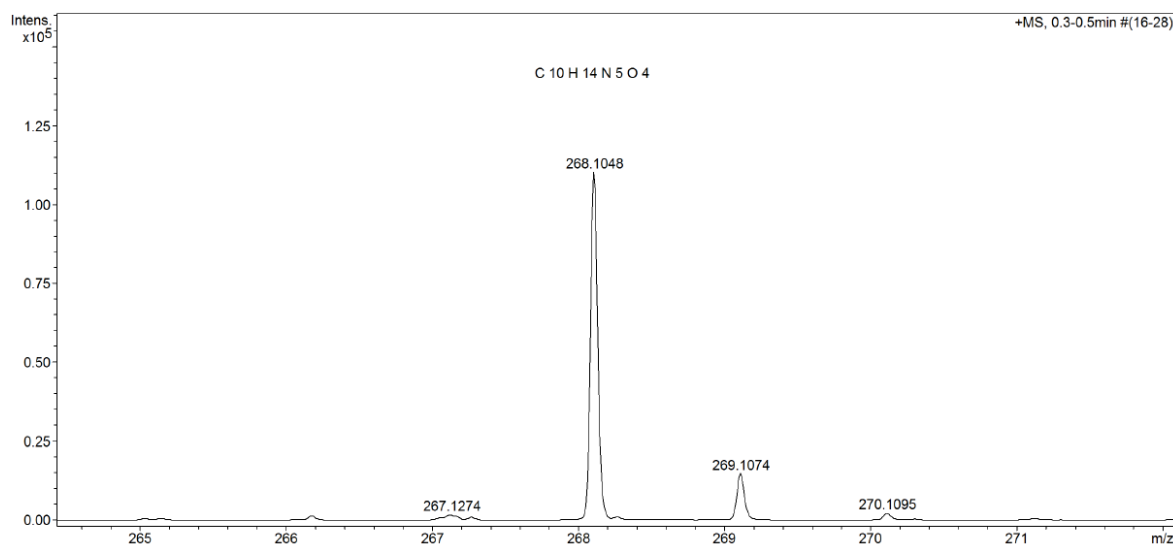


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.

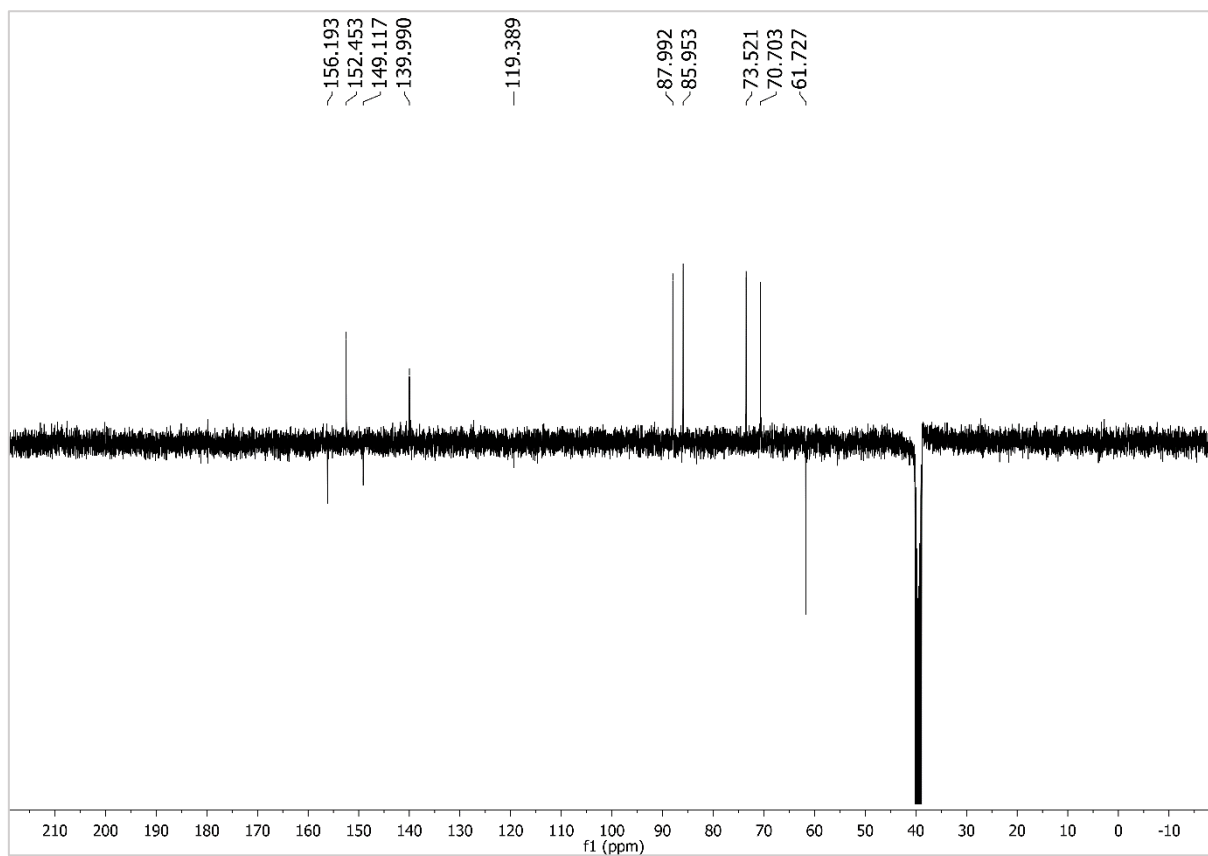


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.

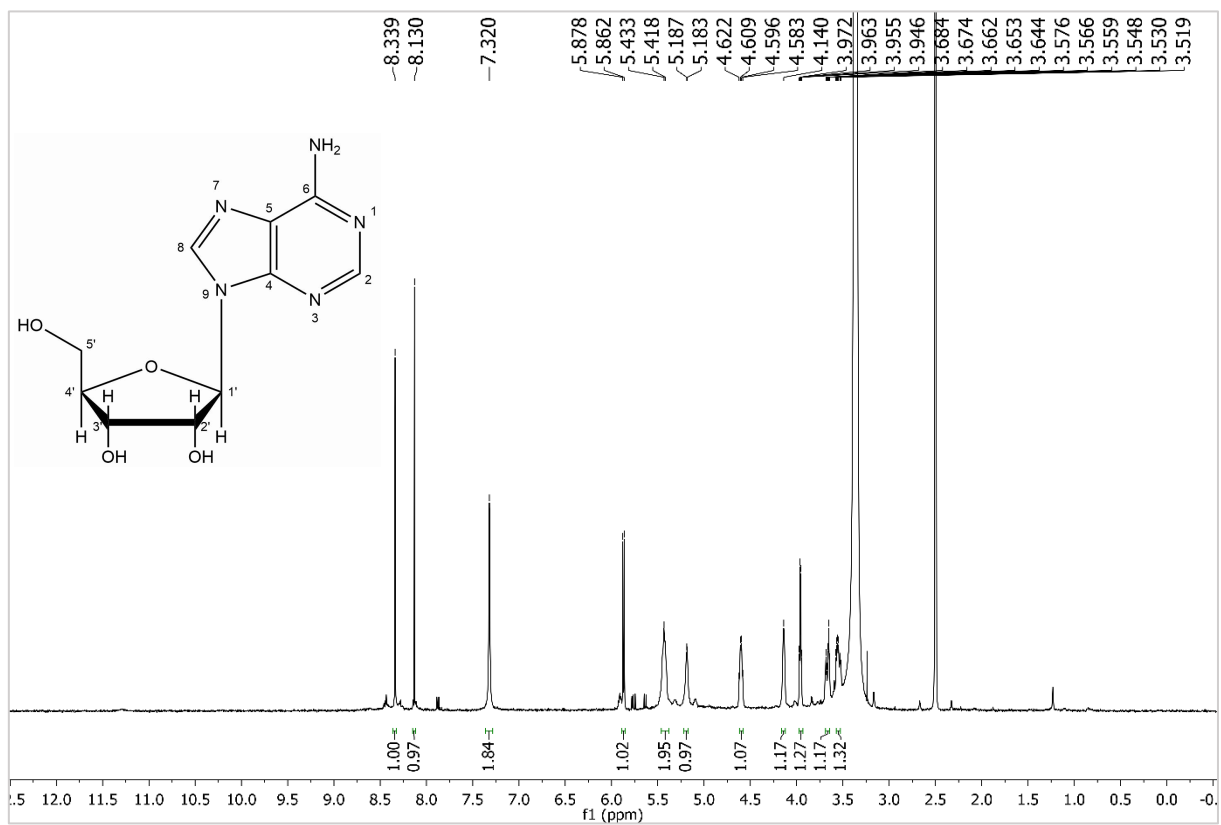


Figura 18 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 2,8 – 8,8 ppm.

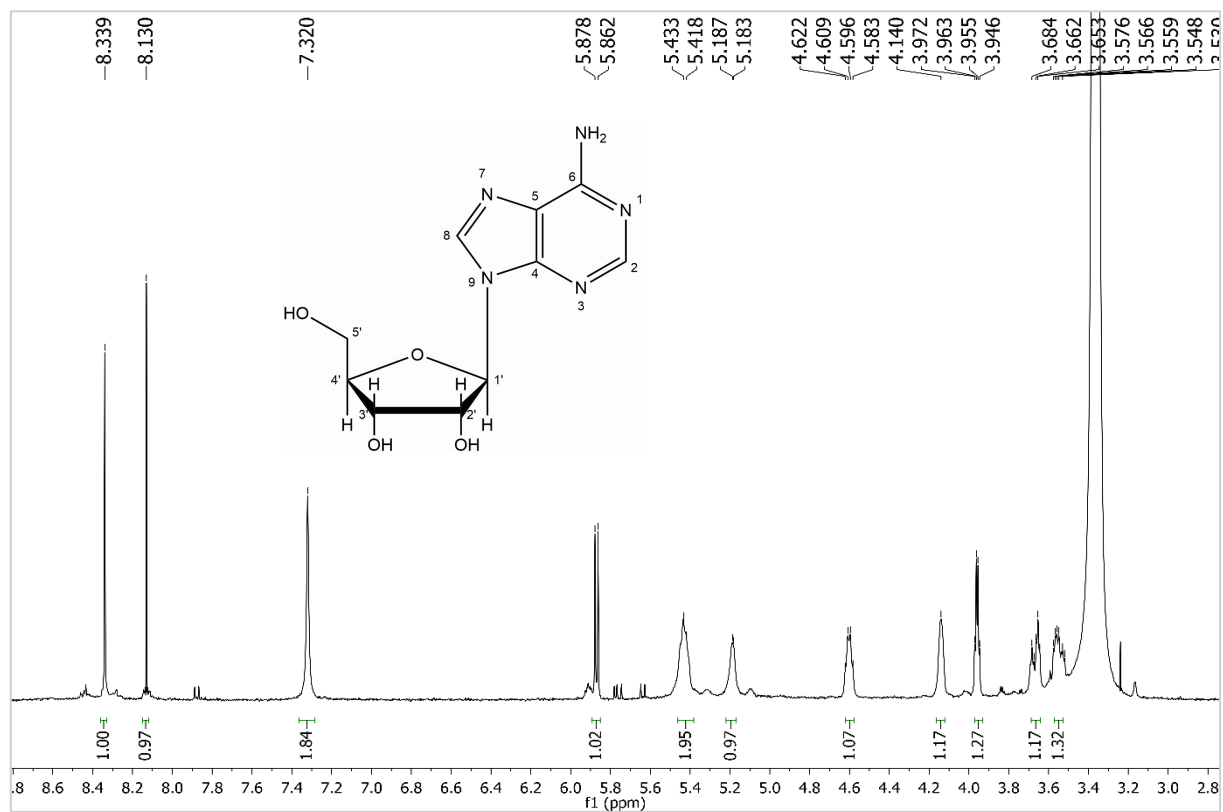


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 3,1 – 6,1 ppm.

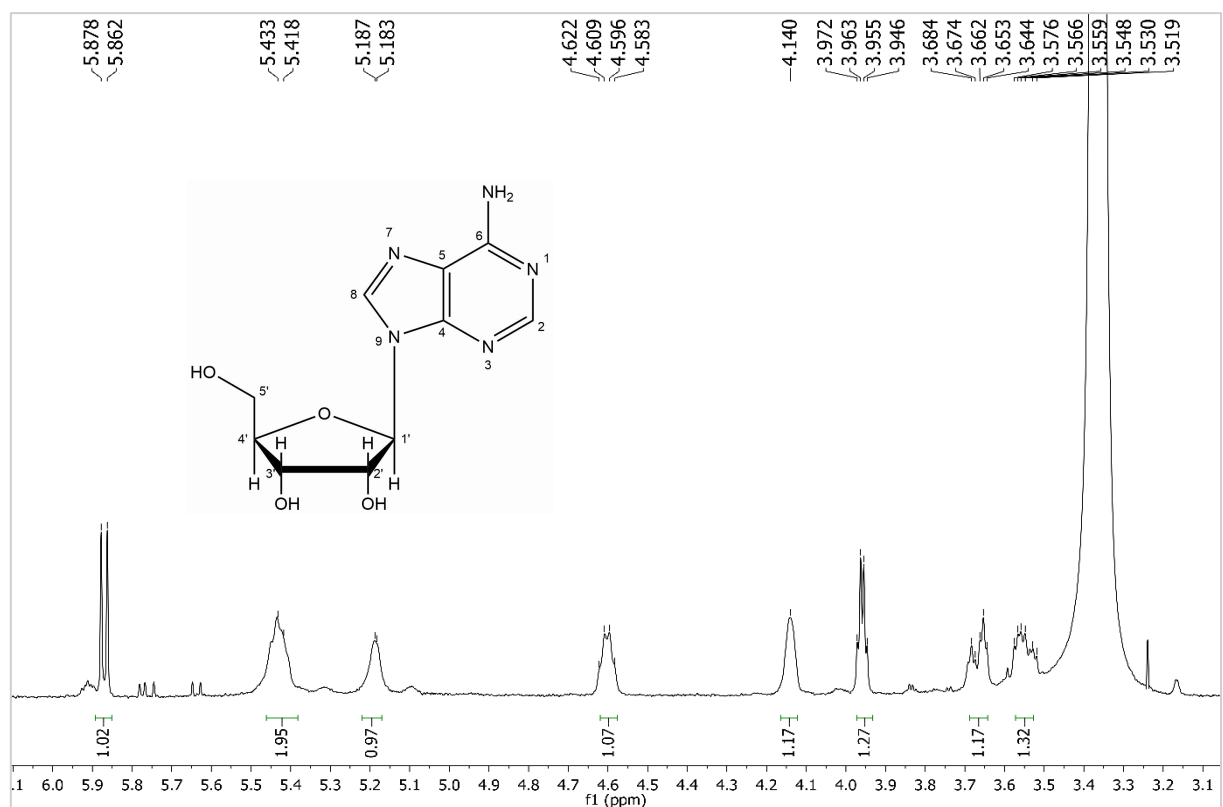


Figura 20 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.

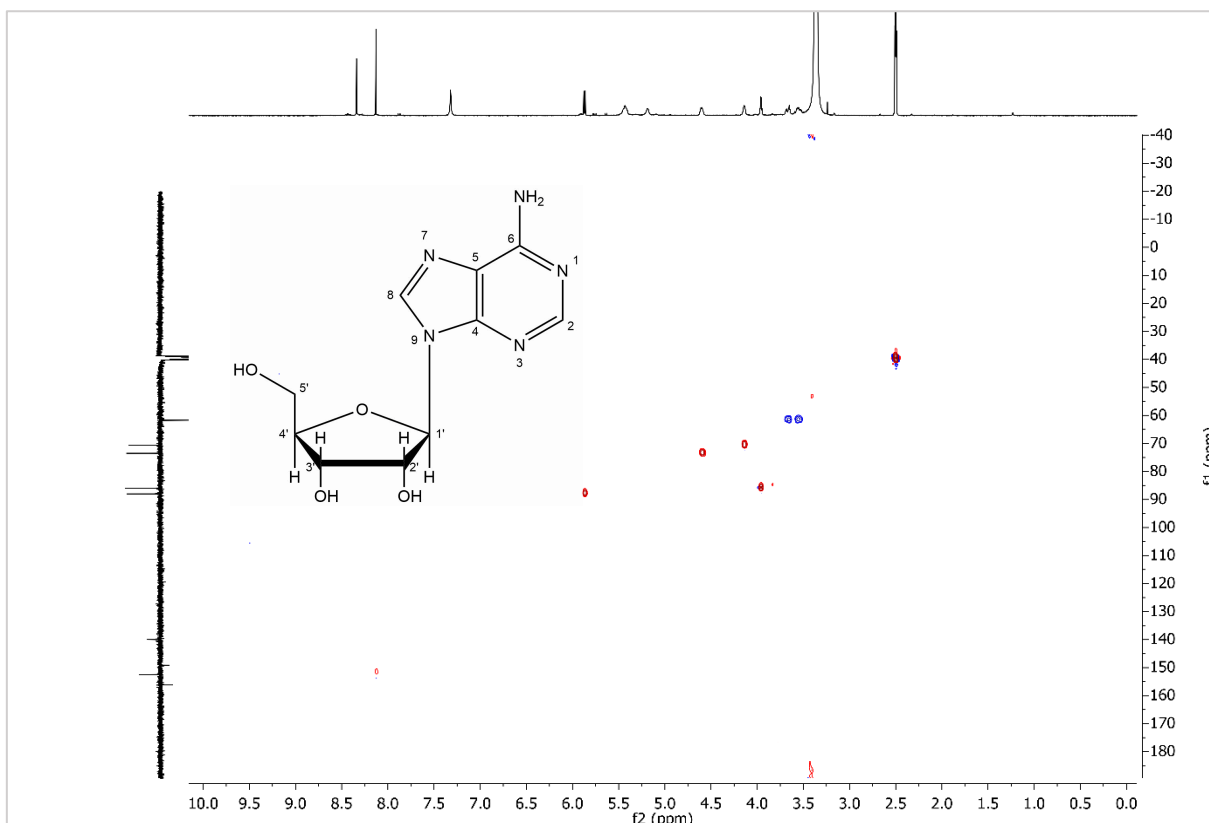


Figura 21 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 3,0 – 6,0 ppm x 45,0 – 95,0 ppm.

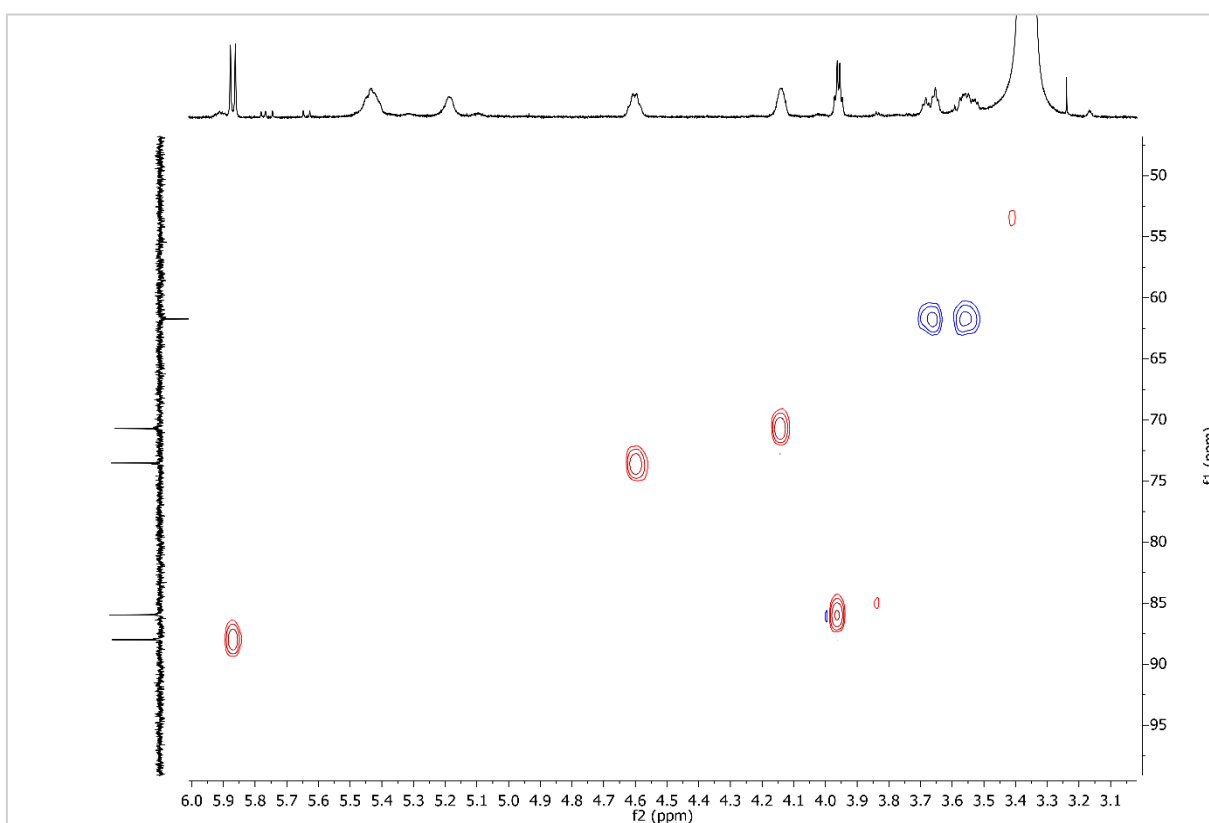


Figura 22 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1.

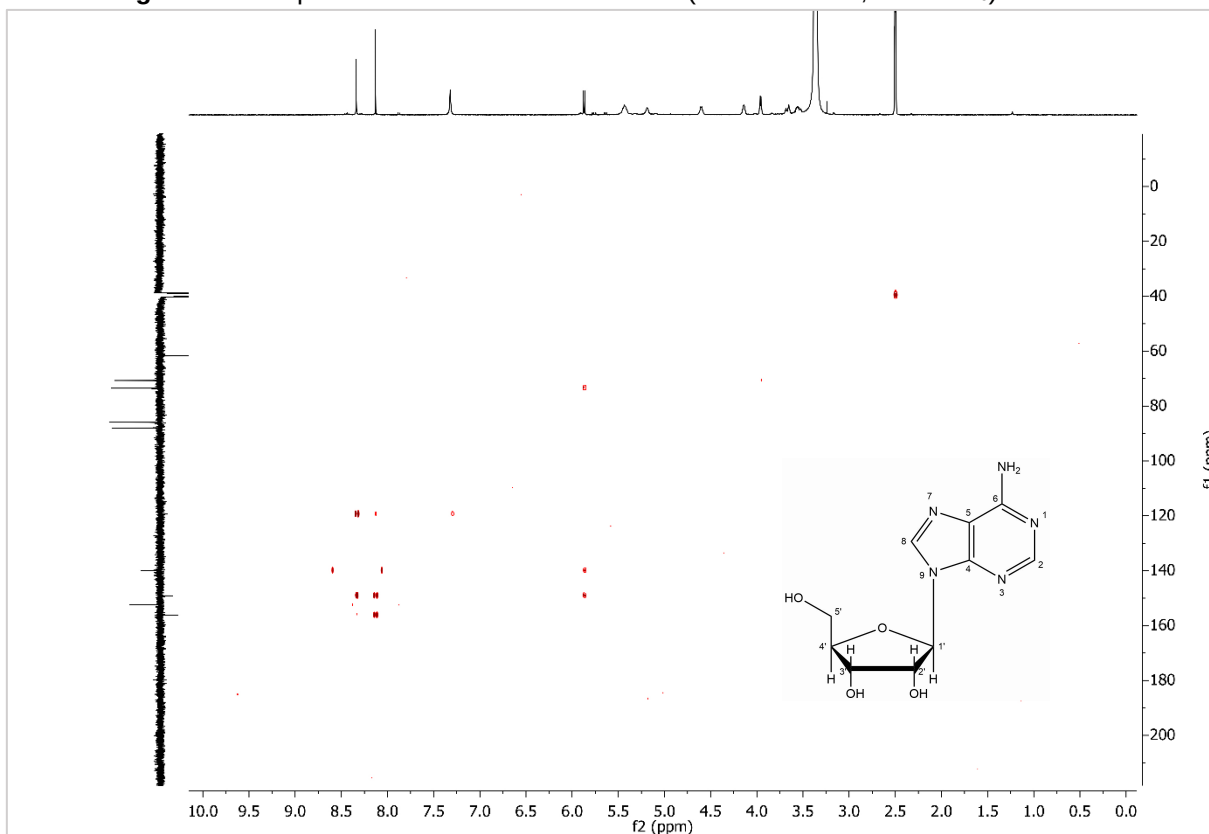


Figura 23 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 9,0 – 5,5 ppm x 60,0 – 160,0 ppm.

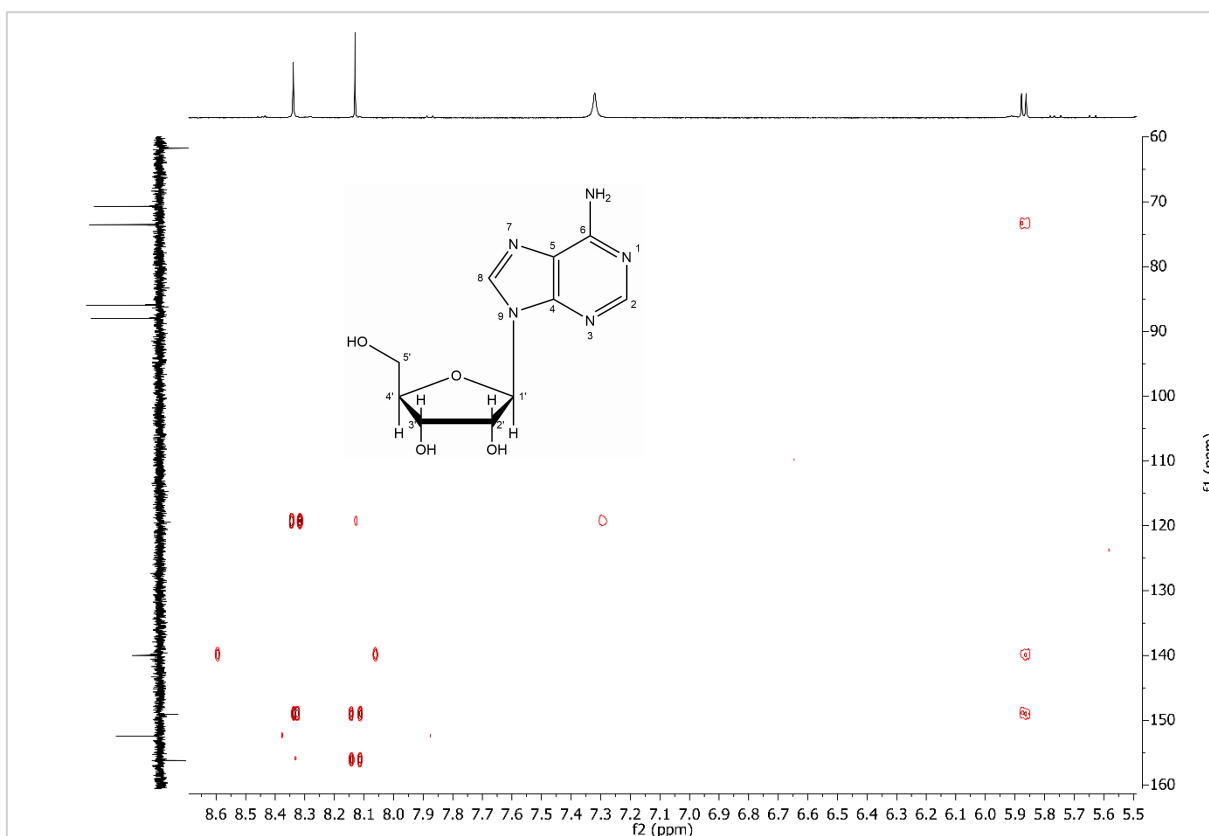
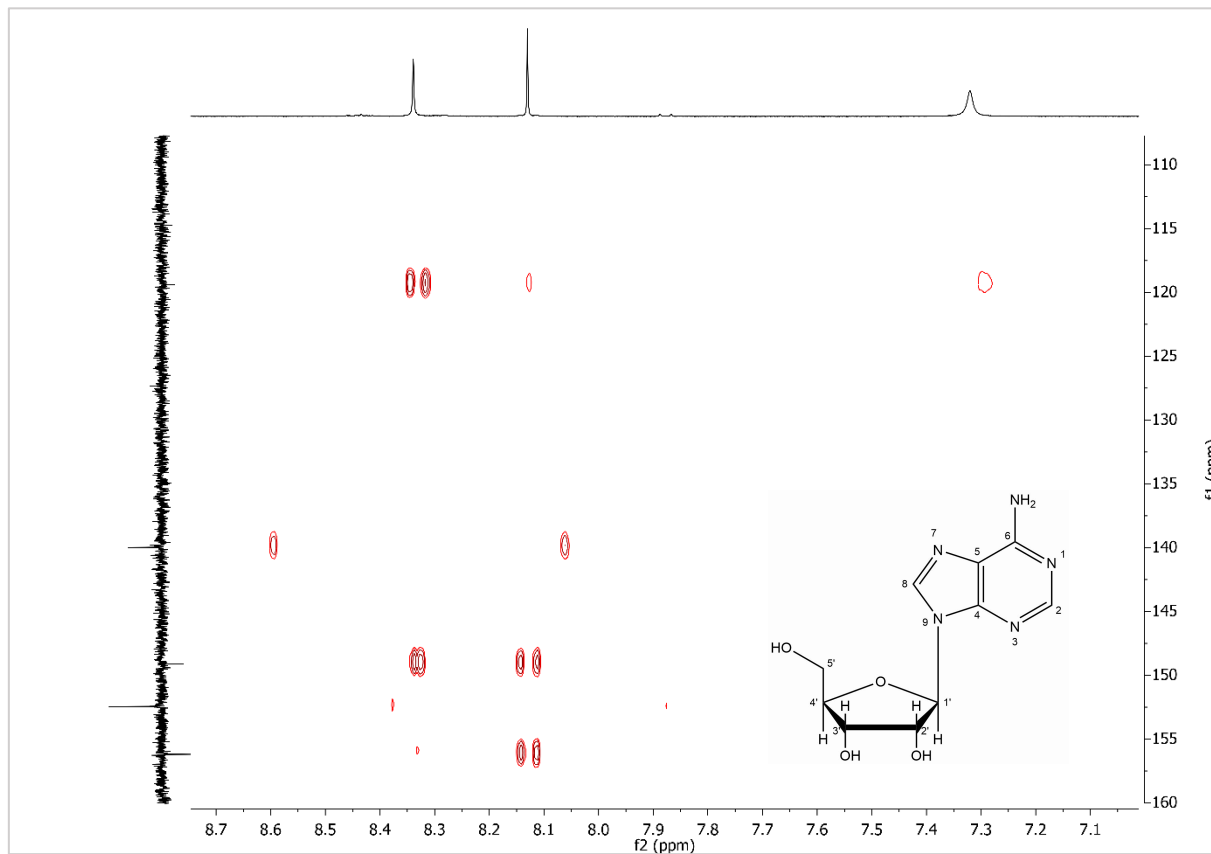


Figura 24 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-1 na região de 7,0 – 8,7 ppm x 110,0 – 160,0 ppm.



5.1.2. Identificação estrutural de Cs-2

A substância Cs-2, com tempo de retenção 48,58 min. (Pico 2, Figura 13, pág. 58), foi isolada na forma de um pó amarelado, pesando 8,64 mg. A análise em espectrometria de massas de alta resolução apresentou o íon molecular com m/z 593,1498 [M-H] compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{15}$ (massa calculada m/z 593,1512, erro de 2,4 ppm) (Figura 25).

No espectro de RMN de 1H (Figuras 29 – 31, pág. 77 e 78), obtido em $DMSO-d_6$ a 400 MHz, a análise inicial sugeriu que a substância Cs-2 trataria-se de composto com esqueleto flavonoídico. Dois dupletos vistos em δ_H 7,98 ($J = 8,4$ Hz) e δ_H 6,90 ($J = 8,4$ Hz) sugerem a presença de um anel aromático do tipo AA'BB', que foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente. Foi visto ainda, um singlete em δ_H 6,71 relativo ao hidrogênio H-3, sugerindo que o esqueleto trataria-se de uma flavona (LIMA, 2013).

A ausência de dois sinais entre δ_H 6,50 – 6,00 indica que as posições que seriam referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 estariam substituídas por outro radical e um sinal em δ_H 13,90 característico de hidroxila quelada na posição 5, sugerem a presença de um anel hexassubstituído. Os sinais presentes entre 3,0 – 4,0 ppm são indicativos da existência de unidades de açúcar na molécula; em δ_H 4,81 e 4,73 são visualizados sinais de prótons anoméricos de C-glicosídeos (H-1'' e H-1''', respectivamente) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; PATEL et al., 2018). Os dados verificados (Tabela 3, pág. 73) foram comparados com a literatura.

Dados de espectrometria de massas de baixa resolução contribuíram para identificação da substância Cs-2 por meio da fragmentação característica da molécula (Figura 26, pág. 74).

Figura 25 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-2.

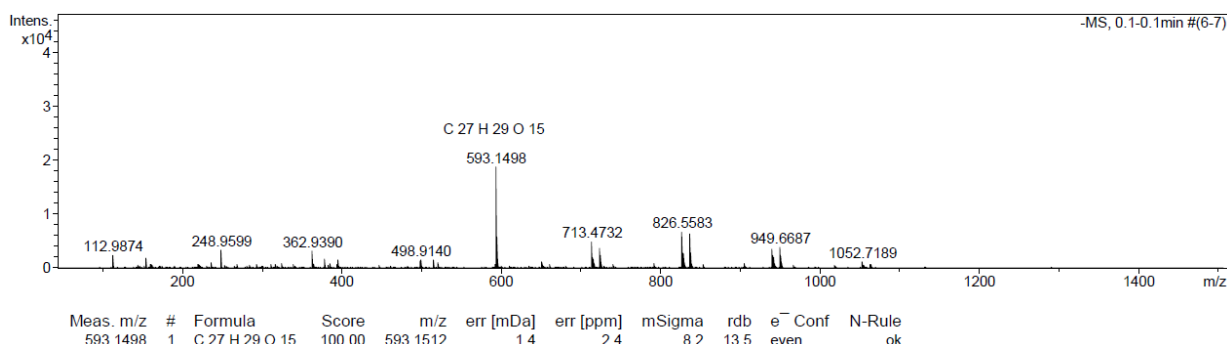


Tabela 3 - Dados de RMN ^1H (J em Hz e δ em ppm, 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-2 em comparação com a literatura.

	Cs-2	(ISLAM et al., 2014)
Posição	δ_{H}	δ_{H}
2	-	-
3	6,71 (s, 1H)	6,81 (s, 1H)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,98 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	8,03 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
3'	6,89 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	6,91 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
4'	-	-
5'	6,89 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	6,91 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
6'	7,98 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	8,03 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
1''	4,81 (sl, 1H)	4,80 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz)
2''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
3''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
4''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
5''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
6''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
1'''	4,73 (sl, 1H)	4,75 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz)
2'''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
3'''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
4'''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
5'''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)
6'''	3,16 – 3,74 (m, 1H)	3,50 – 3,86 (m, 1H)

Para obter a fragmentação da substância, foi preparada uma amostra na concentração de 1mg.mL^{-1} da amostra CsFHM 6-7, de acordo com o tópico 4.9.1.

No estudo de Cs-2 por análise sequencial por espectrometria de massas (EM^3) (Figura 26, pág. 74), foi observado íon molecular $593,10 [\text{M}-\text{H}]^-$. Em EM^2 foram vistos os íons produtos: m/z 575,09 $[\text{M} - \text{H} - 18]^-$ pela perda de água por rearranjo remoto de hidrogênio; e íons com perdas características de C-glicosídeos, de 120 Da ($-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$) e 90 Da ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), referentes à unidade osídica da molécula; m/z 503,04, $[\text{M} - \text{H} - 90]^-$ e m/z 473,05 $[\text{M} - \text{H} - 120]^-$; m/z 455,07; m/z 413; m/z 383,03 $[\text{M} - \text{H} - 90 - 120]^-$; e m/z 353,03 $[\text{M} - \text{H} - 120 - 120]^-$ (SILVA et al., 2014).

O íon m/z 353,03 $[M - H - 120 - 120]^-$ originou, em EM³, os íons m/z 325,01 $[M - H - 120 - 120 - 28]^-$, pela perda de monóxido de carbono (CO) e m/z 297,03 01 $[M - H - 120 - 120 - 28 - 28]^-$, pela perda de duas unidades de CO (WANG et al., 2019). Os fragmentos propostos podem ser visualizados na Figura 27 (pág. 75) e Figura 32 (pág. 79).

Figura 26 – Perfil de fragmentação de Cs-2 por CLAE-EM-ESI-EM³.

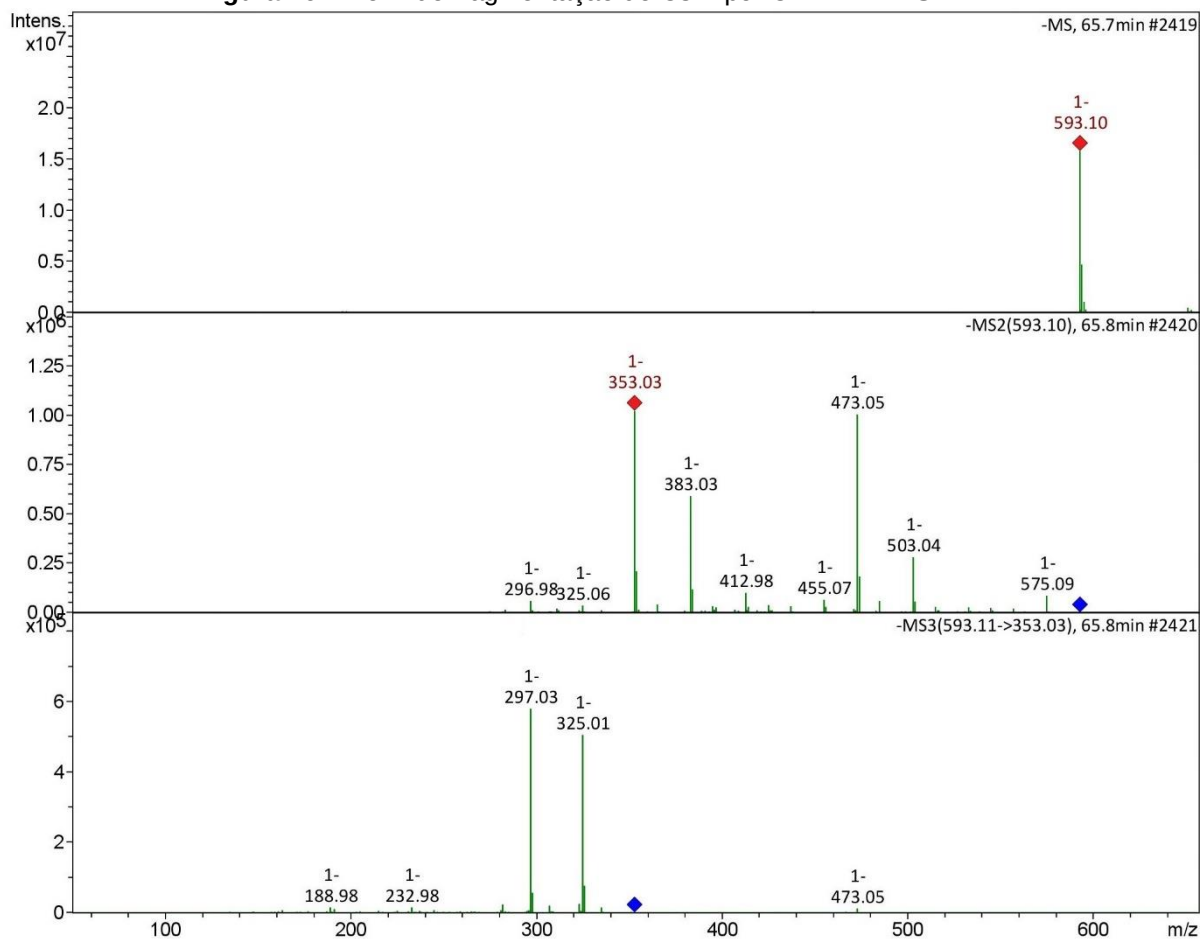
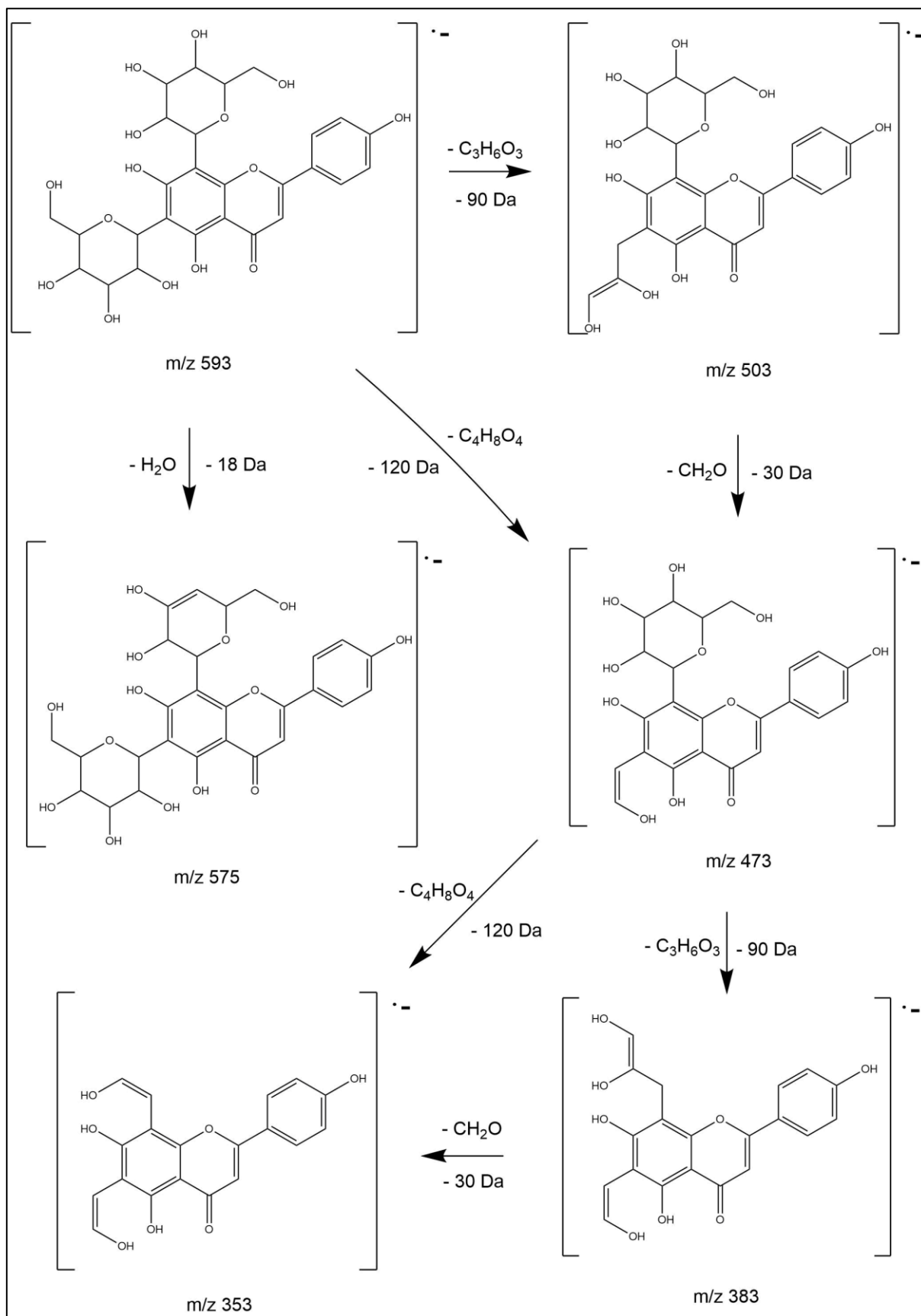


Figura 27 – Proposta de fragmentação da vicenina-2 no modo negativo (Silva et al., 2014).



Após a análise de RMN de ^1H e dados de espectrometria de massas pôde-se propor que a substância Cs-2 trata-se da 6,8-Di-C-glicosilapigenina ou vicienina-2.

A presença de vicienina-2 já havia sido em plantas da família Lamiaceae, como *Origanum majonara* e na família Asteraceae, como por exemplo, *Medicago truncatula* (HUSAIN; MARKHAM, 1981; STOCHMAL et al., 2009), contudo esse é o primeiro relato da substância em *C. sympodialis* e no gênero *Cissampelos*.

Figura 28 – Estrutura da vicienina-2.

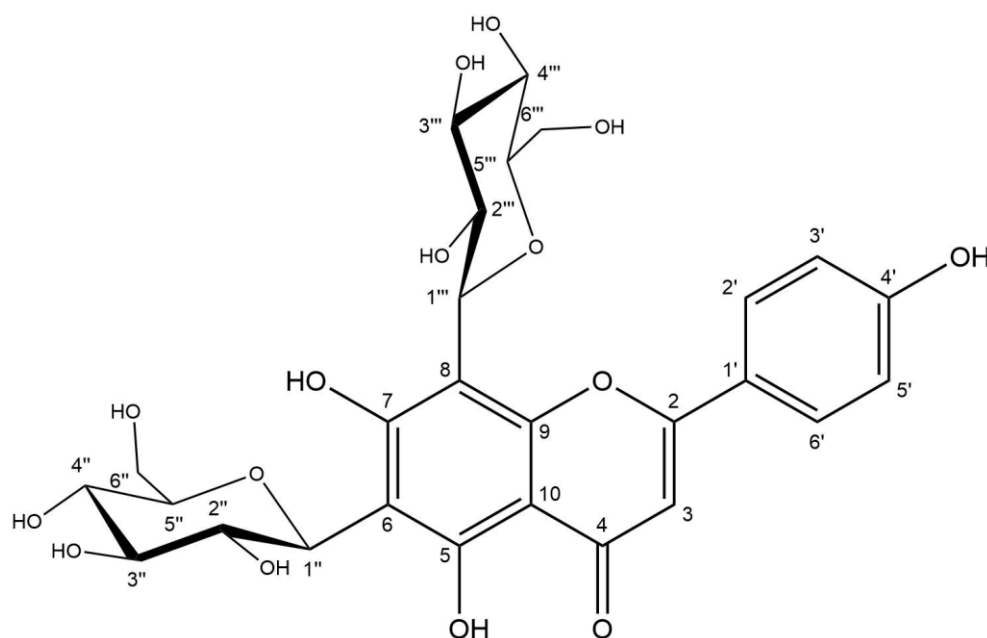


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-2.

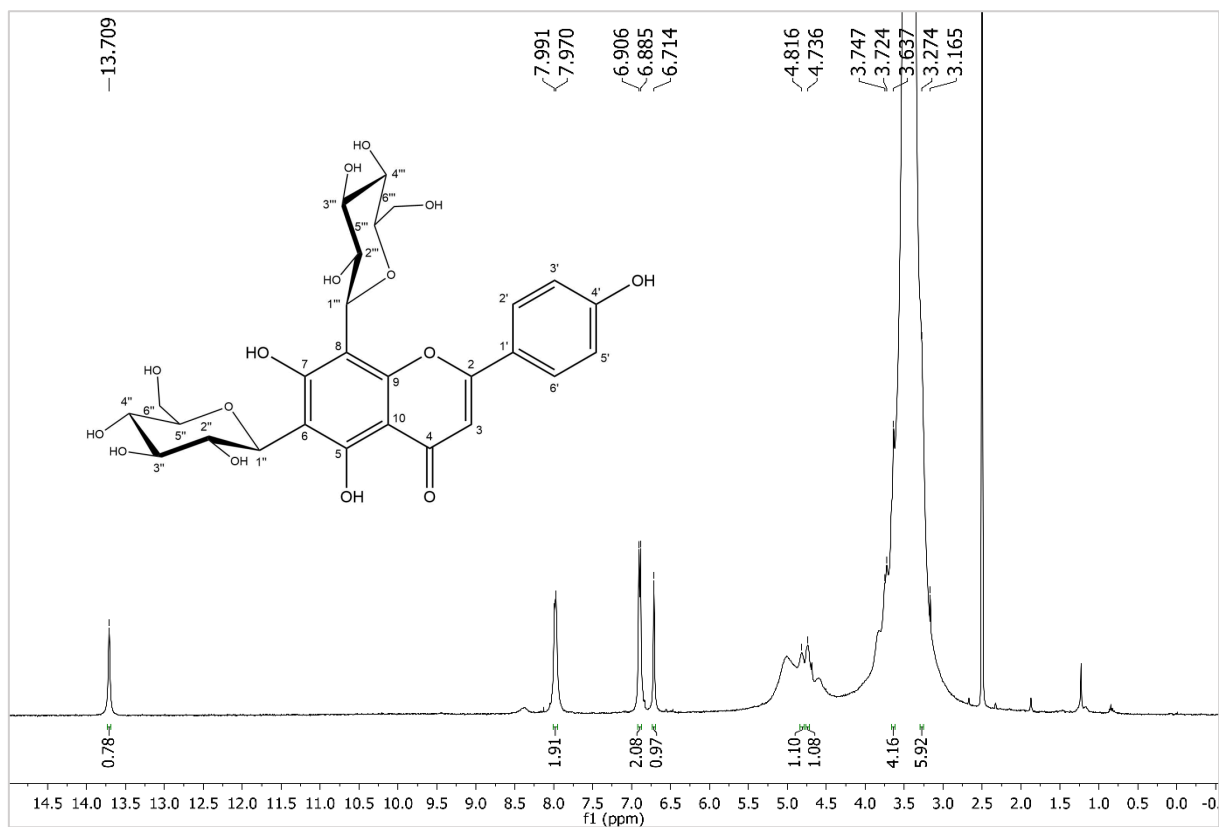


Figura 30 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-2 na região de 6,0 – 14,5 ppm.

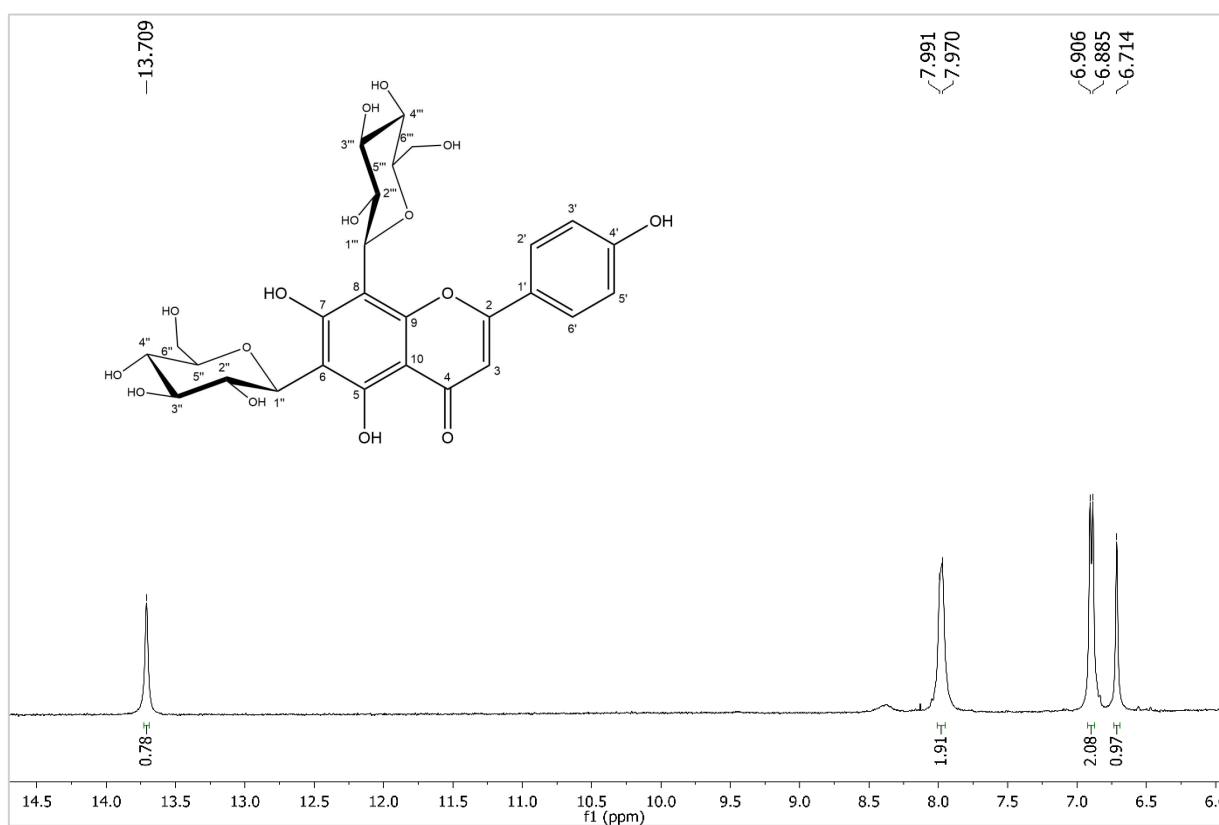


Figura 31 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-2 na região de 2,6 – 5,6 ppm.

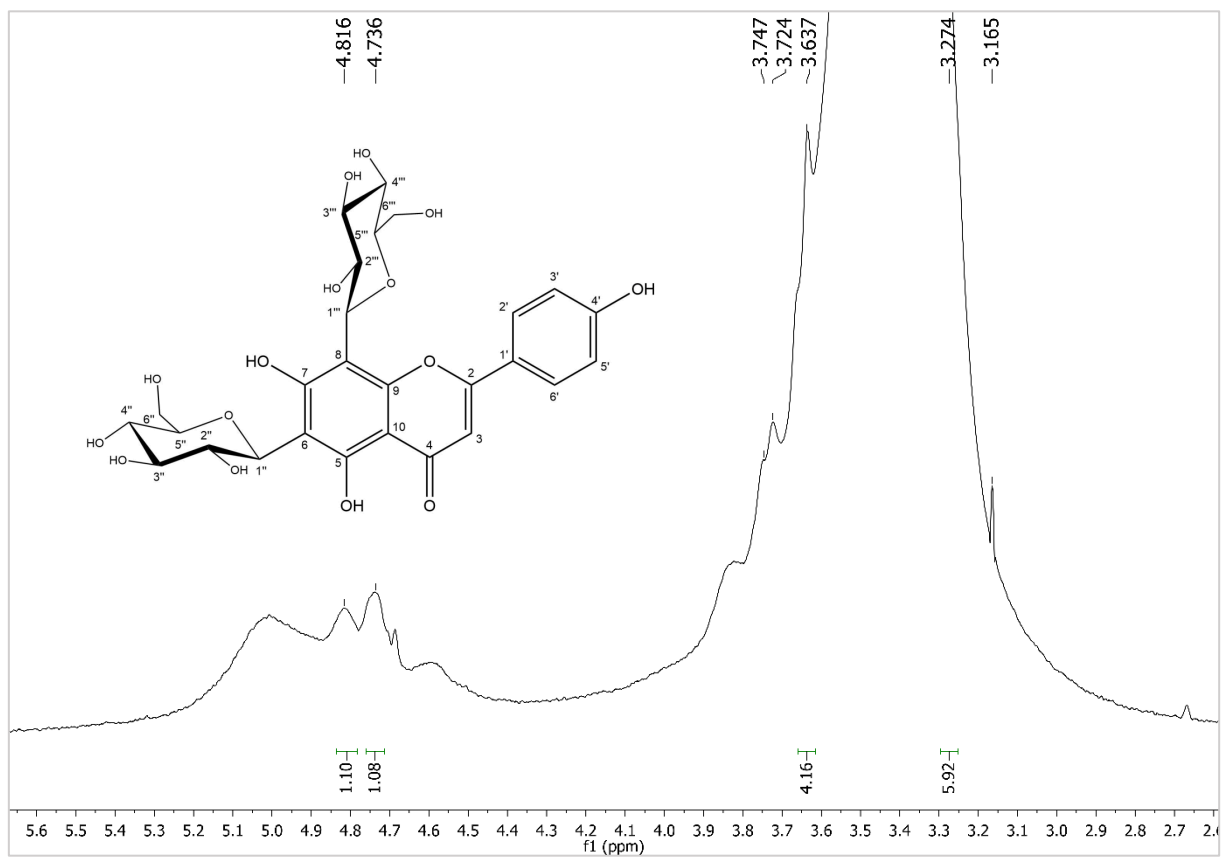
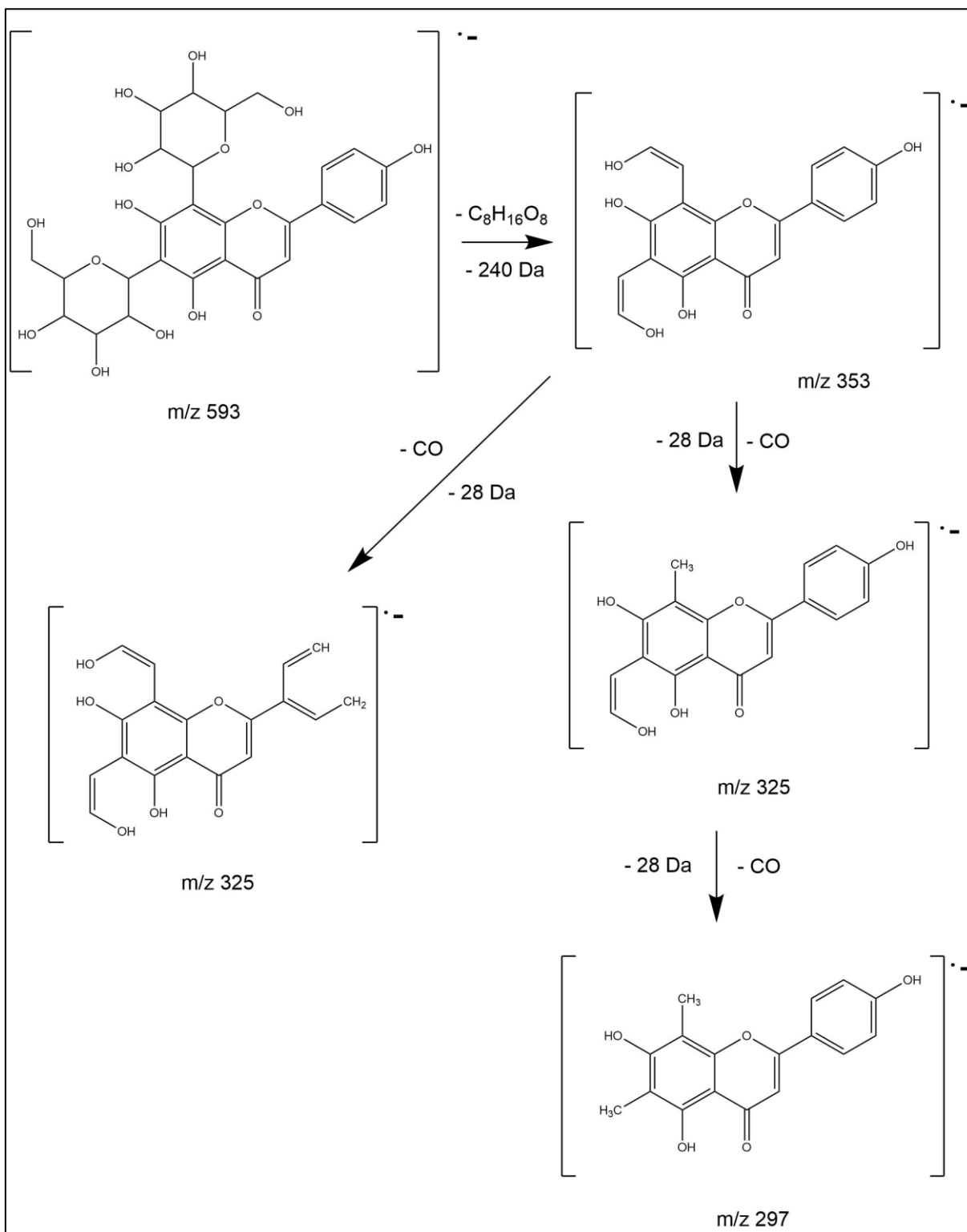


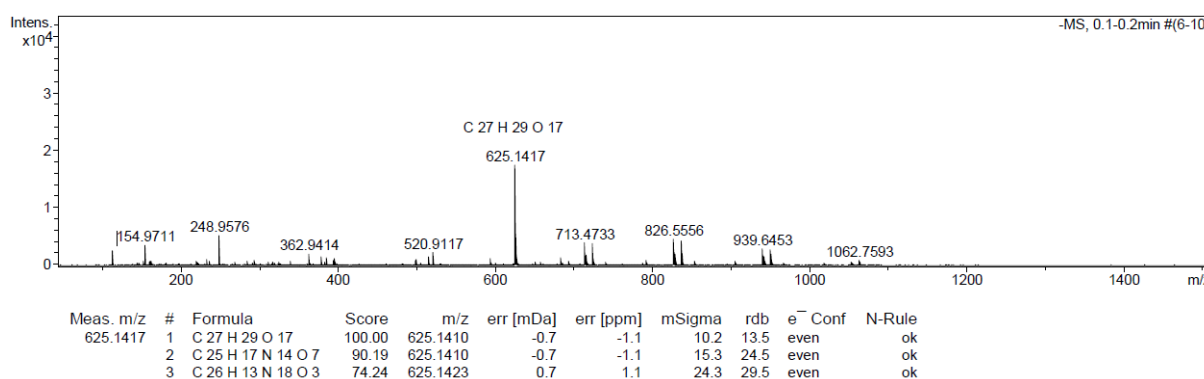
Figura 32 – Proposta de fragmentação da vicenina-2 ($593 [M-H]^-$) no modo negativo.



5.1.3. Identificação estrutural de Cs-3

A substância Cs-3, pico 3 em 66,97 min. (Pico 3, Figura 13, pág. 58), foi isolada na forma de um pó amarelo, pesando 11,64 mg. O espectro de massas de alta resolução exibiu um pico do íon molecular com 625,1417 [M-H]⁻ compatível com a fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₇ (massa calculada m/z 625,1410 e erro de -1,1 ppm) (Figura 33).

Figura 33 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-3.



O espectro de RMN de ¹³C foi obtido em DMSO-*d*₆ a 125 MHz, pela técnica ¹³C-APT (Figuras 35 – 38, pág. 84 e 85). O espectro apresentou 25 sinais, desses, 14 referentes a uma aglicona e 11 às unidades osídicas; ainda, foram visualizados 14 sinais atribuídos a carbonos metínicos (cinco *sp*² e nove *sp*³) e outros 11 sinais (nove *sp*² e dois *sp*³), dos quais nove foram atribuídos a carbonos não hidrogenados e dois a carbonos metilênicos. Os 14 sinais sugerem um esqueleto flavonoídico, onde os sinais em δ_C 148,6 e 144,9 indicam a oxigenação nos carbonos C-4' e C-3' do anel B, respectivamente, sugerindo que Cs-3 seria um derivado da quercetina. Os sinais em δ_C 161,2, 98,8, 164,3 e 93,7 foram atribuídos a carbonos do anel A, respectivamente, C-5, C-6, C-7 e C-8, evidenciando o padrão de substituição nos carbonos C-5 e C-7 que se mostram mais desprotegidos (MARKHAM; TERNAL, 1976; SARASWATHI; SARAVANAN; SANTHAKUMAR, 2017).

A presença de sinais referentes a carbonos *sp*³ entre δ_C 60 – 80 ppm indicam a existência de unidade de açúcar na molécula. Os carbonos com sinais em δ_C 60,9 e 67,1 foram atribuídos a carbonos metilênicos, apontando a existência de duas unidades osídicas ligadas à molécula; sinais de carbonos anoméricos em δ_C 102,9 (C-

1''') e 101,9 (C-1'') reforçam a premissa das duas unidades de açúcar (ZHU et al., 2013).

No espectro de ^1H (Figuras 39 – 42, pág. 86 e 87), obtido em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz, foi possível visualizar um duplo duplete em δ_{H} 7,64 ($J = 8,5 \text{ Hz}; 2,0 \text{ Hz}$) e dois dupletos em δ_{H} 7,53 ($J = 2,0 \text{ Hz}$) e δ_{H} 6,81 ($J = 8,5 \text{ Hz}$), respectivamente, referentes aos hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B; observando os valores de constante de acoplamento nota-se que o sinal de H-6' acopla em *orto* com H-5' e em *meta* com H-2', todos esses dados reforçam que o anel B dispõe de um sistema ABX (PAVIA, 2015). No anel A foram vistos dois dupletos acoplando em *meta* em δ_{H} 6,39 ($J = 2,0 \text{ Hz}$) e δ_{H} 6,18 ($J = 1,5 \text{ Hz}$), atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. Um conjunto de sinais sobrepostos entre δ_{H} 2,80 – 4 ppm foram atribuídos à presença de unidades açúcar, dois dupletos de hidrogênios anoméricos, H-1'' e H-1''' em δ_{H} 5,32 ($J = 8,0 \text{ Hz}$) e 4,06 ($J = 8,0 \text{ Hz}$), respectivamente, confirmam a ligação de duas unidades ligadas à molécula (MABRY; KAGAN; ROSLER, 1964). As constantes de acoplamento ($J = 8,0 \text{ Hz}$) foram condizentes com unidades com configuração β (BRITO-ARIAS, 2016).

O mapa de contornos heteronuclear HSQC (Figuras 43 – 45, pág. 88 e 89) mostrou as correlações do hidrogênio δ_{H} 7,64 (H-6') com o carbono δ_{C} 122,0 (C-6'), δ_{H} 7,53 (H-2') com o carbono δ_{C} 115,3 (C-2') e δ_{H} 6,81 (H-5') com o carbono δ_{C} 122,0 (C-5'), conferindo o padrão de substituição do anel B. As correlações entre o hidrogênio H-8 em δ_{H} 6,39 com o carbono C-8 em δ_{C} 93,7 e o hidrogênio H-6 em δ_{H} 6,18 com o carbono C-6 em δ_{C} 98,8 evidenciaram o padrão de substituição do anel A. Os hidrogênios anoméricos mostraram correlação com os carbonos anoméricos: H-1'' em δ_{H} 5,32 com o carbono C-1'' em δ_{C} 101,9 e o hidrogênio H-1''' em δ_{H} 4,06 com o carbono C-1''' em δ_{C} 102,9. Foi possível atribuir os valores de deslocamento dos hidrogênios metilênicos: os hidrogênios em δ_{H} 3,75 e δ_{H} 3,41 correlacionam-se com o carbono C-6'' em δ_{C} 67,1 e os hidrogênios em δ_{H} 3,57 e δ_{H} 3,37 correlacionam-se com o carbono C-6''' em δ_{C} 60,9.

No mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figuras 46 – 48, pág. 89 e 90) foram vistas as correlações do hidrogênio H-6 em δ_{H} 6,18 com o carbono C-8 em δ_{C} 93,7 e do hidrogênio H-8 em δ_{H} 6,39 com o carbono C-6 em δ_{C} 98,8 do anel A. O anel B se caracterizou pela correlação do hidrogênio H-2' com os carbonos C-3', C-4', C-6' e C-2. A correlação do próton anomérico H-1'' em δ_{H} 5,32 com o carbono C-3 em δ_{C} 133,5, confirmou a inserção da unidade osídica na posição C-3; e ainda, a correlação

do hidrogênio anomérico H-1''' em δ_H 4,06 com o carbono C-6'' em δ_H 67,1 da galactose.

Por meio da comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, utilizando técnicas de espectrometria de massas e dados da literatura, foi possível sugerir que a substância Cs-3 tratava-se de quercetina-3-O- β -glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo (NAWWAR; EL-MOUSALLAMY; BARAKAT, 1989).

Os dados mencionados até então e outras informações acerca dos espectros de 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais podem ser encontrados na Tabela 4.

A substância já foi relatada nas espécies *Solanum nigrum* (Solanaceae) e *Lepidium sativum* (Brassicaceae) (NAWWAR; EL-MOUSALLAMY; BARAKAT, 1989; AGARWAL; VERMA, 2011), no entanto, é o primeiro relato no gênero *Cissampelos*.

Figura 34 – Estrutura da quercetina-3-O- β -glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo.

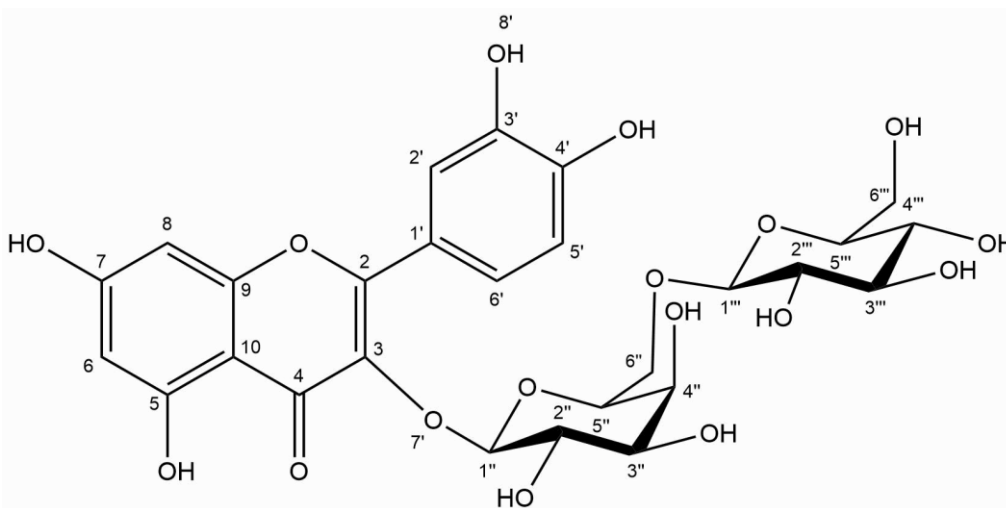


Tabela 4 – Dados de RMN (J em Hz e δ em ppm, 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) de Cs-3 comparados com da literatura (NAWWAR; EL-MOUSALLAMY; BARAKAT, 1989).

Posição	HSQC		HMBC	(NAWWAR et al., 1989)	
	δ_{H}	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	δ_{H}	δ_{C}
2	-	156,4	H-2', H-6'	-	156,3
3	-	133,5	H-1''	-	133,5
4	-	177,4	-	-	177,4
5	-	161,2	H-6	-	161,2
6	6,18 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz)	98,8	H-8	6,20 (d, $J = 2,5$ Hz)	98,6
7	-	164,3	H-6, H-8	-	164,1
8	6,39 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz)	93,7	H-6	6,40 (d, $J = 2,5$ Hz)	93,5
9	-	156,4	H-8	-	156,3
10	-	103,9	H-6, H-8	-	104,1
1'	-	121,1	H-5'	-	121,0
2'	7,53 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz)	115,3	-	7,52 (d, $J = 2,5$ Hz)	115,2
3'	-	144,9	H-2', H-5', H-6'	-	144,8
4'	-	148,6	H-2', H-5', H-6'	-	148,4
5'	6,81 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz)	116,0	H-6'	6,82 (d, $J = 7,5$ Hz)	115,9
6'	7,64 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz; 2,0 Hz)	122,0	H-2'	7,68 (dd, $J = 2,5$ Hz; 7,5 Hz)	121,9
1''	5,32 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz)	101,9	H-2''	5,32 (d, $J = 8$ Hz)	102,2
2''	2,80 – 3,77 (m)	71,2	-	3,3 – 3,75 (m)	71,3
3''	2,80 – 3,77 (m)	73,3	-	3,3 – 3,75 (m)	73,5
4''	2,80 – 3,77 (m)	67,9	-	3,3 – 3,75 (m)	68,3
5''	2,80 – 3,77 (m)	73,9	-	3,3 – 3,75 (m)	73,9
6''	2,80 – 3,77 (m)	67,1	H-1'''	3,3 – 3,75 (m)	67,3
1'''	4,06 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz)	102,9	-	4,08 (d, $J = 7,5$ Hz)	103,2
2'''	2,80 – 3,77 (m)	73,0	-	3,3 – 3,75 (m)	74,2
3'''	2,80 – 3,77 (m)	76,6	-	3,3 – 3,75 (m)	76,8
4'''	2,80 – 3,77 (m)	69,9	-	3,3 – 3,75 (m)	70,0
5'''	2,80 – 3,77 (m)	76,6	-	3,3 – 3,75 (m)	76,8
6'''	2,80 – 3,77 (m)	60,9	-	3,3 – 3,75 (m)	61,1

Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3.

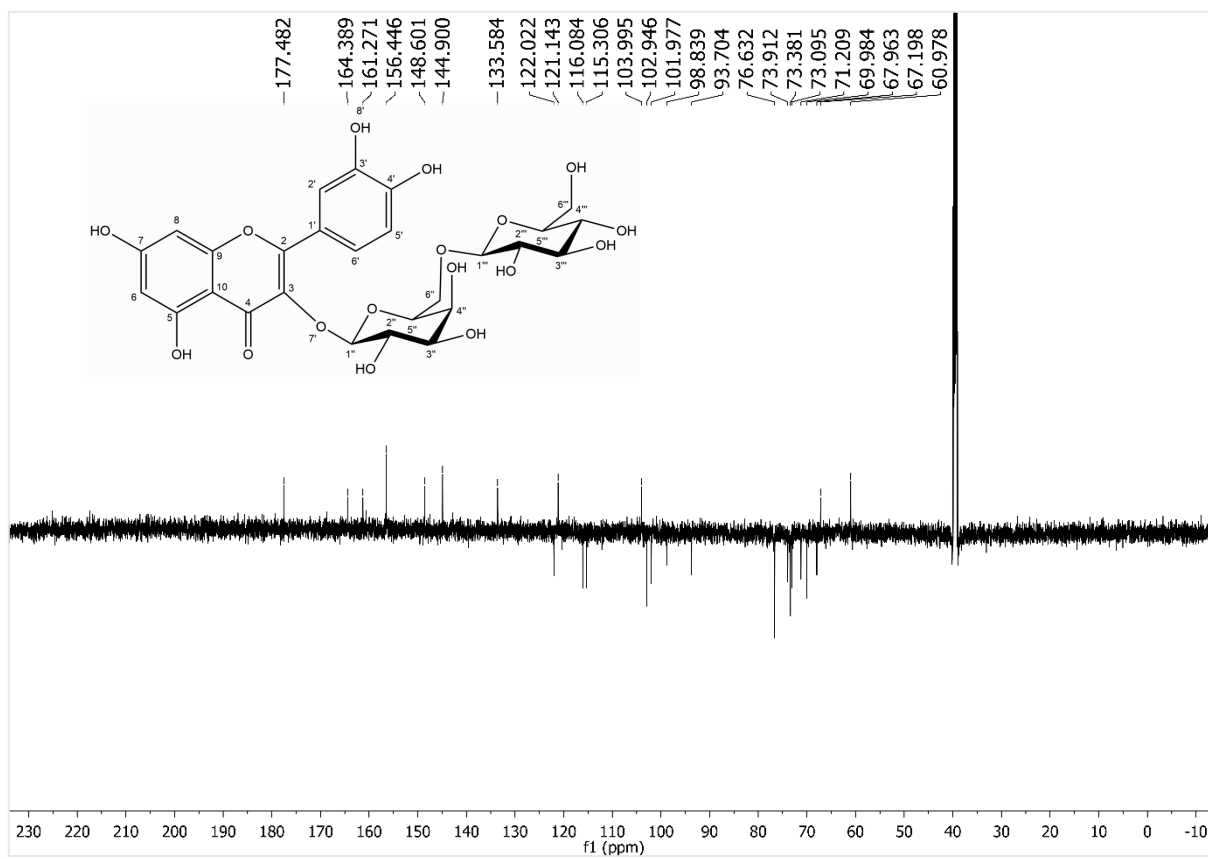


Figura 36 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 60,0 – 180,0 ppm.

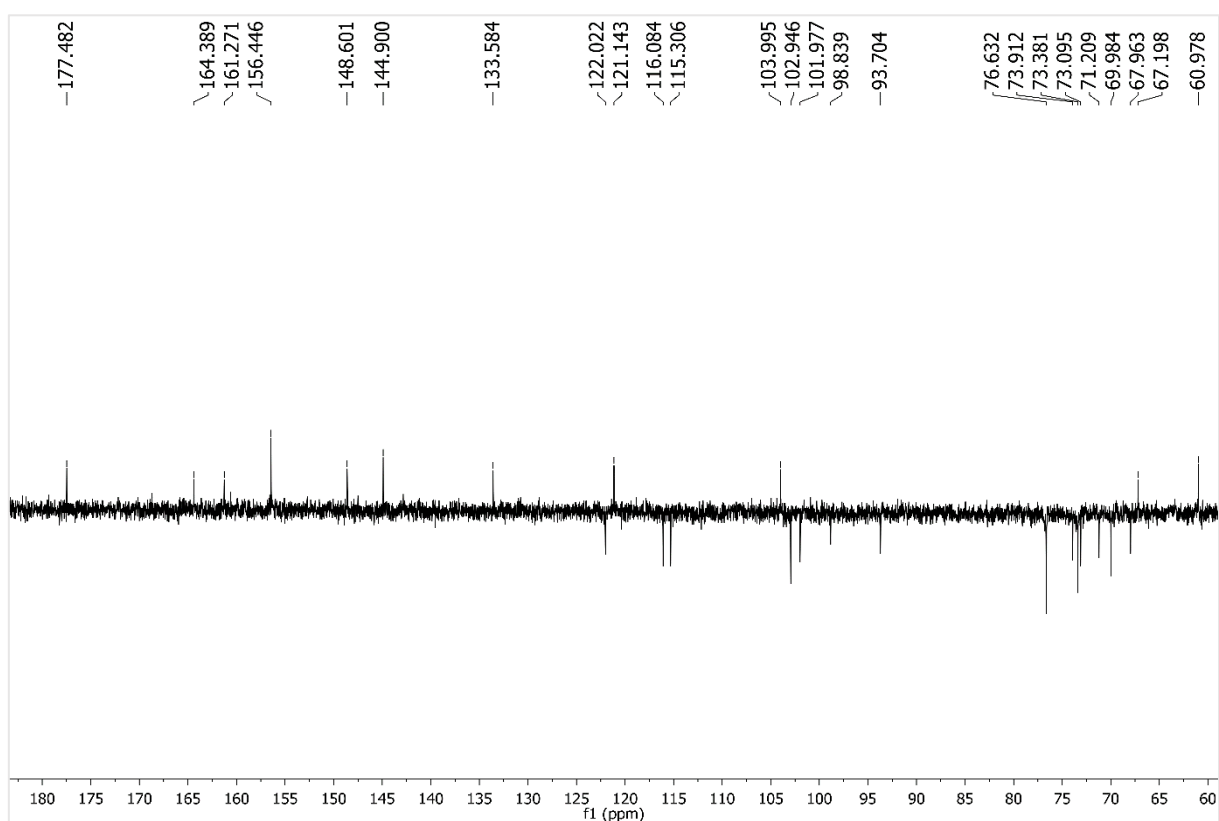


Figura 37 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 95,0 – 180,0 ppm.

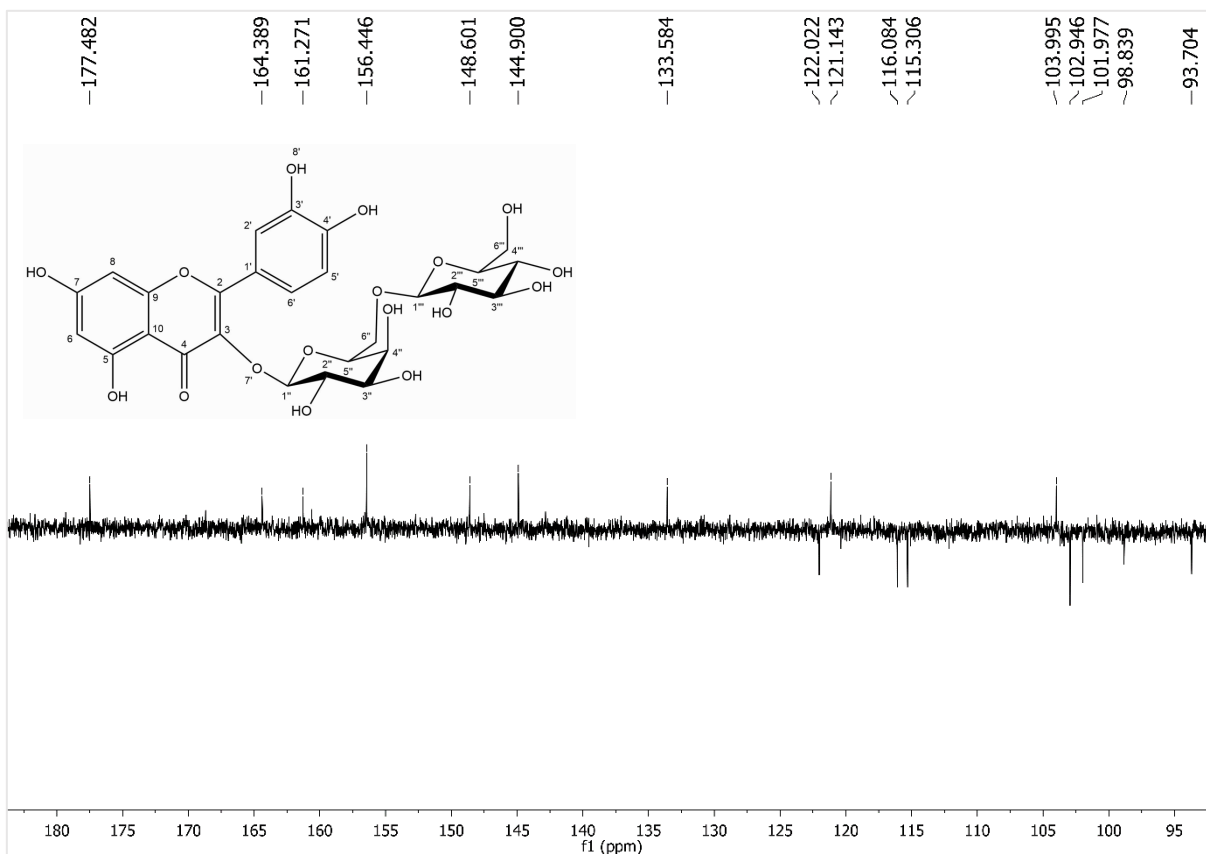


Figura 38 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 60, 0 – 107,0 ppm.

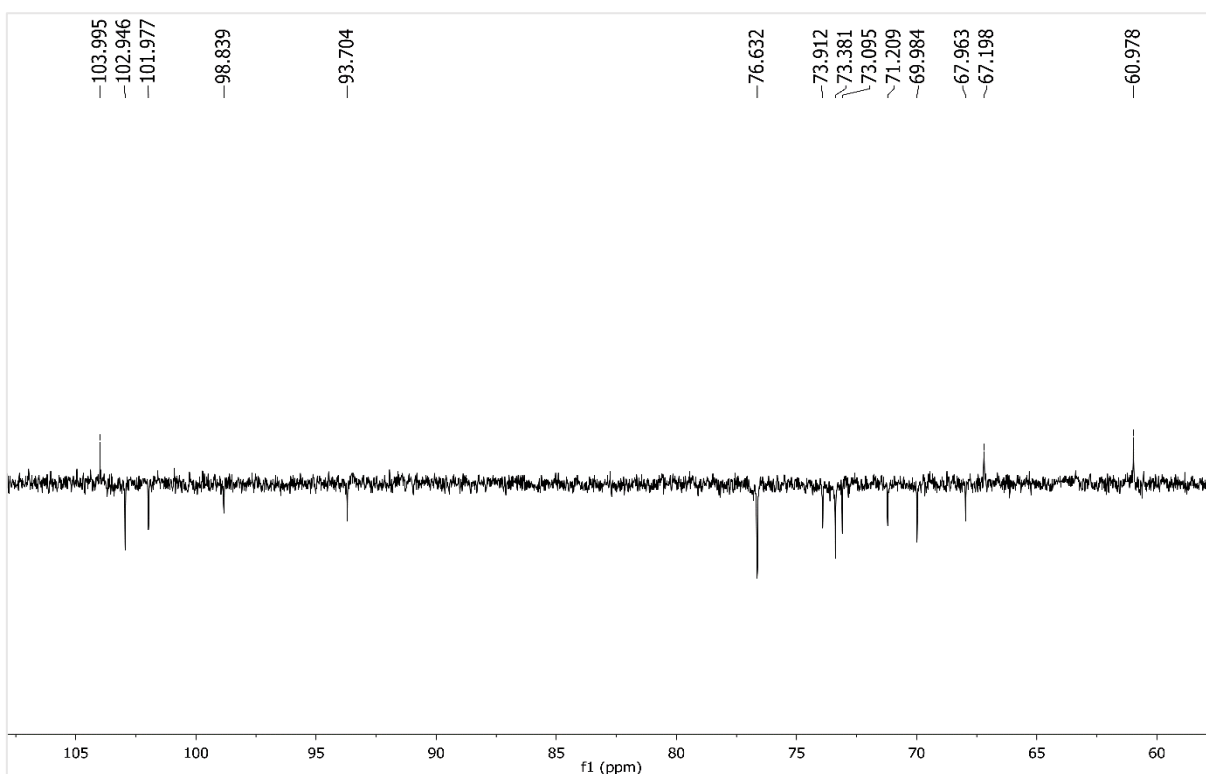


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3.

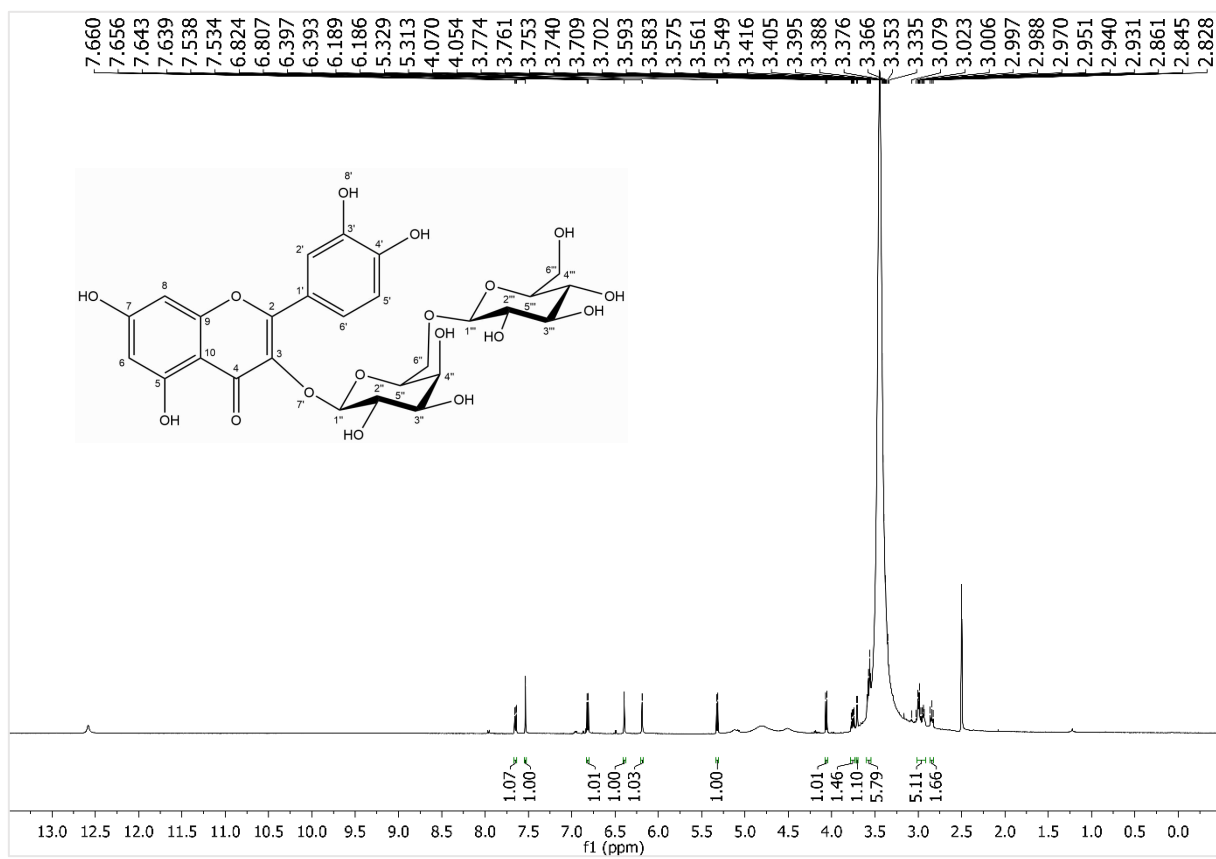


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 5,8 – 7,8 ppm.

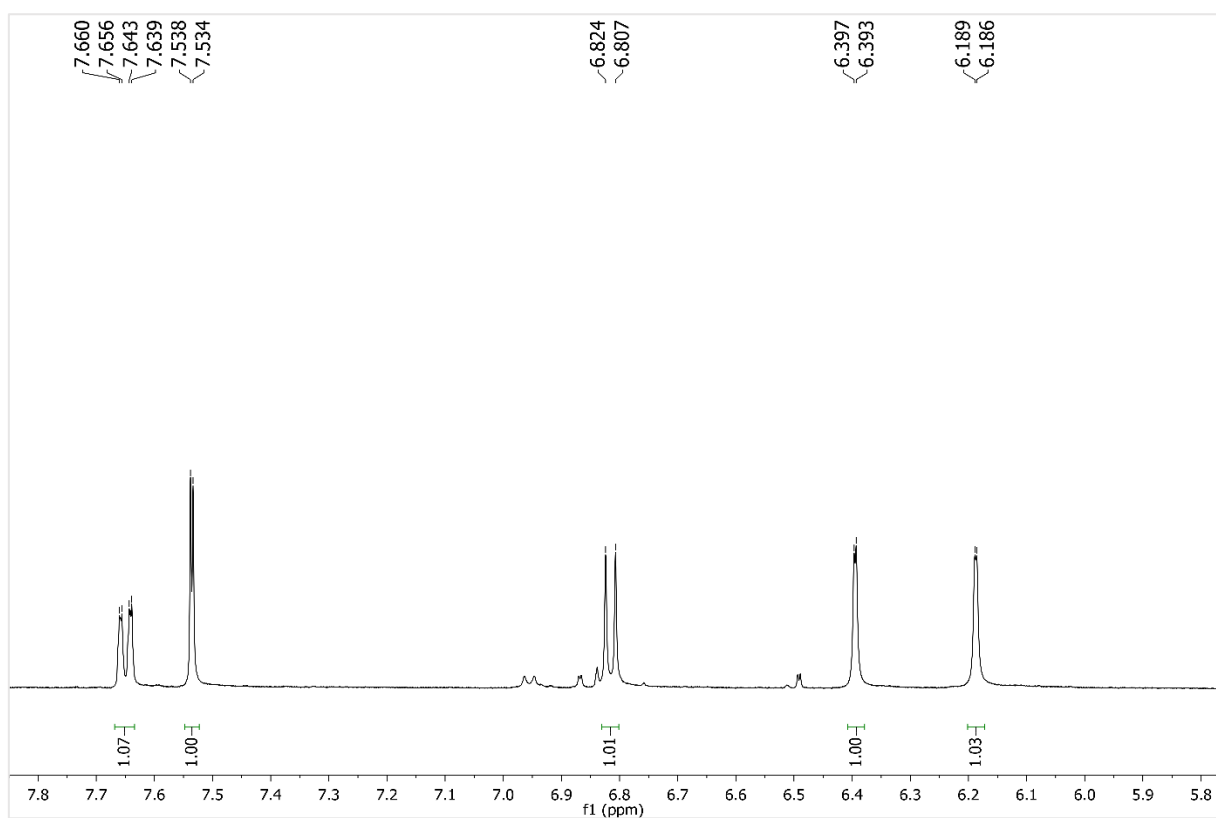


Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 4,0 – 5,7 ppm.

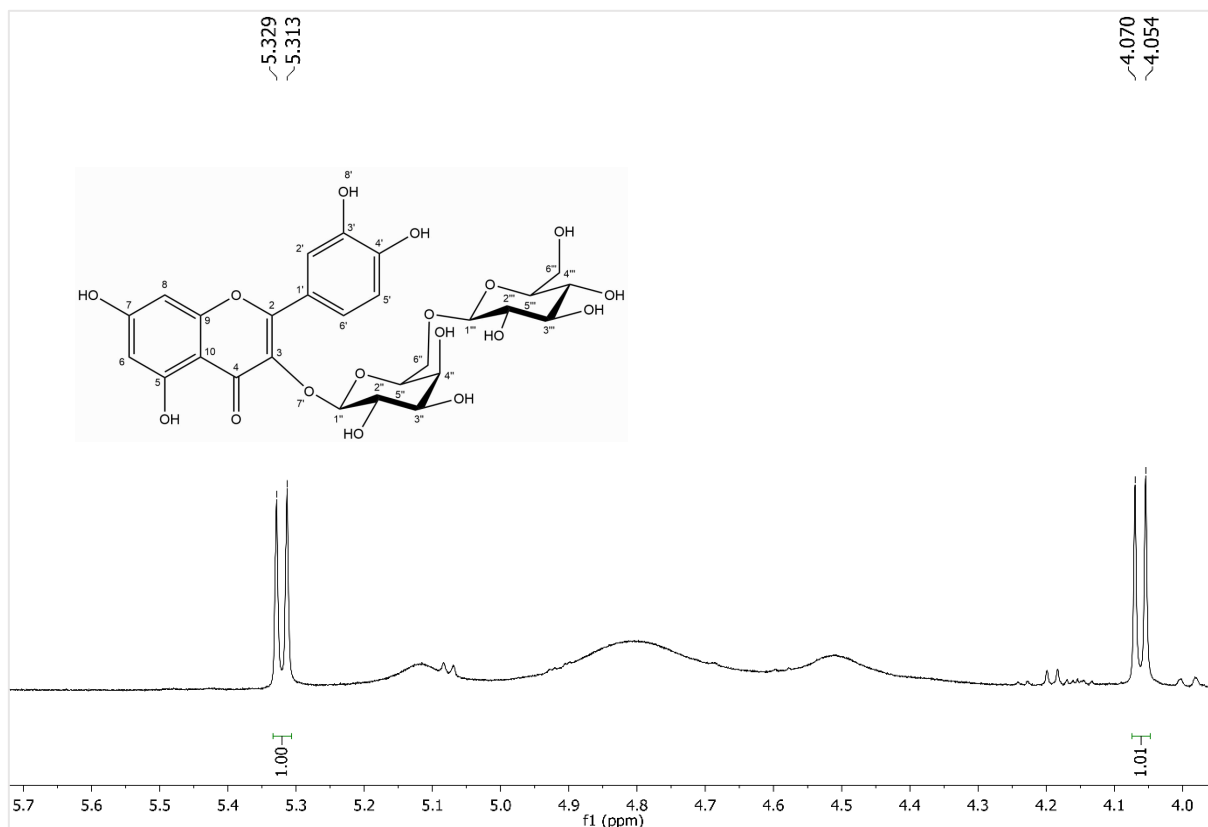


Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 2,70 – 4,00 ppm.

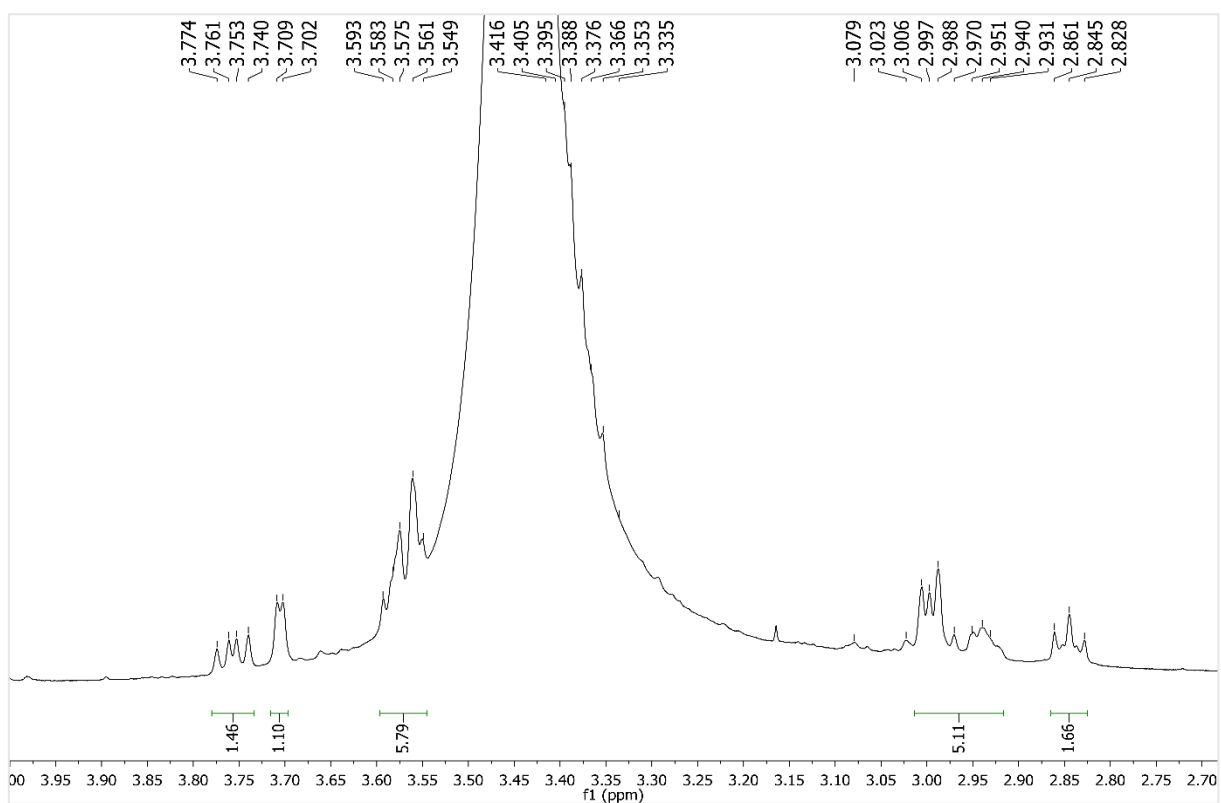


Figura 43 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3.

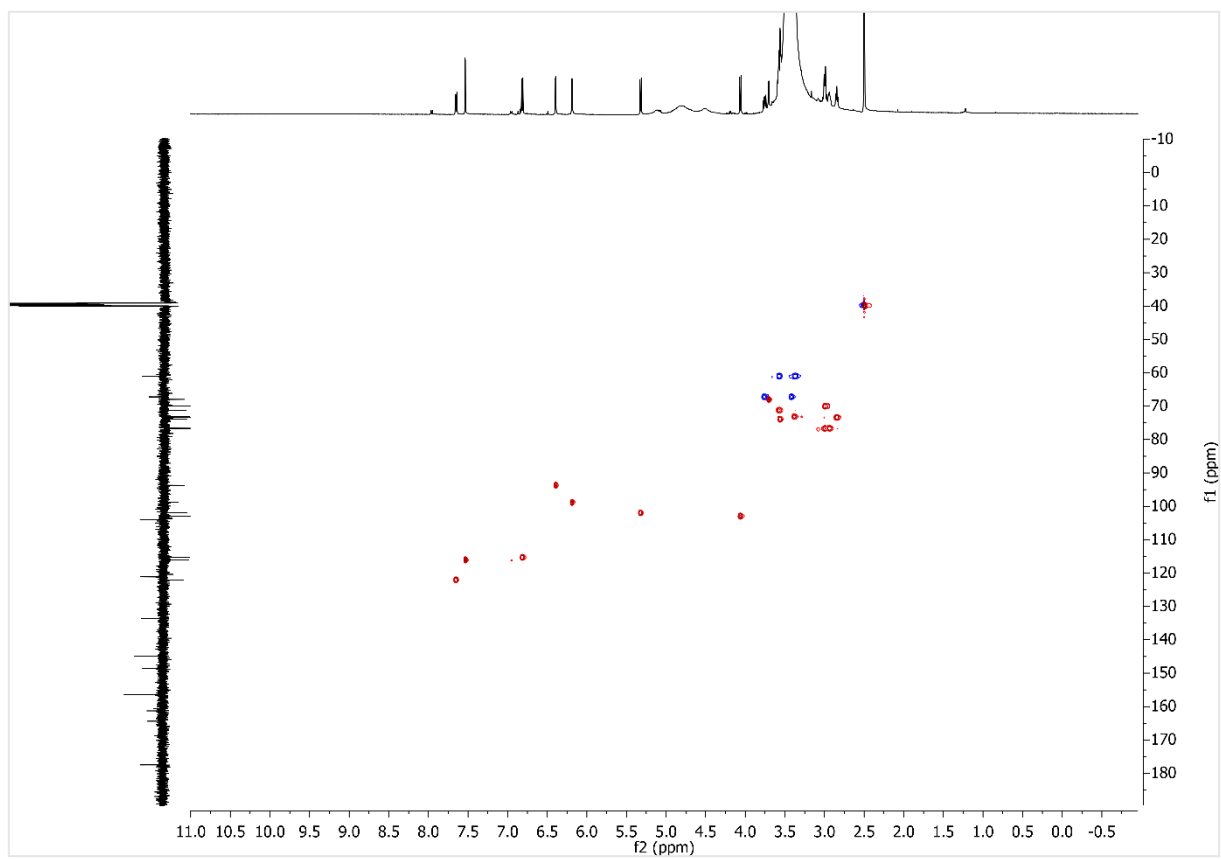


Figura 44 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 4,0 – 8,0 ppm x 90,0 – 125,0 ppm.

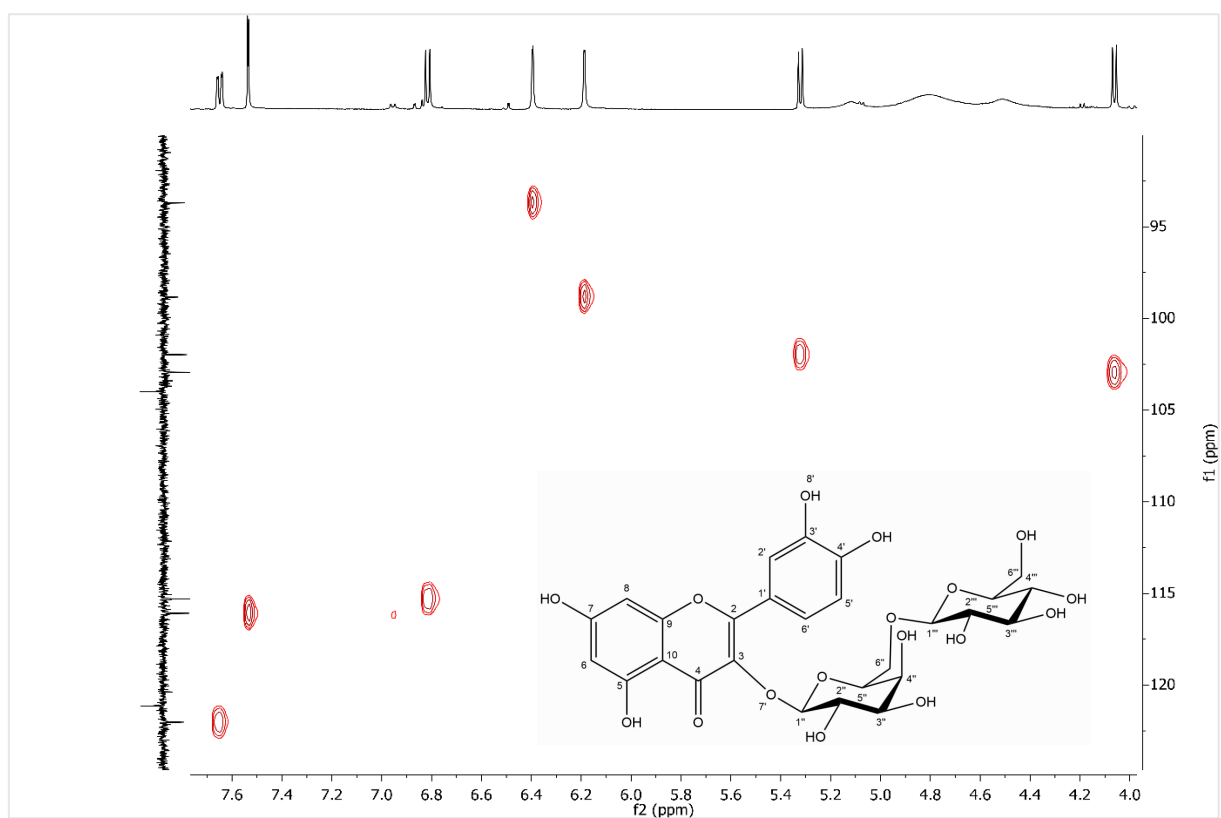


Figura 45 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 2,55 – 4,5 ppm x 50,0 – 80,0 ppm.

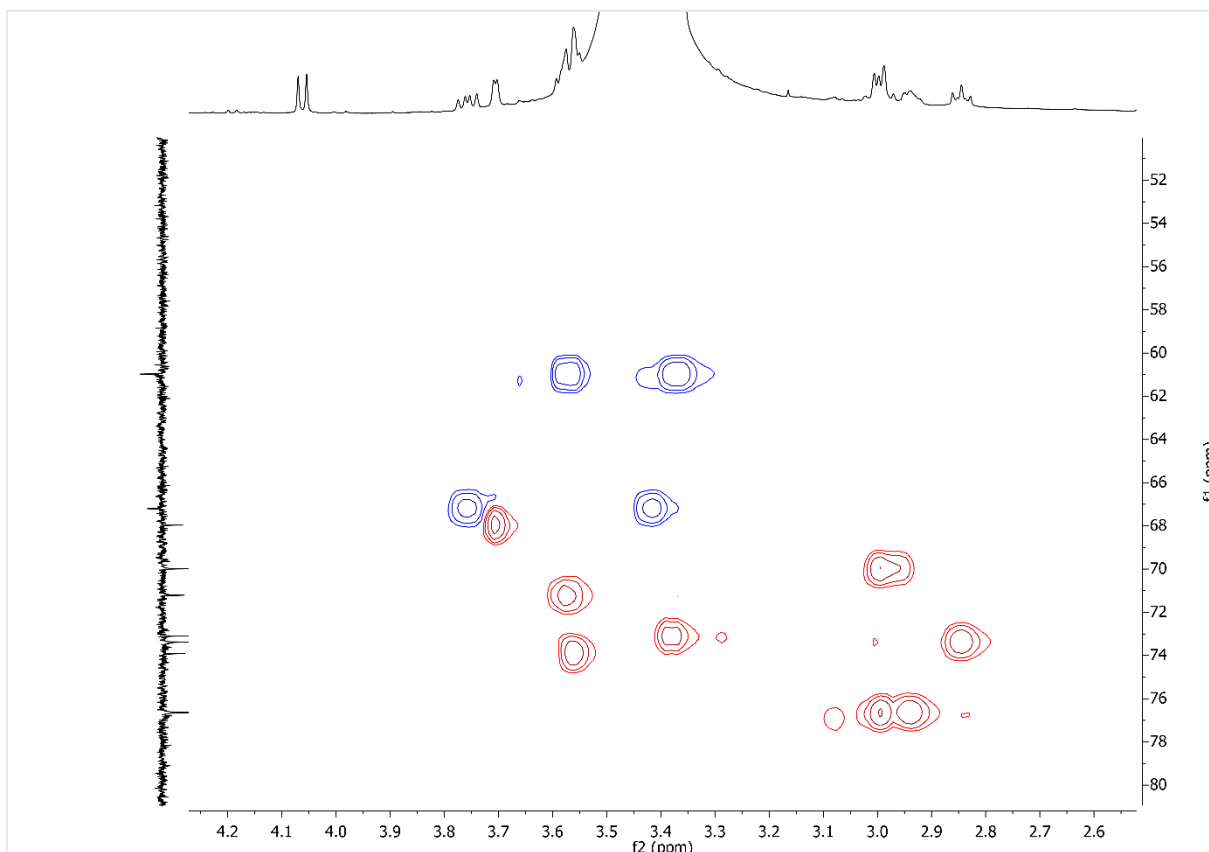


Figura 46 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3.

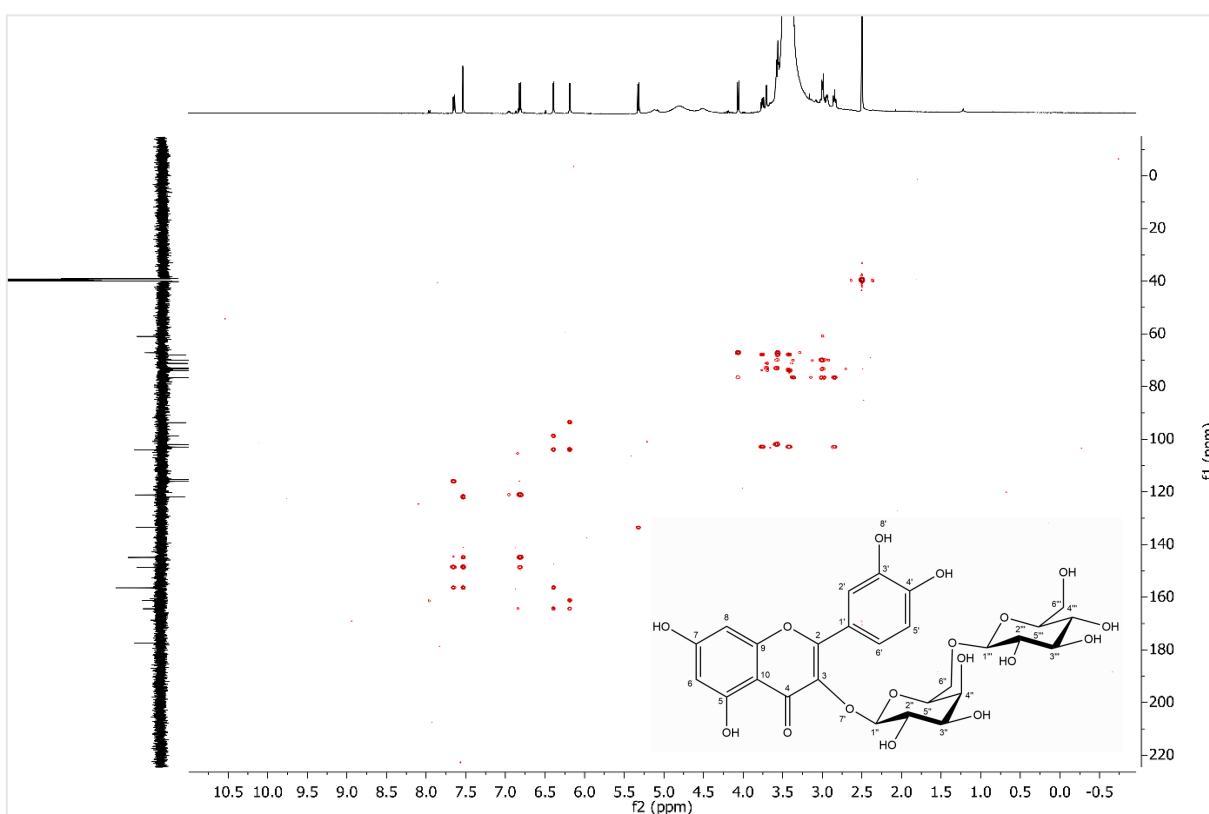


Figura 47 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 5,0 – 8,5 ppm x 90,0 – 165,0 ppm.

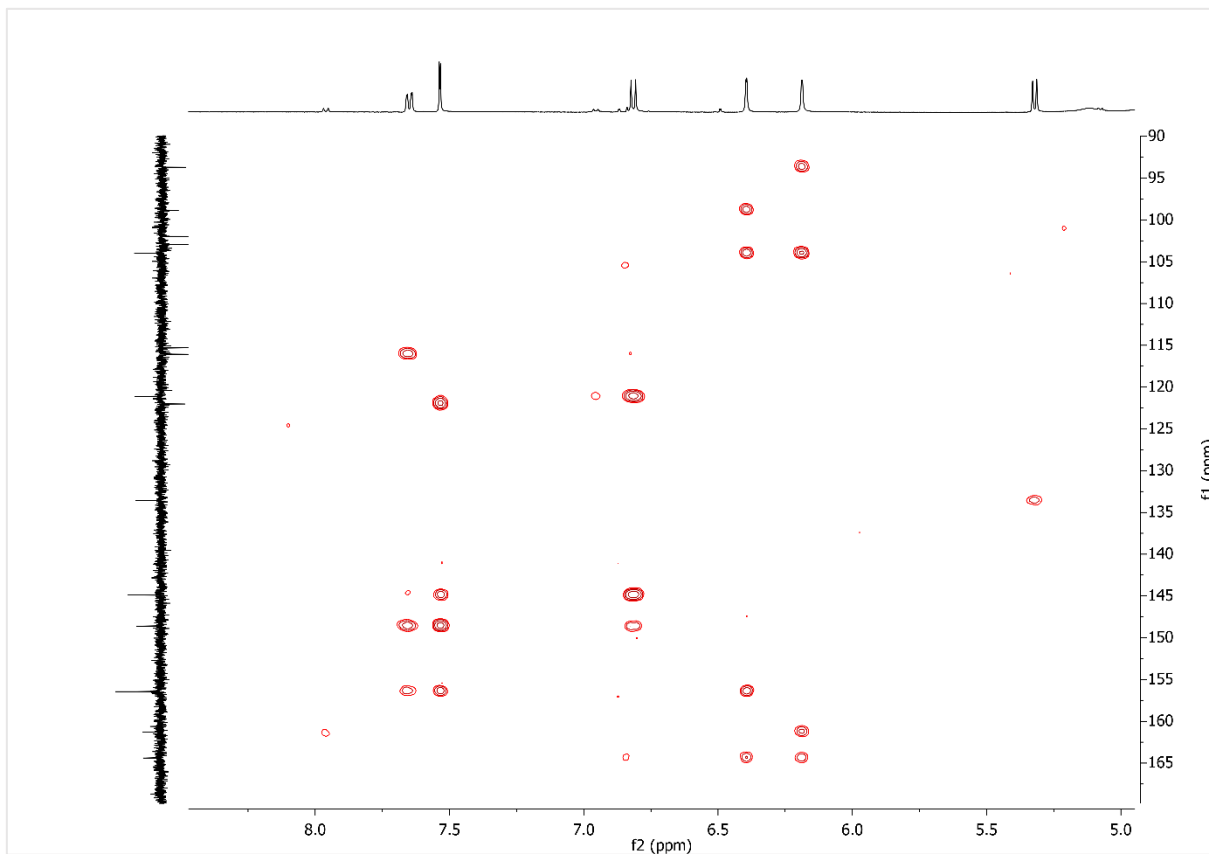
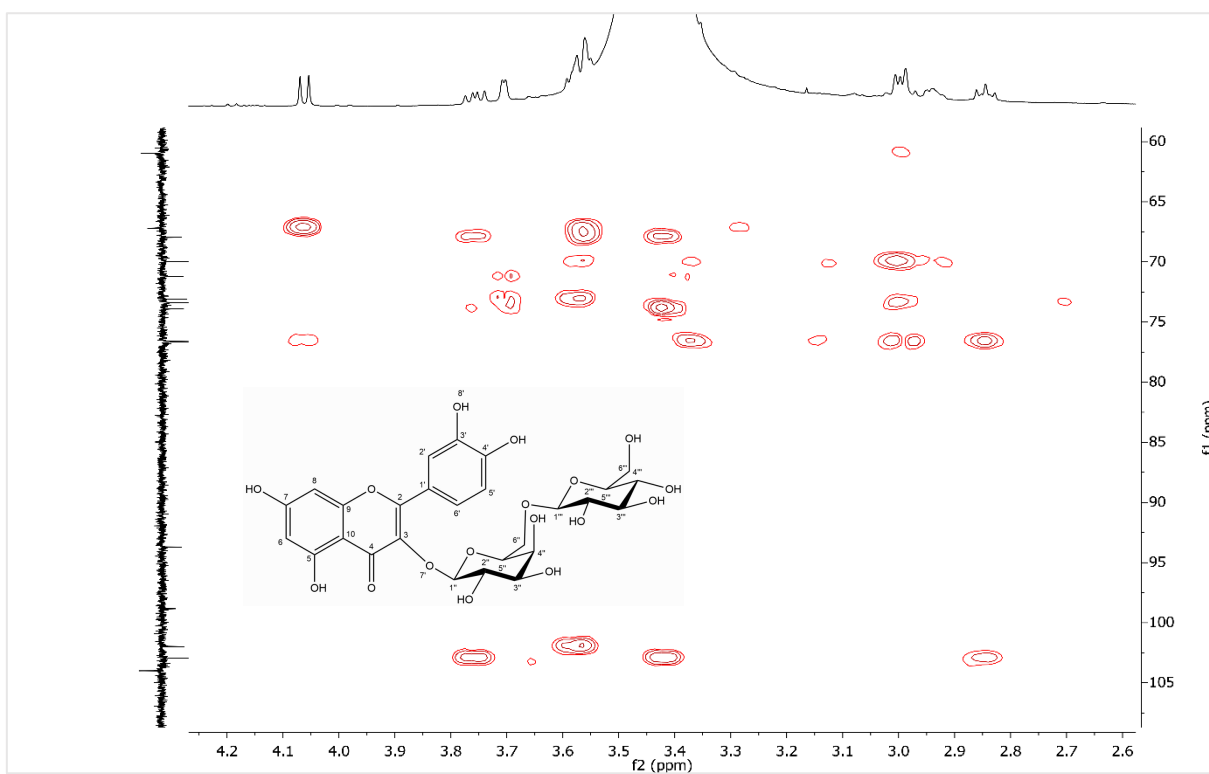


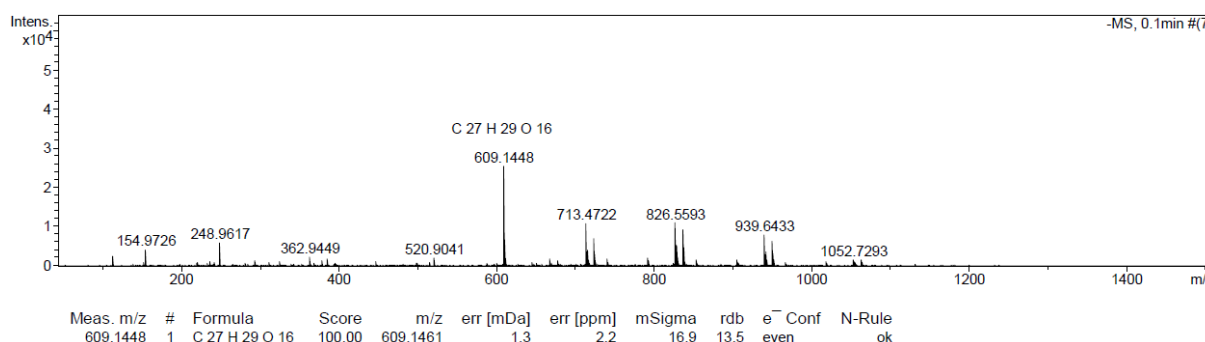
Figura 48 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (500x125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-3 na região de 2,5 – 4,5 ppm x 60,0 – 110,0 ppm.



5.1.4. Identificação estrutural de Cs-4

A substância Cs-4, com tempo de retenção em 76,44 min. (Pico 4, Figura 13, pág. 58), foi isolada na forma de um pó amarelo, pesando 11,5 mg. O espectro de massas de alta resolução exibiu um pico do íon molecular com 609,1448 [M-H]⁻ compatível com a fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₆ (massa calculada m/z 609,1461 e erro de 2,2 ppm) (Figura 49).

Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução de Cs-4.



O espectro de RMN de ¹³C foi obtido em DMSO-*d*₆ a 100 MHz, técnica APT (Figuras 51 – 54, pág. 95 e 96). O espectro apresentou 24 sinais correspondentes a 27 átomos de carbono, sendo 11 sinais associados a unidades osídicas e 14 a uma aglicona. Nesse espectro, 13 sinais foram atribuídos a carbonos metínicos, quatro para carbonos com hibridização *sp*² e nove *sp*³, e 10 sinais, sendo oito carbonos não hidrogenados (*sp*²) e dois carbonos metilênicos (*sp*³). Os sinais indicam um esqueleto flavonoídico, em que os sinais em δ_c 161,2, 98,8, 164,4 e 93,8 mostram o padrão de substituição do anel A dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-8, nos quais estão inseridas hidroxilas, alterando o valor de deslocamento por desproteção (GAO et al., 2011). O anel C demonstra uma substituição na posição C-3 já que o valor em Cs-4 se mostra desprotegido (δ_c 133,3 ppm) em relação a uma substância sem substituição em tal carbono (aproximadamente δ_c 105,0 ppm). Um sinal em δ_c 177,5 foi atribuído ao carbono C-4 da carbonila. A falta de sinais entre δ_c 140 – 150 ppm e a presença do sinal em δ_c 160,0 referente ao carbono C-4' demonstra a oxigenação nessa posição, o deslocamento reduzido dos carbonos C-3' e C-5' comprovam essa substituição já que as posições *orto* ao substituinte sofrem efeito de proteção (TERNAI; MARKHAM, 1976).

Os carbonos com deslocamento em δ_c 76,6, 73,9, 73,3, 73,0, 71,2, 69,9, 67,9, 67,3 e 60,9 foram atribuídos a unidades osídicas da molécula. Os carbonos com sinais referentes a carbonos metilênicos em δ_c 67,3 e 60,9 (C-6'' e C-6''', respectivamente) e ainda os sinais em δ_c 102,9 (C-1''') e 101,9 (C-1''), puderam ser atribuídos aos carbonos anoméricos e condizem com a existência de duas unidades osídicas ligadas à molécula (MORIYAMA; IIZUKA; NAGAI, 2001). A semelhança dessa faixa do espectro de RMN de ^{13}C com a vista na substância Cs-3, torna possível sugerir que a unidade dissacarídica também trata-se da unidade β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranoose).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 55 – 58, pág. 97 e 98), obtido em DMSO- d_6 a 400 MHz, exibiu sinais característicos de um núcleo de flavonoide. Por exemplo, o sinal característico de hidroxila quelada em δ_H 12,57. Além disso, foram observados dois dupletos em δ_H 6,19 ($J = 1,6$ Hz) e δ_H 6,42 ($J = 2,0$ Hz) com integração para um hidrogênio cada e acoplando em *meta*, referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, do anel A. Um sistema AA'BB', do anel B, foi revelado por dois dubletos em δ_H 6,85 ($J = 8,8$ Hz) e δ_H 8,06 ($J = 8,8$ Hz) integrando, para dois hidrogênios, cada, e com acoplamento em *orto*, conferidos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5'. O espectro também indicou a existência de unidades osídicas por meio de sinais de prótons anoméricos em δ_H 5,33 ($J = 7,6$ Hz), atribuído a H-1'' e δ_H 4,04 ($J = 8,0$ Hz) atribuído a H-1''', apontando a ligação de duas unidades de açúcar na molécula (VEGA et al., 2007; LIMA, 2013; GHAVAM-HAGHI; DINANI, 2017). As constantes de acoplamento corroboram com ligações com configuração β . A ausência de um singlete em aprox. δ_H 6,70 e a presença de sinais de unidades de açúcar sugerem a substituição no carbono C-3 (BRITO-ARIAS, 2016; VICTOR et al., 2018). Os dados de espectros unidimensionais sugerem que a substância Cs-4 trata-se de um derivado do canferol.

No mapa de contorno heteronuclear HSQC (Figuras 59 – 61, pág. 99 e 100) observaram-se correlações entre o hidrogênio H-8 em δ_H 6,42 com o carbono C-8 em δ_c 93,8 e o hidrogênio H-6 em δ_H 6,19 com o carbono C-6 em δ_c 98,8 evidenciando o padrão de substituição do anel A. No anel B, o sistema AA'BB' foi destacado pela correlação dos carbonos C-2'/C-6' em δ_c 131,1 com os hidrogênios em δ_H 8,06 e os carbonos C-3'/C-5' em δ_c 115,2 com os hidrogênios δ_H 6,85. O hidrogênio anomérico da galactose (H-1'') em δ_H 5,33 correlaciona com C-1'' em δ_c 101,9 e o hidrogênio H-1''' em δ_H 4,04 demonstra correlação com o carbono anomérico (C-1''') da glicose em

δ_c 102,9. Foi possível atribuir os valores de deslocamento dos hidrogênios metilênicos: os hidrogênios em δ_H 3,74 e δ_H 3,41 correlacionam-se com o carbono C-6'' em δ_c 67,3 e os hidrogênios em δ_H 3,55 e δ_H 3,36 correlacionam-se com o carbono C-6''' em δ_c 60,9.

O mapa de contorno heteronuclear HMBC (Figuras 62 – 64, pág. 100 e 101) revelou as correlações do anel A: o próton H-6 em δ_H 6,19 com os carbonos C-5, C-7, C-8 e C-10 em δ_c 161,2, 164,4, 93,8 e 104,0, nessa ordem. E o hidrogênio H-8 em δ_H 6,42 com os carbonos C-6, C-7, C-9 e C-10 em δ_c 98,8, 164,4, 156,5 e 104,0, respectivamente, confirmando o padrão característico do anel. Os carbonos C-2', C-3', C-5' e C-6' correlacionam com sinais de seus hidrogênios vicinais que participam do sistema AA'BB'; o carbono C-4' correlaciona-se com os prótons desse sistema.

A correlação do próton anomérico H-1'' em δ_H 5,33 com o carbono C-3 em δ_c 133,3, confirmou a inserção da unidade osídica na posição C-3; a correlação do hidrogênio anomérico H-1''' em δ_H 4,04 com o carbono C-6'' em δ_H 67,3 da galactose, confirmou a inserção Gli-(1 $\rightarrow$ 6)-Gal.

Após a verificação dos sinais de RMN de 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, técnicas de espectrométricas, e comparação com dados da literatura por Nawwar, El-Mousallamy e Barakat (1989) e, Liu e colaboradores (2009), foi possível sugerir que a substância Cs-4 trata-se do canferol-3-O- β -glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo (Figura 50). Esse é o primeiro relato da estrutura em *Cissampelos*.

Os dados mencionados até este ponto, além de outras informações acerca dos espectros de 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais podem ser encontrados na Tabela 5.

Figura 50 – Estrutura da canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo.

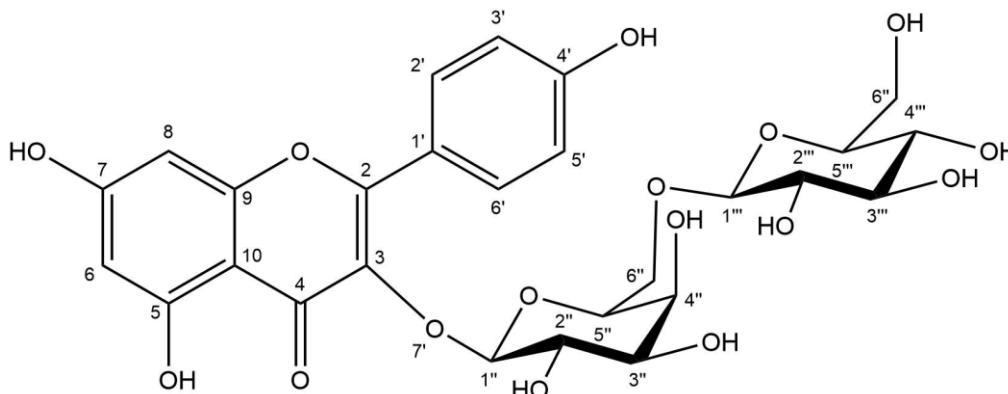


Tabela 5 – Dados de RMN (*J* em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) de Cs-4 comparados com a literatura.

Posição	HSQC		HMBC		(NAWWAR et al., 1989; LIU et al., 2009)	
	δ_{H}	δ_{C}	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}	
2	-	156,6	H-2', H-6', H-8	-	156,5	
3	-	133,3	H-1''	-	133,2	
4	-	177,5	-	-	177,4	
5	-	161,2	H-6	-	161,5	
6	6,19 (d, 1H, <i>J</i> = 1,6)	98,8	H-8	6,19 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0)	98,7	
7	-	164,4	H-6, H-8	-	164,1	
8	6,42 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0)	93,8	H-6	6,41 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	93,7	
9	-	156,5	H-8	-	156,4	
10	-	104,0	H-6, H-8	-	104,0	
1'	-	120,9	H-3', H-5'	-	120,8	
2'	8,06 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	131,1	H-2', H-6'	8,02 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	130,9	
3'	6,85 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	115,2	H-3', H-5'	6,88 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8)	115,1	
4'	-	160,0	H-2', H-6' H-3', H-5'	-	159,9	
5'	6,85 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	115,2	H-3', H-5'	6,88 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8)	115,1	
6'	8,06 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	131,1	H-2', H-6'	8,02 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8)	130,9	
1''	5,33 (d, 1H, <i>J</i> = 7,6)	101,9	-	5,37 (d, 1H, <i>J</i> = 7,3)	102,2	
2''	2, 80 – 3,75 (m)	71,2	-	3,19 (m, 1H)	71,3	
3''	2, 80 – 3,75 (m)	73,3	-	3,28 (m, 1H)	73,5	
4''	2, 80 – 3,75 (m)	67,9	-	3,17 (m, 1H)	68,3	
5''	2, 80 – 3,75 (m)	73,9	-	2,96 (m, 1H)	73,9	
6''	2, 80 – 3,75 (m)	67,3	H-1'''	3,85 (d, 1H, <i>J</i> = 11) 3,45 (dd, 1H, <i>J</i> = 11,6)	67,3	
1'''	4,04 (d, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz)	102,9	H-6''	4,03 (d, <i>J</i> = 7,7 Hz)	103,2	
2'''	2, 80 – 3,75 (m)	73,0	-	2,84 (m, 1H)	74,2	
3'''	2, 80 – 3,75 (m)	76,6	-	3,21 (m, 1H)	76,8	
4'''	2, 80 – 3,75 (m)	69,9	-	2,96 (m, 1H)	70,0	
5'''	2, 80 – 3,75 (m)	76,6	-	2,84 (m, 1H)	76,8	
6'''	2, 80 – 3,75 (m)	60,9	-	3,51 (d, 1H, <i>J</i> = 11) 3,33 (m, 1H)	61,1	

Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4.

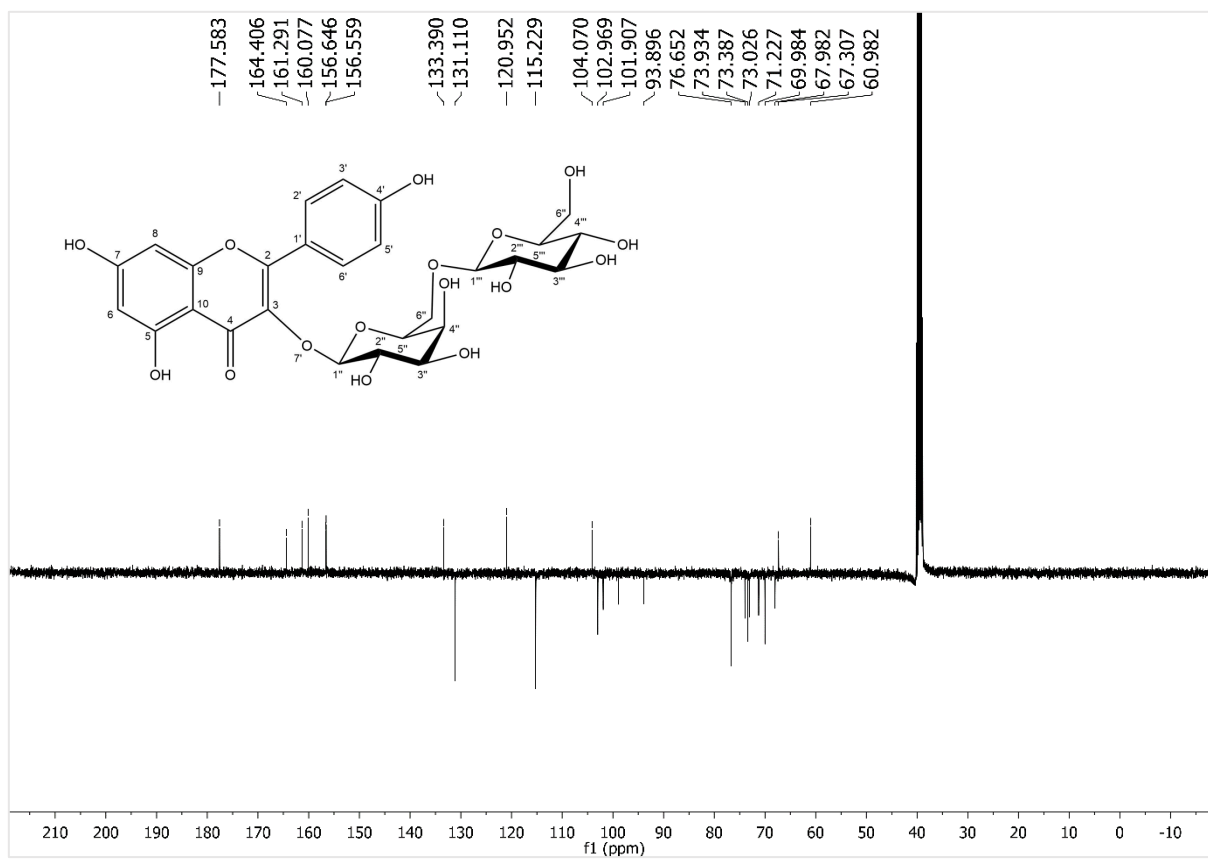


Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 57,0 – 180,0 ppm.

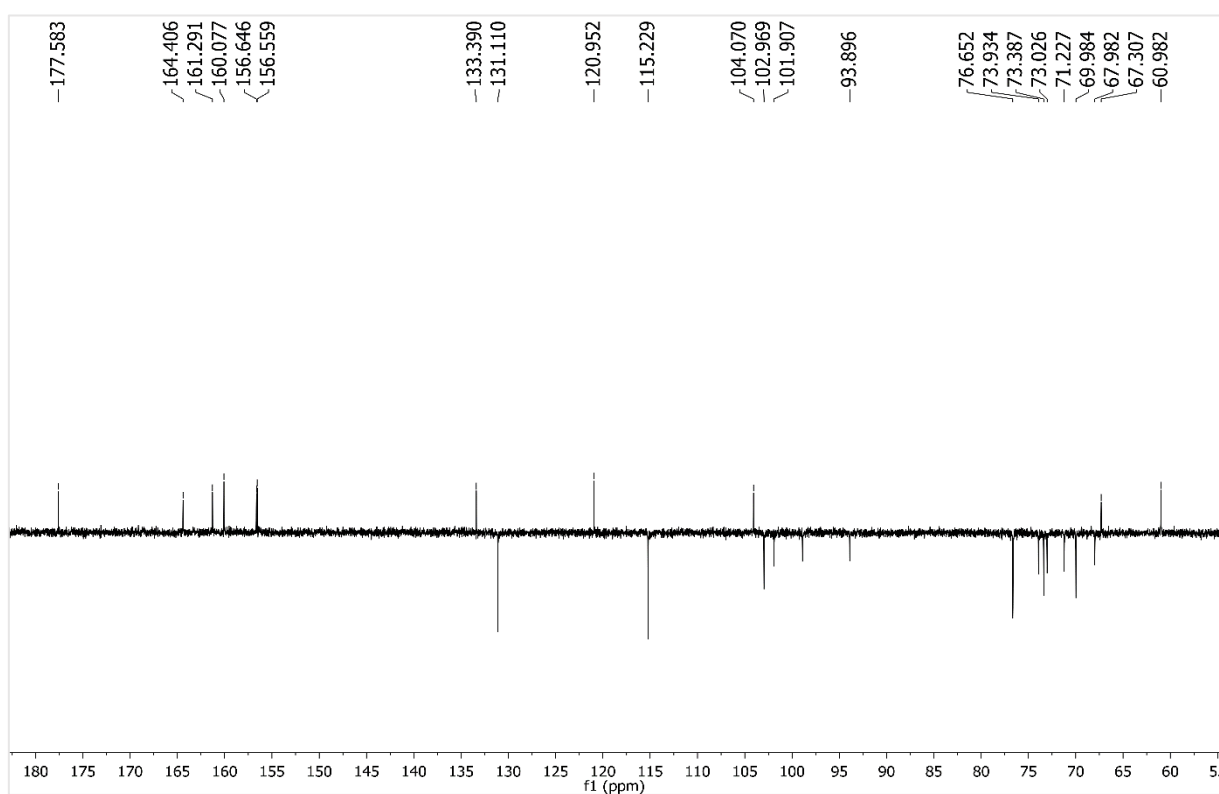


Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 97,0 – 180,0 ppm.

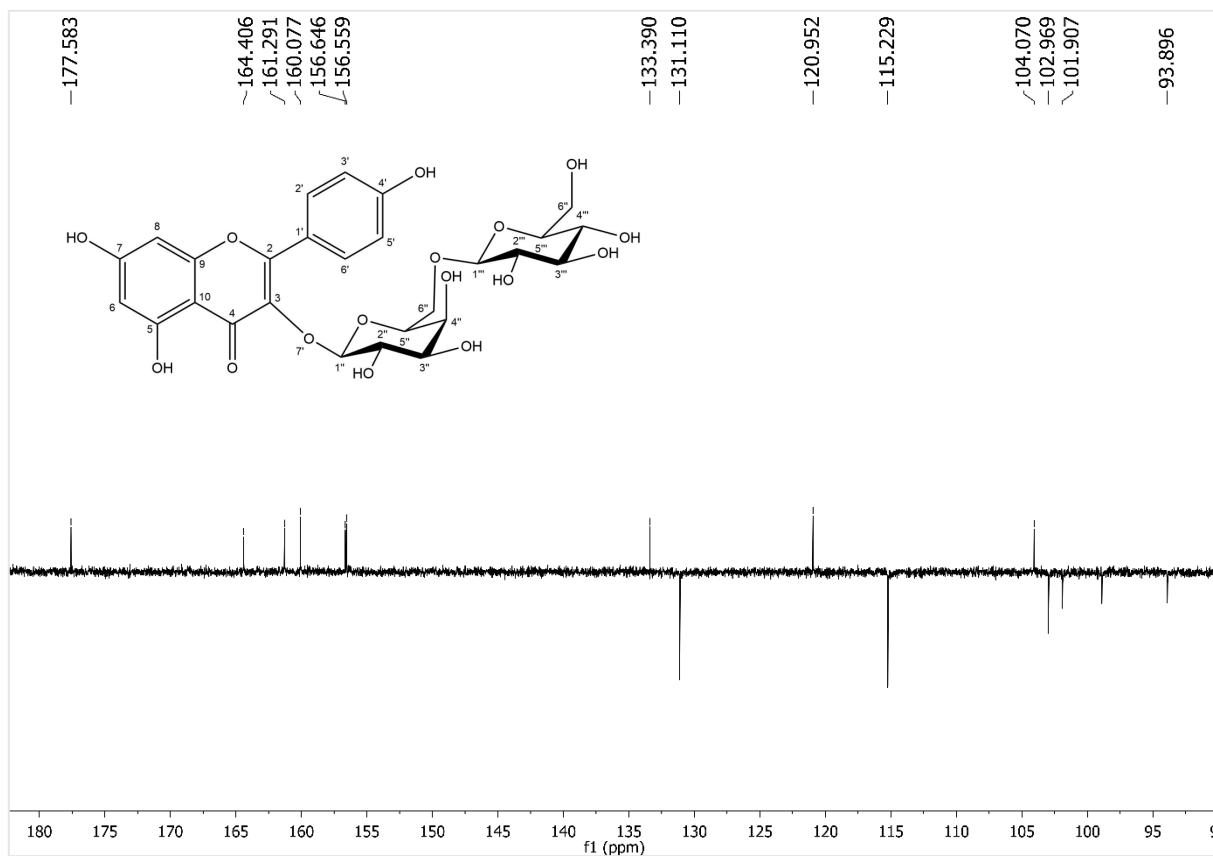


Figura 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 56,0 – 108,0 ppm.

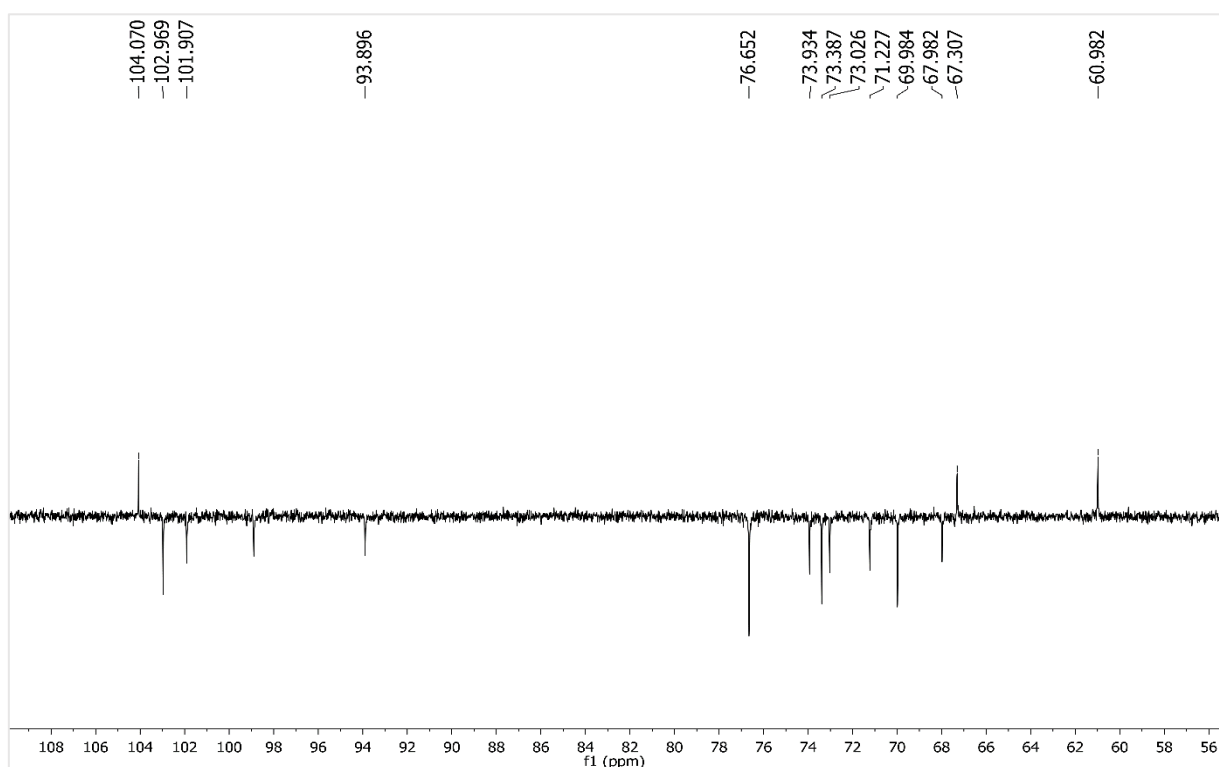


Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4.

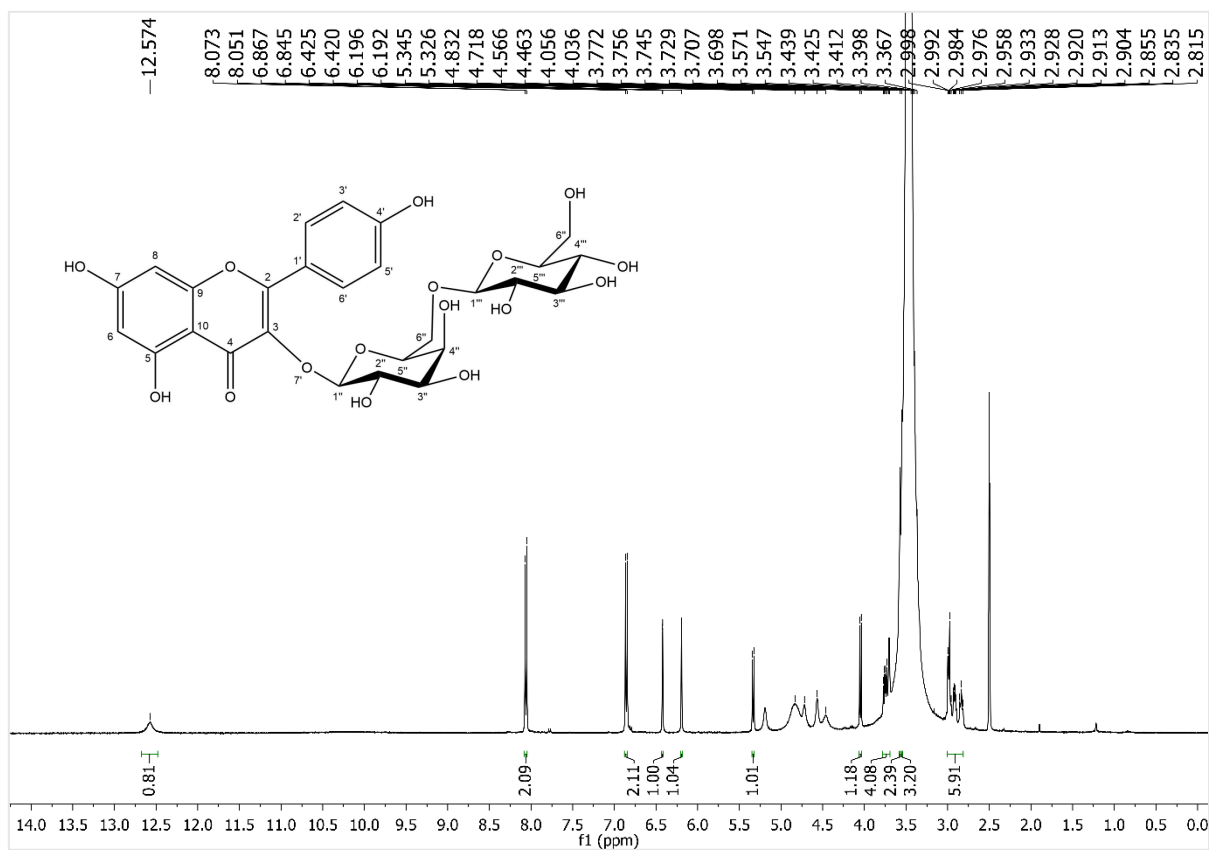


Figura 56 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 6,0 – 8,5 ppm.

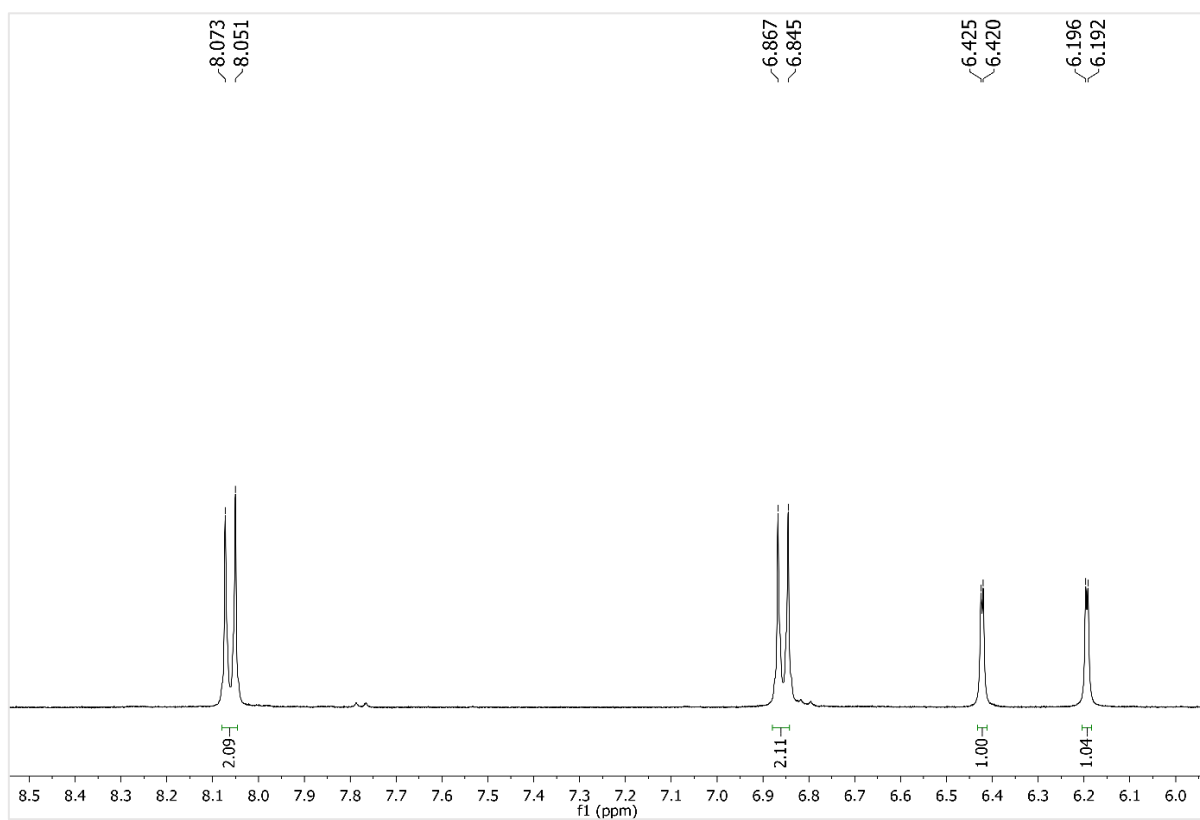


Figura 57 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 2,6 – 5,5 ppm.

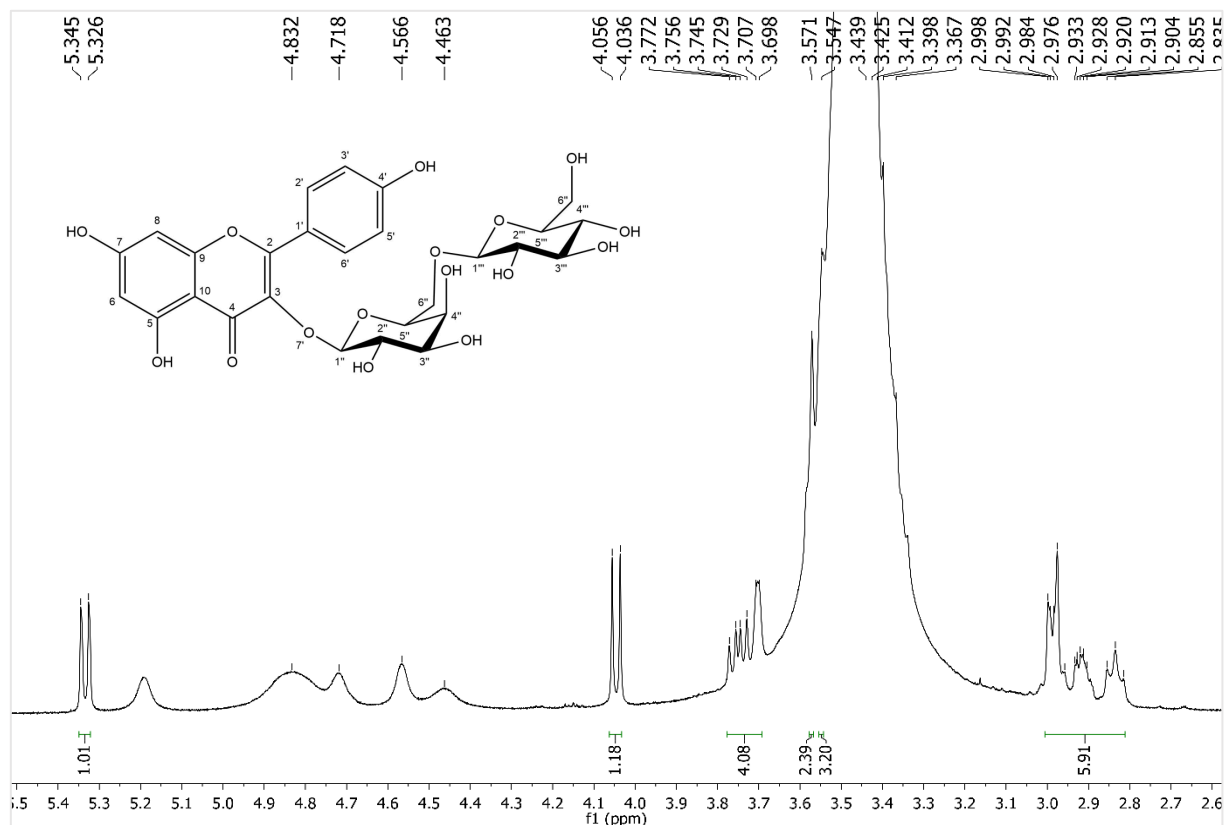


Figura 58 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 2,65 – 4,00 ppm.

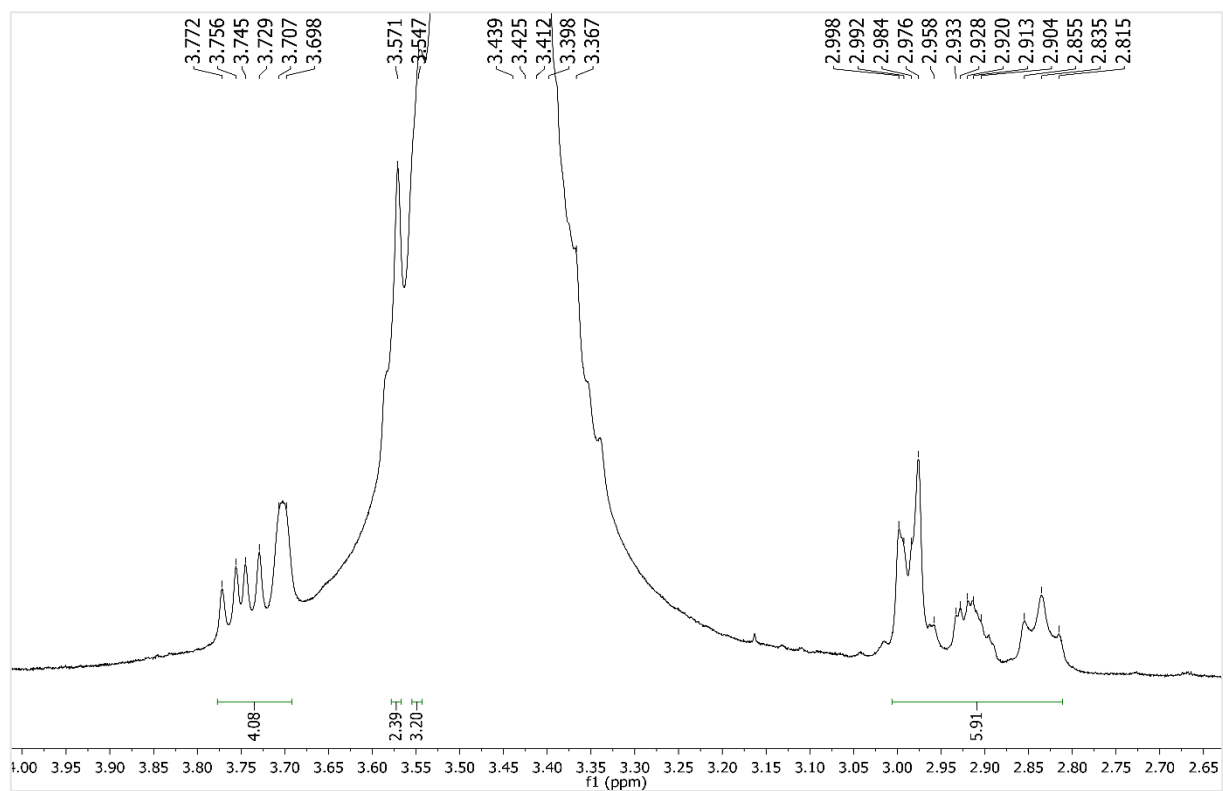


Figura 59 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4.

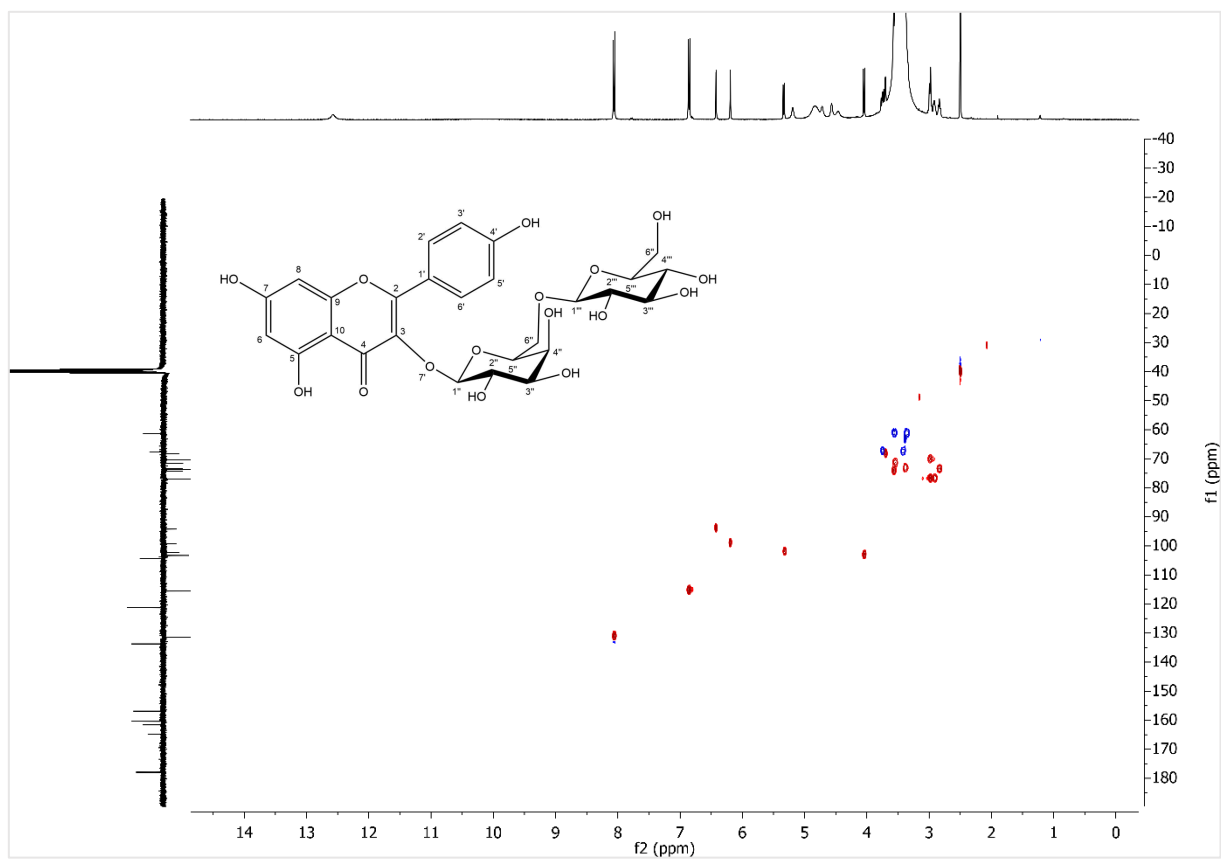


Figura 60 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 4,0 – 8,5 ppm x 80,0 – 140,0 ppm.

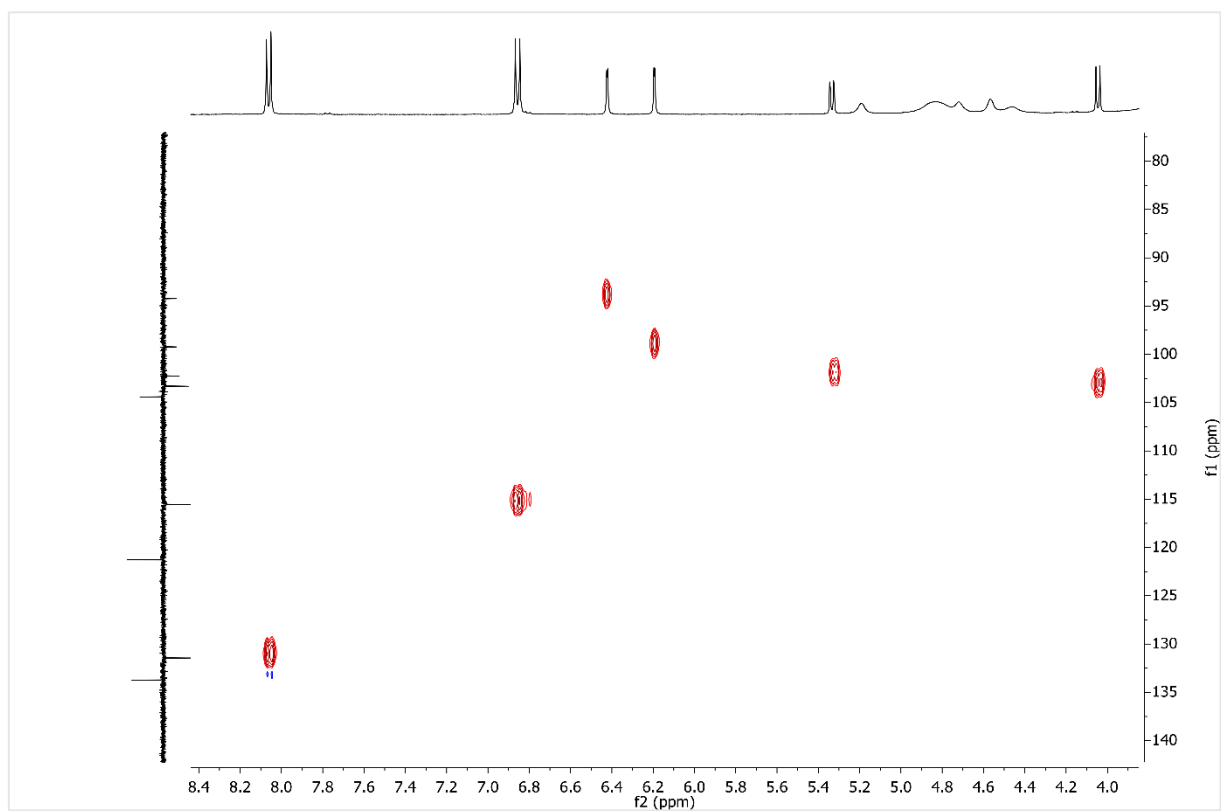


Figura 61 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 2,5 – 4,2 ppm x 50,0 – 85,0 ppm.

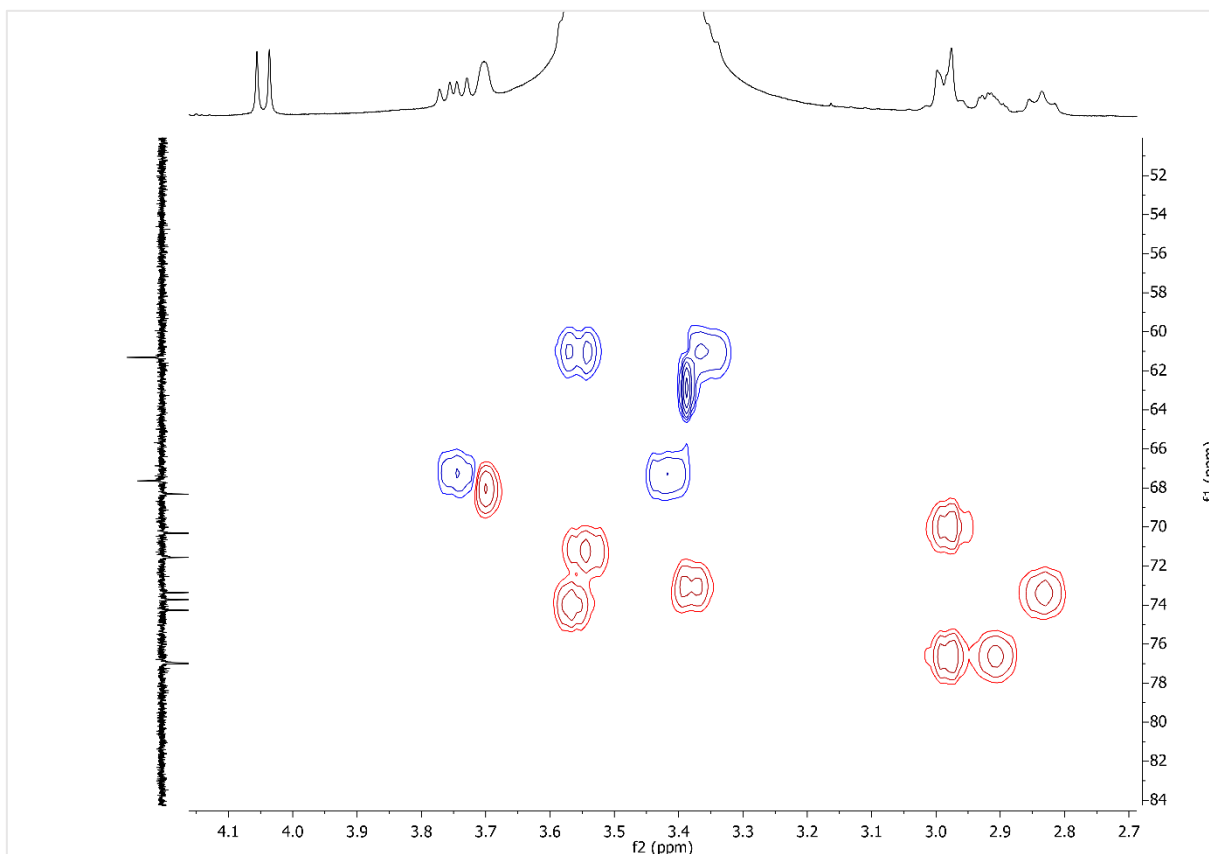


Figura 62 – Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4.

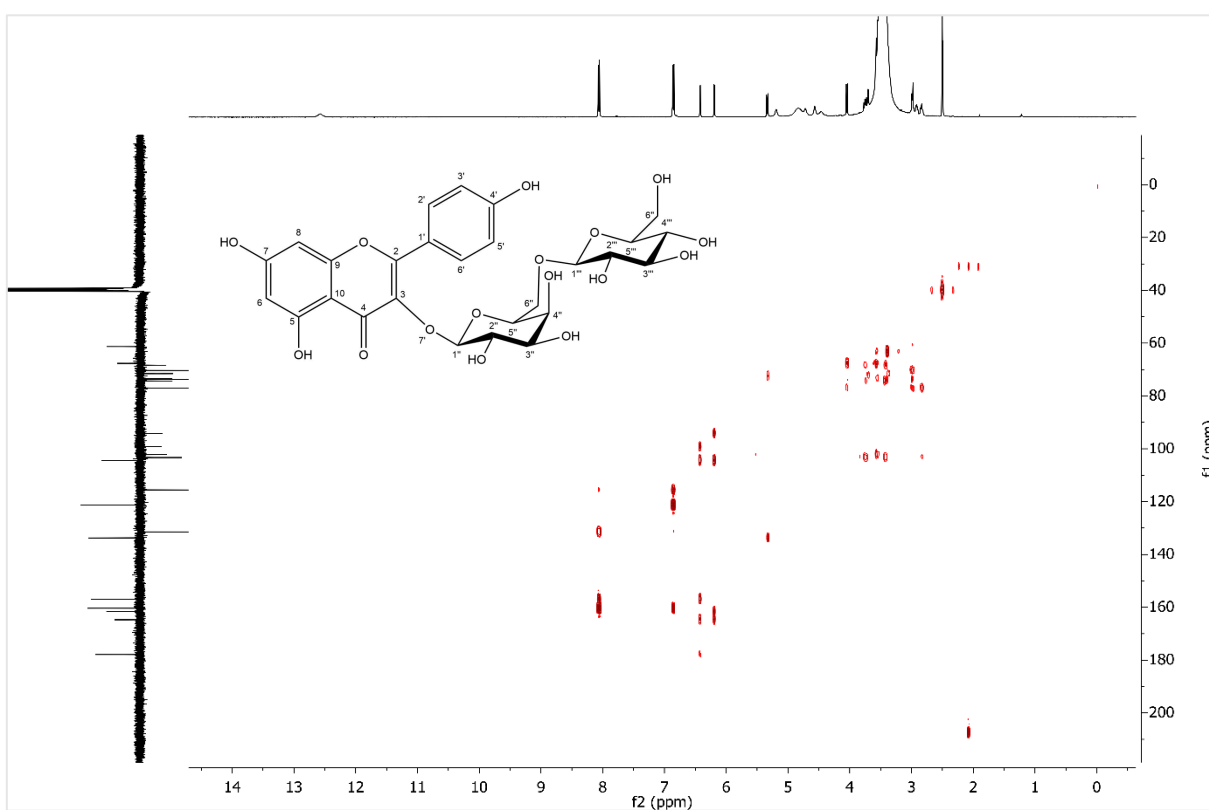


Figura 63 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 5,0 – 9,0 ppm x 90,0 – 180,0 ppm.

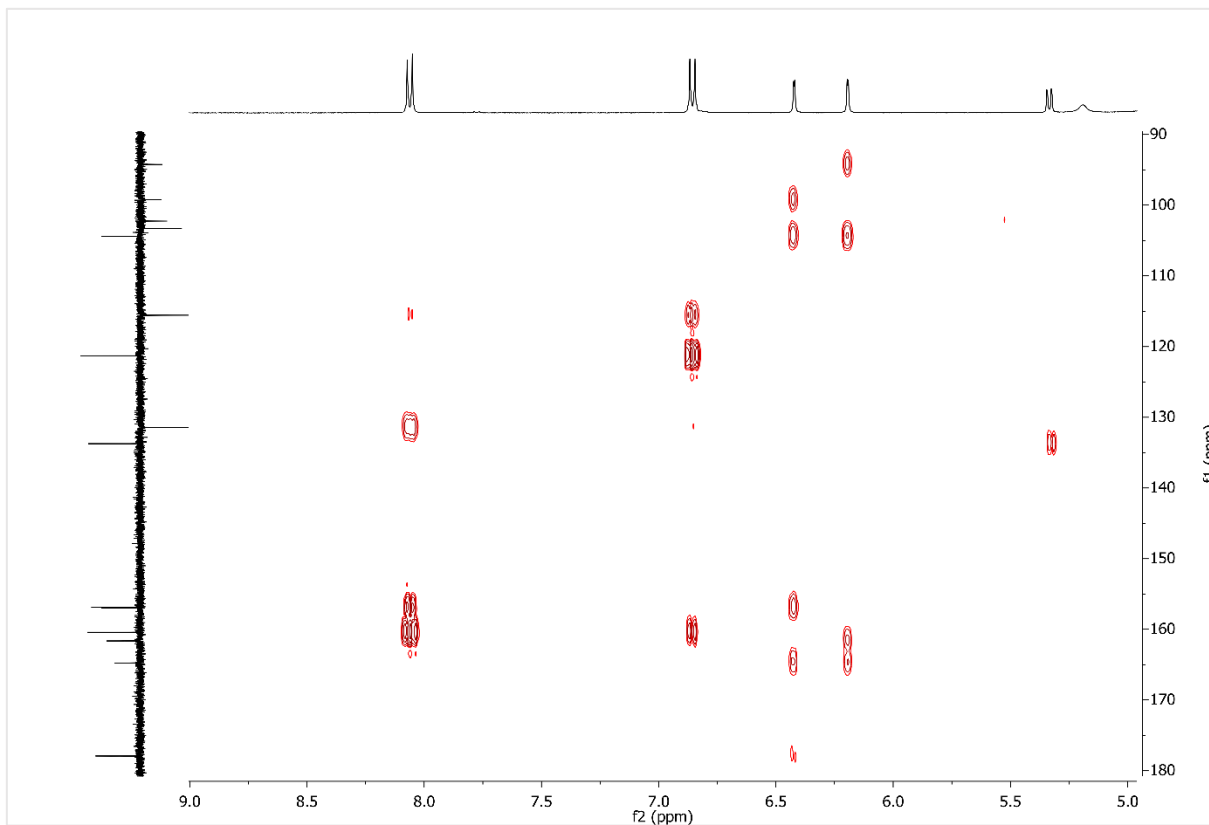
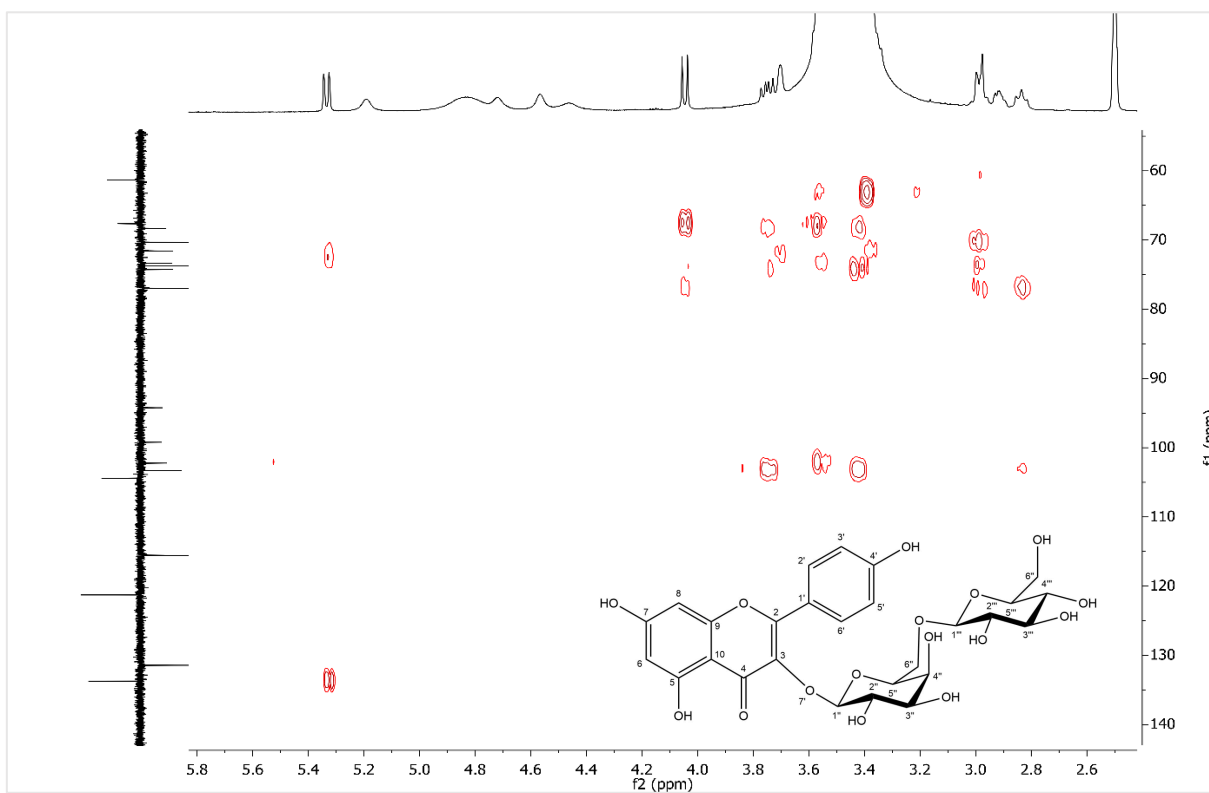


Figura 64 – Expansão do mapa de contorno $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Cs-4 na região de 2,5 – 9,0 ppm x 55,0 – 140,0 ppm.

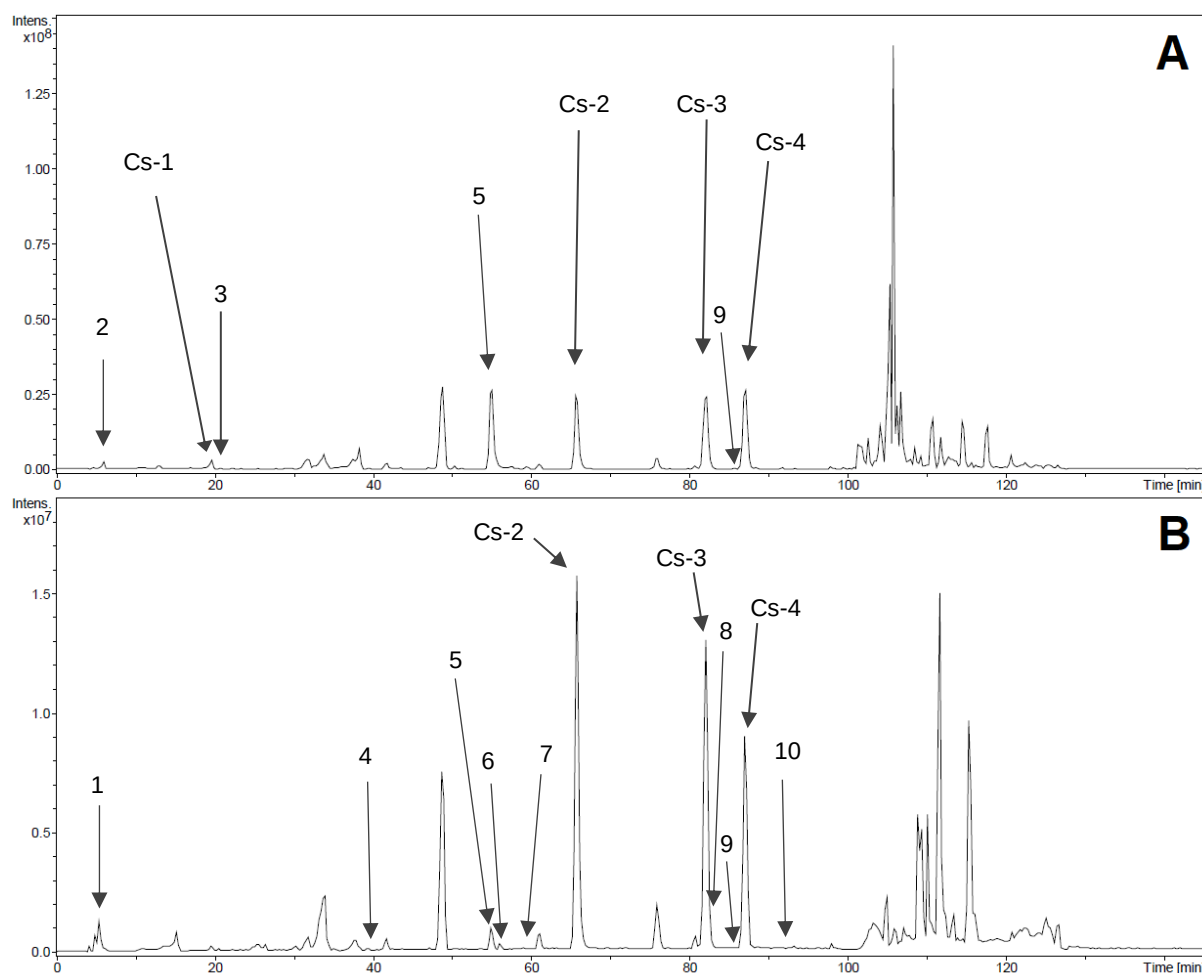


5.2. Identificação de outros compostos da CsFHM 6-7 por CLAE-EM³

Desreplicação é um termo utilizado para um conjunto de técnicas na qual é feita a identificação rápida de substâncias conhecidas, dessa forma, possibilitando construir o quimiotipo de espécies produtoras de metabólitos especiais, como plantas, fungos e animais marinhos. É um processo que permite a economia de tempo, recursos e a concentração de esforços no isolamento e determinação de compostos ainda não relatados (inéditos) (HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017).

As estratégias de identificação rápida se sustentam no uso de técnicas hifenadas como: CG-EM, CLAE-EM, uHPLC-EM, CL-RMN, que podem ser utilizadas em estudos de metabolômica, proteômica e genômica. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é uma técnica sensível que permite a identificação de um composto através das similaridades de sua massa com a de outro previamente reportado, porém, apenas as massas moleculares dos íons primariamente gerados não são suficientes para uma identificação confiável. Dessa forma, espectrometria de massas sequencial (EM/EM) fornece dados, onde a estrutura, estabilidade química e grupos funcionais são fatores decisivos para determinar os padrões de fragmentação gerados pela dissociação, desse modo, semelhanças nesses padrões de MS/MS podem ser comparados para identificação de outras substâncias quimicamente análogas (YANG et al., 2013; GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

A amostra CsFHM 6-7 foi analisada por CLAE-EM/EM e demonstrou um perfil rico em compostos aromáticos, frequência de substâncias glicosiladas, e percebe-se ainda, que a maior parte das estruturas evidenciadas na fração são derivadas de esqueletos flavonoídicos, como luteolina, apigenina, canferol e quercetina. A identificação dos compostos de CsFHM 6-7 foi feita por comparação com a literatura, nos dois modos de ionização. Os cromatogramas nos modos positivo e negativo podem ser visualizados na Figura 65 (pág. 103) e os dados de fragmentação das substâncias encontradas na Tabela 6 (pág. 106).

Figura 65 – Cromatograma (BPC) da fração CFTS-1 no modo positivo (A) e no modo negativo (B).

O pico 1 foi identificado como sendo o ácido cafeico-hexosídeo, o íon molecular mostrou a substância com aduto com o cloro 377,04 $[M - H + Cl]^-$, o íon com a massa real do composto foi visto em EM² m/z 341 $[M - H - Cl]^-$ e forneceu os íons fragmentos m/z 179 $[M - H - Cl - \text{hexose}]^-$ (íon base) e m/z 161 $[M - H - Cl - \text{hexose} - H_2O]^-$ (HOSSAIN et al., 2010; NEGRI et al., 2018).

O espectro de massas no modo positivo exibiu o pico 2, que foi identificado como salsolinol, um alcaloide isoquinolínico. O espectro apresentou íon molecular 180,04 $[M+H]^+$, íons fragmentos em EM² m/z 163 $[M + H - NH_3]^+$ e EM³ m/z 145 $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ e m/z 137 (CAI; LIU, 2008). O salsolinol já foi encontrado em espécies como *Musa paradisiaca* e *Theobroma cacao* L. (RIGGIN et al, 1976; MELZIG et al., 2000). O salsolinol já foi isolado em uma espécie da família Menispermaceae, sendo ela *Tinospora crispa* (PRAMAN et al., 2012).

O pico 3 do espectro no modo positivo foi identificado como o nucleosídeo guanosina, apresentando íon molecular 284,04 $[M+H]^+$ e íon fragmento m/z 152 $[M + H - \text{ribose}]^+$ (LIU et al., 2008).

O pico 4 foi apontado como ácido siríngico-O-hexosídeo, obtido no modo negativo. Exibiu íon molecular 359,06 $[M - H]^-$ e íons fragmentos m/z 197 $[M - H - \text{hexose}]^-$, m/z 182 $[M - H - \text{hexose} - \text{CH}_3]^-$ e m/z 167 $[M - H - \text{hexose} - 2x\text{CH}_3]^-$. Foi isolado pela primeira vez na espécie *Anodendron affine* (Apocynaceae) (SHIMA; HISADA; INAGAKI, 1971).

O pico 5, no modo positivo, foi verificado como sendo o alcaloide magnoflorina, com íon molecular 342 $[M+H]^+$ e íons fragmentos em EM^2 m/z 297 $[M+H - (\text{CH}_3)_2\text{NH}]^+$ e, em MS^3 m/z 282 $[M+H - (\text{CH}_3)_2\text{NH} - \text{CH}_3]^+$, m/z 265 $[M+H - (\text{CH}_3)_2\text{NH} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ e m/z 233 $[M+H - (\text{CH}_3)_2\text{NH} - 2x\text{CH}_3\text{OH}]^+$. Em alcaloides aporfínicos, é comumente visualizada na fragmentação inicial a perda de metilamina (dimetilamina, nesse caso) e, em seguida, ocorre a dissociação de grupos ligados a estrutura (SHIM et al., 2013; SINGH et al., 2017). É um alcaloide encontrado em diversas famílias botânicas: Magnoliaceae, Ranunculaceae, Annonaceae, Berberidaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Rutaceae, Aristolochiaceae e Rhamnaceae (BUCKINGHAM et al., 2010).

O pico 6 foi reconhecido como um derivado do álcool benzílico, onde encontra-se ligado a uma hexose e a uma pentose (álcool benzílico-hexose-pentose). O espectro no modo negativo exibiu o pico do íon molecular 437,08 $[M - H + \text{Cl}]^-$, o íon sem o aduto do cloro foi m/z 401, sendo a massa real do composto, em MS^3 foram vistos os fragmentos m/z 269 $[M - H - \text{pentose}]^-$, m/z 197 e m/z 161 (BYSTROM et al., 2008).

O pico 7 e sua fragmentação, visualizada no modo negativo, correspondem a aromadendrina-hexosídeo com íon molecular 449,06 $[M - H]^-$, e íon fragmento m/z 287 $[M - H - \text{hexose}]^-$, esse último condiz com a aglicona aromadendrina. Outros picos de fragmentação da aglicona são: m/z 269 $[M - H - \text{hexose} - \text{H}_2\text{O}]^-$, m/z 259 $[M - H - \text{hexose} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^-$, m/z 243 e m/z 215 (CHEN et al., 2016). O composto já foi isolado da espécie *Agrimonia pilosa* da família Rosaceae (KATO et al., 2010) e ainda de *Averrhoa carambola* L. da família Oxalidaceae (JIA et al., 2018).

O pico 8 foi verificado como sendo um C-glicosídeo da apigenina (apigenina-6-C-glicosídeo) visto no modo negativo e, revelou o íon molecular $[M-H]^-$ 431,05 e fragmentos m/z 413 $[M - H - \text{H}_2\text{O}]^-$, 341 $[M - H - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]^-$, pico base em MS^2 foi m/z

311 $[M - H - C_4H_8O_4]^-$, m/z 283 $[M - H - C_4H_8O_4 - CO]^-$, m/z 311 $[M - H - \text{hexose}]^-$. O padrão de fragmentação discutido é referente à fragmentação da unidade de açúcar, já que em C-glicosídeos a fragmentação nesse último é mais facilitada (KANG et al., 2016). A posição do açúcar em 6 foi determinada pela presença do pico base m/z 311 $[M - H - 120]^-$ (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; CHEN et al., 2016). Composto já relatado em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) (CAMERO et al., 2017) e *Geranium molle* L. (Geraniaceae) (GRAÇA et al., 2019).

O pico 9 foi assinalado como sendo a isoquercetina, nos dois modos de ionização: íon molecular $[M+H]^+$ 465,04 e $[M-H]^-$ 463,01, e os íons fragmentos em EM^2 m/z 303 e 301 $[- \text{hexose}]$. A fragmentação em EM^3 ($465 \rightarrow 303$) revelou os íons m/z 285 $[M + H - \text{hexose} - H_2O]^+$, m/z 257 $[M + H - \text{hexose} - H_2O - CO]^+$ e outros como m/z 229 e m/z 165. A fragmentação em EM^3 ($463 \rightarrow 301$) exibiu íons m/z 271 $[M - H - \text{hexose} - CO]^-$, m/z 255 e m/z 179 (MARTUCCI et al., 2014; LI et al., 2016). É um glicosídeo da quercetina bastante difundido, exemplos de espécies em que foi isolado são *Hypericum japonicum* (Hypericaceae) (XIE et al., 2014) e *Hygrophila salicifolia* (Acanthaceae) (BHATT; NEHAL, 2019).

O pico 10 foi caracterizado como astragalina, no modo negativo. Observa-se o pico do íon molecular $[M-H]^-$ 449,07, o íon em EM^2 m/z 287 $[M + H - \text{hexose}]^+$ que se caracteriza pelo esqueleto do canferol. Em EM^3 foram vistos os íons m/z 258 $[M + H - \text{hexose} - COH]^+$, m/z 241 $[M + H - \text{hexose} - COH - OH]^+$, m/z 213 $[M + H - \text{hexose} - COH - OH - CO]^+$ (MARTUCCI et al., 2014). A astragalina é um flavonoide glicosilado amplamente distribuído em espécies vegetais, já sendo isolado no gênero *Cissampelos* em *C. pareira* (DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017).

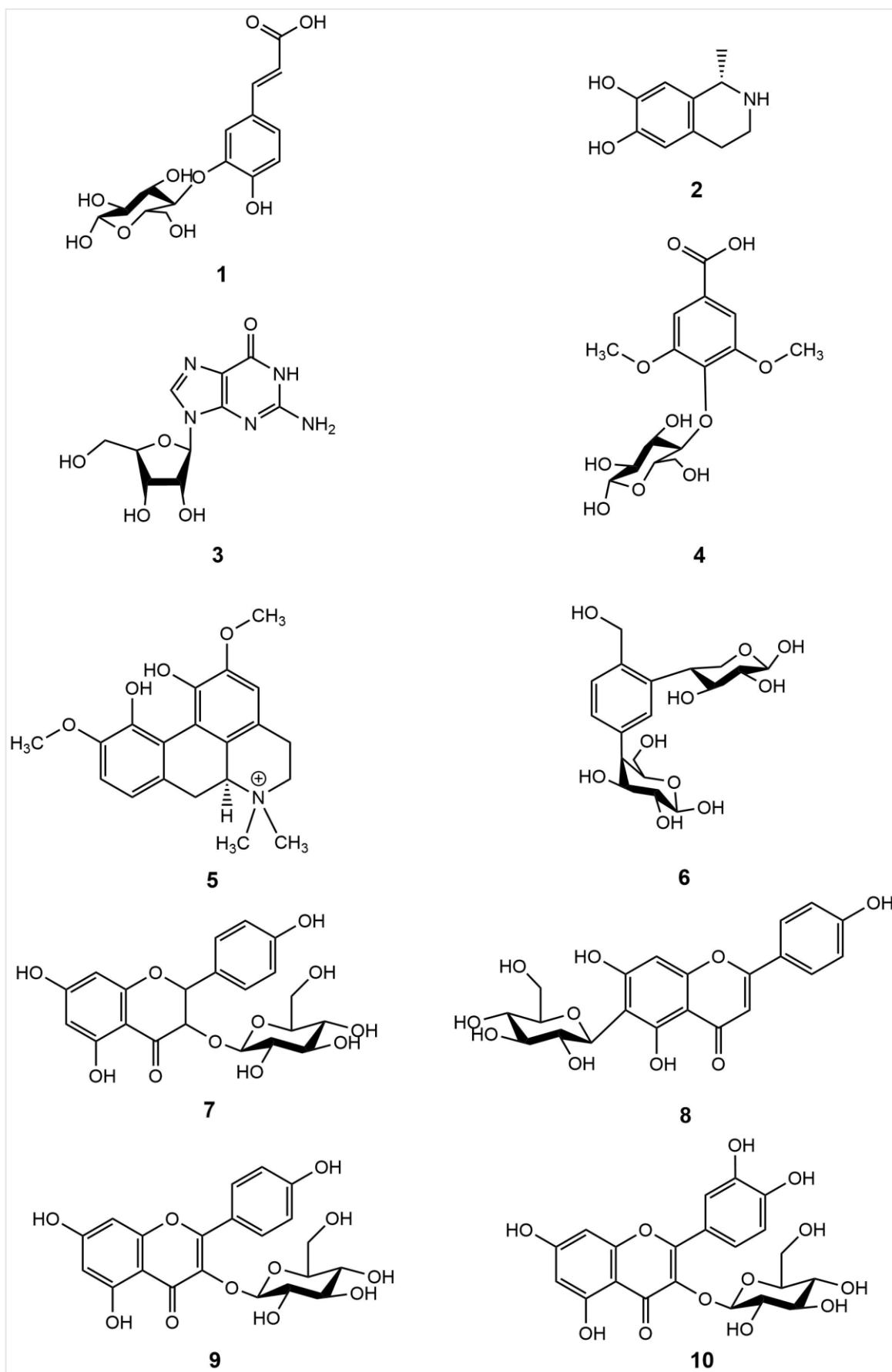
As propostas estruturais das substâncias relatadas acima podem ser visualizadas na Figura 66 (pág. 107).

Tabela 6 – Dados de fragmentação de substâncias putativamente identificadas em CsFHM 6-7 por LC-EM. A numeração é referente aos picos enumerados na Figura 65.

Pico	T.r. (min)	Estrutura proposta	Íon molecular	Fragmentação no modo positivo	Fragmentação no modo negativo	Referência
1	5,4	Ácido cafeico-hexosídeo	341 [M-H] ⁻	-	179, 161	HOSSAIN et al., 2010.
2	6,1	Salsolinol	180 [M+H] ⁺	163, 145, 137	-	CAI; LIU et al., 2008.
3	22,2	Guanosina	284 [M+H] ⁺	152	-	LIU et al., 2008
4	39,2	Ácido siríngico-O-hexosídeo	359 [M-H] ⁻	-	197, 182, 167, 153	HOFMANN et al., 2016.
5	55,0	Magnoflorina	342 [M+H] ⁺	-	297, 282, 265, 233	SINGH et al., 2017.
6	56,1	Álcool benzílico-hexose-pentose	437 [M-H] ⁻	-	401, 293, 269, 197, 161	BYSTROM et al., 2008.
7	59,0	Aromadendrina-hexosídeo	449 [M-H] ⁻	-	311, 287, 269, 259, 243, 215	CHEN et al., 2016
8	82,5	Apigenina-6-C-glicosídeo	431 [M-H] ⁻	-	413, 341, 311, 283, 269	KANG et al., 2016.
9	85,3	Isoquercetina	465 [M+H] ⁺ / 463 [M-H] ⁻	303, 285, 257, 229, 165	301, 271, 255, 179	MARTUCCI et al., 2014; CHEN et al., 2016.
10	91,8	Astragalina	449 [M+H] ⁺	287, 258, 241, 213	-	MARTUCCI et al., 2014.

T.r. = tempo de retenção.

Figura 66 – Proposta de substâncias presentes na fração CsFHM 6-7 identificadas por CL-EM/EM.



Fonte: Autor

5.3. Docking molecular

5.3.1. Re-docking

Antes dos estudos de *docking*, foi realizada a validação de *docking* molecular dos alcaloides de *C. sympodialis* por meio do *re-docking* entre o ligante, o etoposídeo, e a enzima co-cristalizada, a Topoisomerase II α . Não foi necessário a realização do *re-docking* no DNA, já que ele não apresenta ligante complexado. O *re-docking* consiste em posicionar e prever a afinidade de ligação do ligante cristalográfico na região do sítio ativo da proteína.

Os valores do *re-docking* da Topoisomerase II α complexada com o DNA (PDB ID: 5GWK) podem ser visualizados na Tabela 7. Nela encontram-se os valores de Energia Livre de Ligação (Kcal.mol⁻¹), constante de afinidade (K_i) (nM) e valor de RMSD (Desvio médio quadrático do ligante antes e depois do ancoramento) da entropia do grupamento (*clustering*).

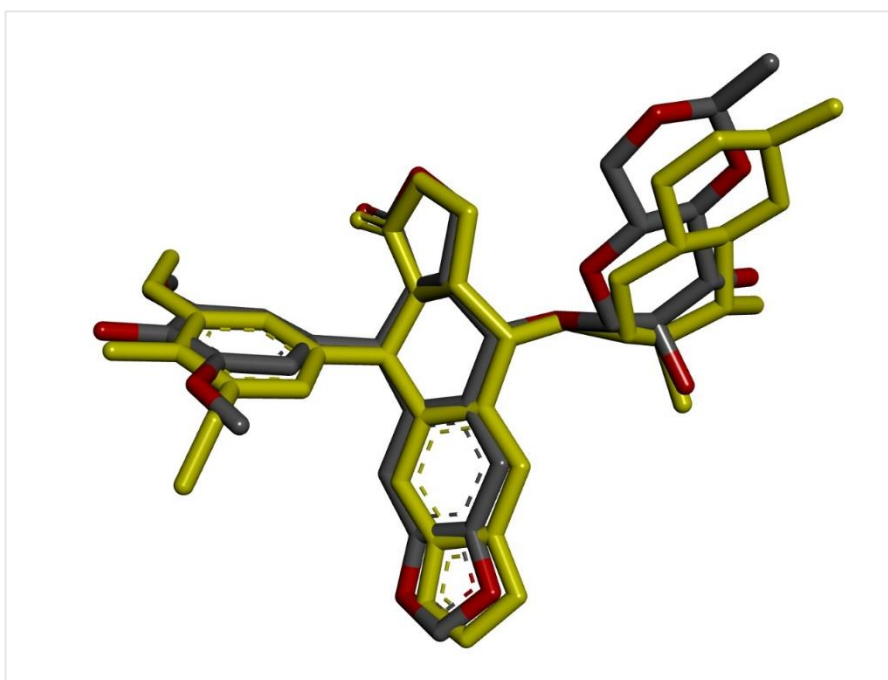
O desempenho do método foi medido por meio do desvio médio da raiz quadrada (do inglês “*Root Mean Square Deviation*” – RMSD), que é calculado usando as coordenadas dos átomos mais pesados da estrutura cristalográfica determinada experimentalmente e a pose acoplada, ou seja, a distância média quadrática entre esses átomos do ligante na estrutura cristalina e os átomos correspondentes na pose ancorada. Observar o valor (melhor pontuação) de RMSD é uma boa forma de avaliar a capacidade de um método em encontrar o modo de ligação de um ligante em um conjunto de posições. Para que o docking seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2.0 Å. Portanto, o RMSD menor que 2,0 Å é largamente aceito como discriminante na reprodução de um modo de ligação conhecido, indicando se o método obteve êxito ou fracasso (YUSUF et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2012).

Tabela 7 – Dados de *re-docking* da Topoisomerase II α (5GWK).

Ligante	5GWK		
	Energia Livre de Ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (k _i)(nM)	RMSD (clustering) (Å)
Etoposídeo	-12,08	1,39 nM	0,14

Os dados na Tabela 7 mostram o êxito do método e o validam, já que o valor de RMSD foi 0,14 Å, sendo menor que 2,0 Å. Além disso, observam-se valores notavelmente baixos de Energia Livre de Ligação e Constante de Afinidade, visto que quanto menor a energia livre de ligação maior a afinidade do ligante a proteína (DU et al., 2016). Nessa situação, o etoposídeo exibe forte inibição da Topoisomerase II α . A Figura 67 ilustra a posição espacial do etoposídeo redocado e o mesmo co-cristalizado com a enzima.

Figura 67 – Sobreposição do etoposídeo (em amarelo) redocado e co-cristalizado (em cinza).



Os dados de RMSD podem ser confirmados pela sobreposição do ligante com a estrutura cocrystalizada, vista na figura 67. É possível visualizar a posição espacial do etoposídeo docado em relação ao ligante co-cristalizado e perceber uma estreita semelhança na posição dos átomos das duas estruturas.

5.3.2. *Docking* molecular dos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. para Topoisomerase II α .

Para o estudo de *docking* molecular, estruturas de sete alcaloides previamente isolados e relatados na literatura foram utilizados para análise de afinidade de ligação e interação com o complexo TopoII α /DNA (PDB ID: 5GWK) e o B-DNA (PDB ID:

1BNA), sendo eles: laurifolina, milonina, warifteina, metilwarifteina, roraimina, des-7'-O-metilroraimina e epi-des-7'-O-metilroraimina. Na Tabela 8 podem ser vistos os resultados do *docking* molecular dos alcaloides.

Tabela 8 – *Docking* molecular dos alcaloides para TopoII α /DNA (PDB ID: 5GWK) e o B-DNA (PDB ID: 1BNA)

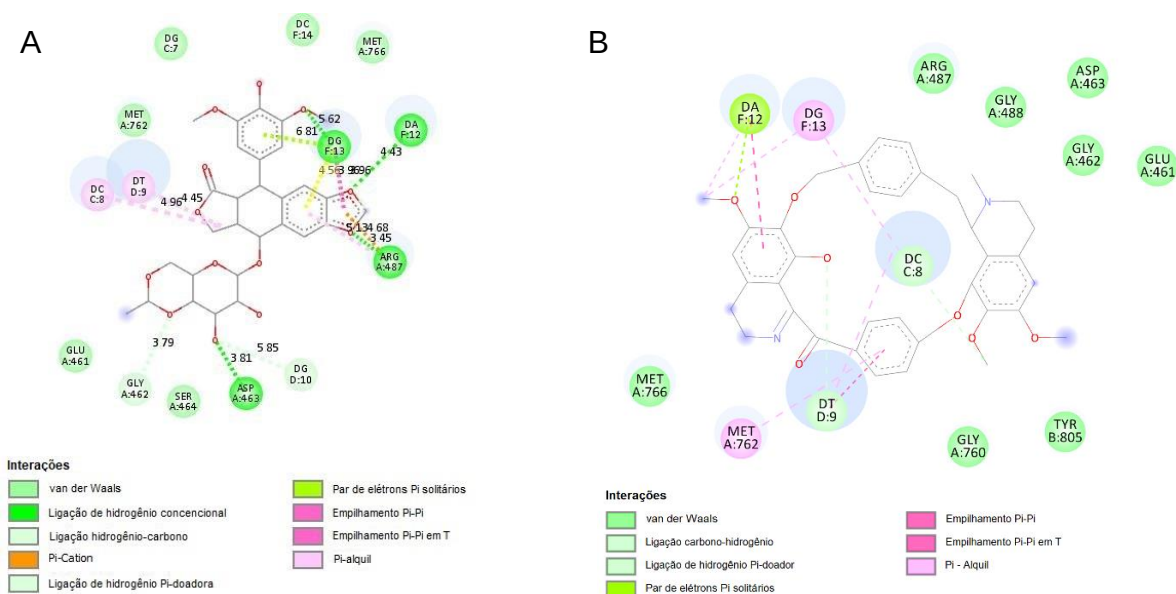
Alcaloide	Energia Livre de Ligação (Kcal.mol ⁻¹)		Interação com resíduos da Topo II α /DNA			
	Topo II α /DNA	B-DNA	Ligação de H	Pi-alquil Alquil	Pi - sigma	Empilhamento Pi-pi
Laurifolina	-8,84	-10,31	DG13, Asp-463, Ser-464	-	DT9	-
Milonina	-8,77	-8,77	Asp-463	-	-	-
Warifteina	-8,41	-8,41	DT9, Ala-801	DA12, DG13, Ile-769	-	DT9
Metilwarifteina	-9,27	-9,27	-	Ile-769, Met-765, Met 762, DC8	-	DC11
Roraimina	-12,08	-11,49	-	DG13, DA12, Met-762	-	DT9, DA12
Des-7'-O-metilroraimina	-10,12	-12,04	-	Met-768, DG7, DG10, DC8	DA6	-
Epi-des-7'-O-metilroraimina	-8,22	-9,94	DA12, DG13,	Pro-803, Met-762, Met, 765	-	-
Etoposídeo	-12,08	-	DG13, DA12, Arg-487, Asp-463	-	-	DT9, DC8

Neste estudo, foi utilizado o programa AutoDockTools (ADT) 1.5.6 para o *docking* molecular, que ranqueia os melhores resultados pelos valores de energia de ligação mais negativos. Assim, quanto menor esses valores, maior a afinidade de ligação entre o composto e a proteína em estudo. Nota-se que, ao analisar a Tabela 8, que a Roraimina apresentou o menor valor de energia livre de ligação (-12,08 Kcal.mol⁻¹), se equiparando ao fármaco de uso clínico Etoposídeo.

A warifteína, metilwarifteína, roraimina, des-7'-O-metilroraimina e a epi-des-7'-O-metilroraimina são alcaloides estruturalmente semelhantes, com pequenas diferenças no esqueleto da molécula. Esse fato permite sugerir que a presença de uma carbonila no carbono 15 e a metilação da hidroxila do carbono 7' estão envolvidos no processo de conformação da molécula e consequentemente no favorecimento da ligação com o complexo Topoisomerase II α /DNA, melhorando sua atividade e consequente inibição da enzima. As estruturas que não possuem uma metoxila na posição 7' tem a energia livre de ligação ligeiramente menor em comparação as que são metoxiladas; a wariteína, por não possuir nenhuma das substituições mencionadas, foi a estrutura que apresentou resultados menos satisfatórios quando comparada às outras estruturas similares. Dentre os alcaloides majoritários das partes aéreas de *C. sympodialis* (warifteína, metilwarifteína e milonina), a metilwarifteína teve melhor resultado.

Na figura 68 (pág. 112) é visto que a roraimina (-12,08 Kcal.mol⁻¹) apresentou interação Pi-alquil entre o resíduo MET-762 e anel aromático D, e ainda uma interação de empilhamento Pi-Pi em T entre o anel D com a Timina-9. Uma ligação carbono-hidrogênio é observada entre a hidroxila do anel F com a Timina-9. A Adenina-12 interage com o anel F por empilhamento Pi-Pi, com o oxigênio da metoxila mediante ligação com um par de elétrons Pi livres e com o grupo metila por ligação Pi-alquil. Outras interações são com a Guanina-13 por meio de uma Pi-Alquil com o grupo metila do anel F e a ligação carbono-hidrogênio do grupo metila do anel A com Citosina-8. A maioria das interações da roraimina com a Topo II α complexada com DNA são com nucleotídeos da fita de DNA, isso indica que a roraimina pode manter o complexo Topo II α /DNA, impedindo a religação da fita de DNA e, consequentemente, o aumento de radicais e fragmentos de DNA, levando a um quadro apoptótico.

Figura 68 – Docking molecular do etoposídeo (A) e roraimina (B) com Topo II α /DNA em 2D.



Observou-se que a roraimina apresentou interações com resíduos de forma similar ao etoposídeo. Por exemplo, ambas as estruturas interagem com os resíduos de DNA Timina-9, Adenina-12, Guanina-13, Citosina-8, por intermédio de ligações de hidrogênio, interações com pares de elétrons livres, empilhamento Pi-Pi e Pi-alkil. Como os valores de energia livre de ligação entre o etoposídeo e a roraimina são equivalentes, acredita-se que as ligações com estruturas do DNA desempenham papel mais significativo para a atividade inibitória do complexo Topo II α /DNA, visto que as duas estruturas apresentaram tipos de interações semelhantes com os mesmos resíduos.

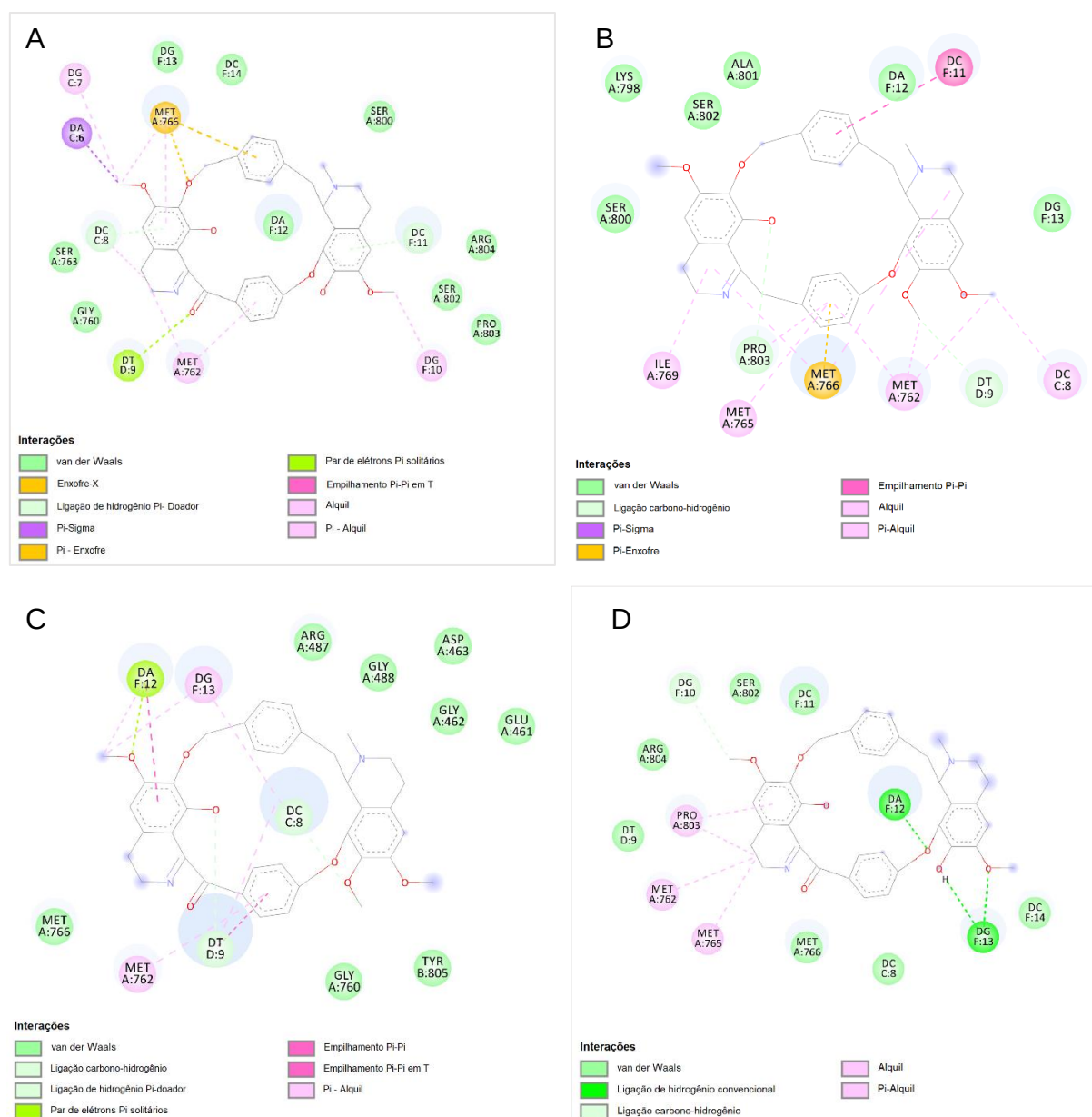
Outra semelhança é que ambas exibem interações com alguns resíduos da Topoisomerase, também iguais; interações do tipo van der Waals com os resíduos MET-766 e GLU-461 em ambas; e outros tipos de ligações com ARG-487, ASP-463 e MET-762, os dois primeiros interagindo com ligações de hidrogênio no etoposídeo e Van der Waals na roraimina, e o último por ligação Pi-alkil na roraimina e Van der Waals no etoposídeo. Muitas interações de van der Waals com as estruturas da proteína confere à roraimina mais estabilidade no local ativo, as quais, num somatório, reduzem a energia livre total, o que pode ser uma das justificativas da similaridade entre os valores a roraimina e o etoposídeo.

Dessa forma, além das interações com o DNA, outras interações entre a proteína e a molécula ligada são necessárias para interromper a Topoisomerase II no local de clivagem, essas interações proteína-droga estabilizam a clivagem de ligação

sítio-específica por meio de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (ALMEIDA et al., 2017).

Na Figura 69 visualiza-se a comparação entre a roraimina, Des-7'-O-metilroraimina, epi-des-7'-O-metilroraimina e metilwarifteína, dado que foram as três estruturas com melhores resultados.

Figura 69 – Docking molecular da Des-7'-O-metilroraimina (A), metilwarifteína (B), roraimina (C) e epi-des-7'-O-metilroraimina (D) com Topo II α /DNA em 2D.



As estruturas da des-7'-O-metilroraimina e metilwarifteína exibem mais ligações com estruturas da proteína do que com as do DNA, ao contrário da roraimina

que promoveu mais ligações com os nucleotídeos do mesmo. Nota-se que des-7'-O-metilroraïmina ainda apresentou ligações com alguns resíduos de nucleotídeos, porém, alguns resíduos diferentes dos vistos nas ligações do etoposídeo, pressupondo que foi a razão pela qual sua energia livre sofreu um pequeno aumento.

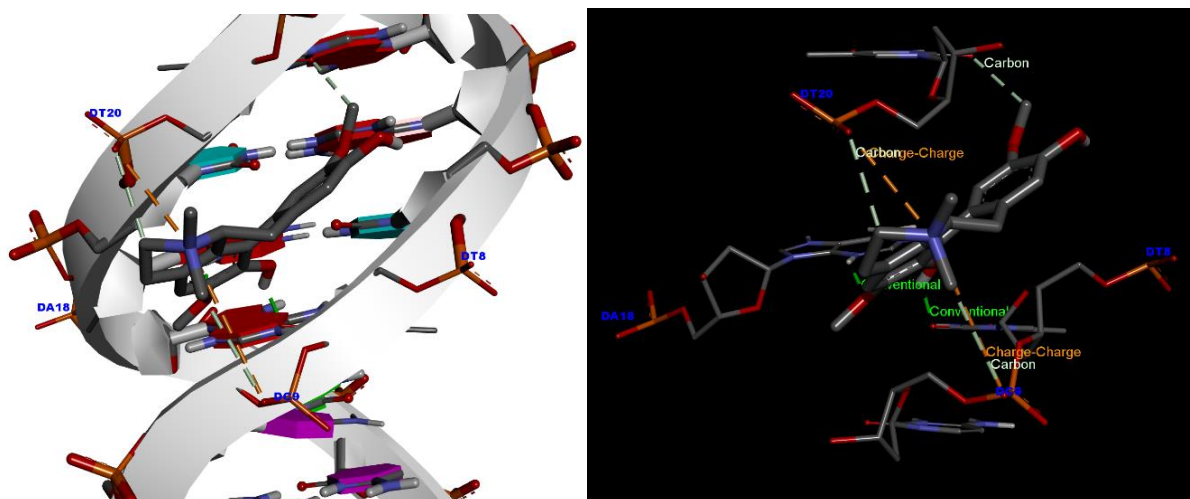
Percebe-se também a influência da estereoquímica na energia livre dos compostos docados observando as estruturas A e D, que são isômeros. Na Figura 69, é visto que a estrutura A, S-des-7'-O-metilroraïmina, faz mais ligações que seu isômero R-des-7'-O-metilroraïmina (B); possibilitando uma conformação que melhore as interações totais da molécula. Logo, de acordo com a energia livre de ligação, o isômero S (des-7'-O-metilroraïmina) é mais ativo do que o R (epi-des-7'-O-metilroraïmina).

De modo geral, a presença de múltiplos anéis aromáticos na molécula favorecem o empilhamento com os nucleotídeos, por esse motivo algumas estruturas apresentaram maior interação com elementos do DNA (SILVA FILHO et al., 2019; GOUVEIA et al., 2019).

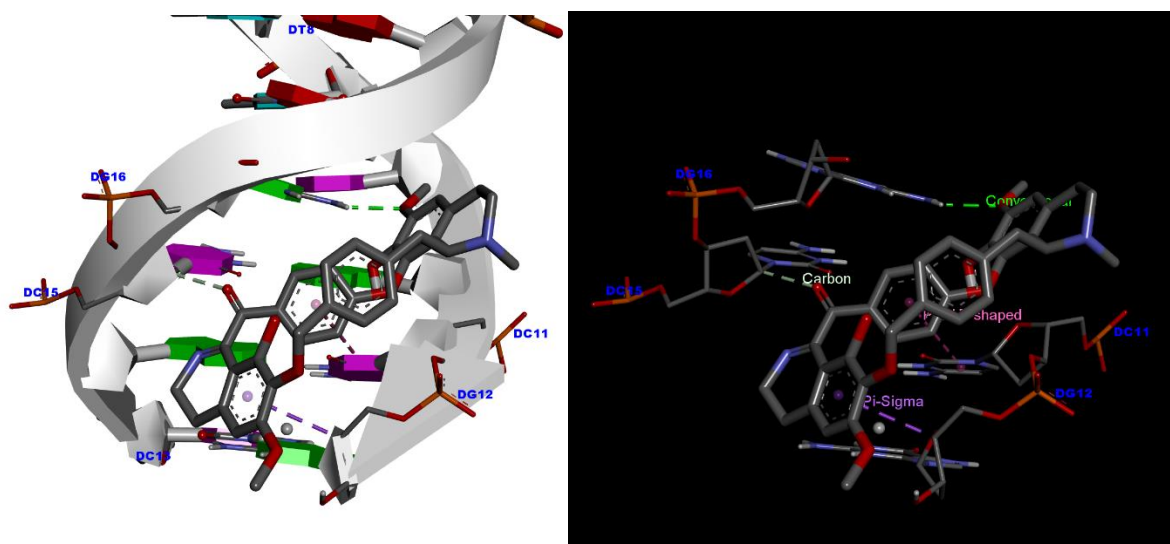
5.3.3. *Docking* molecular dos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. para DNA.

O *docking* também foi feito sem a estrutura proteica da topoisomerase, para investigar a capacidade dos compostos de interagirem diretamente com o DNA e assim promover uma ação intercalante ou interação com os sulcos maiores e menores do B-DNA, promovendo uma provável atividade anticâncer. Os valores de energia livre de ligação com o B-DNA podem ser vistos na Tabela 8 (pág. 110).

Ao interpretar os dados da tabela, nota-se que a des-7'-O-metilroraïmina demonstrou melhor resultado (12,04 Kcal.mol⁻¹) com menor energia livre entre os compostos analisados; vale acrescentar que a laurifolina (10,31 Kcal.mol⁻¹) também apresentou melhoria em relação aos valores com a Topoisomerase complexada. As Figuras 70 e 71 demonstram como as estruturas interagem com o B-DNA.

Figura 70 – Interação da laurifolina com o B-DNA.

A laurifolina faz ligações de hidrogênios com Timina-8 e Adenina-18, ligações de cargas atrativas e de carbono com Timina-20 e Citosina-9. As ligações carga-carga são realizadas entre o Nitrogênio carregado positivamente da laurifolina com os oxigênios dos resíduos de nucleotídeos, a ligações de carbono se fazem também por ligações com os oxigênios da fita de DNA. Moléculas orgânicas carregadas positivamente tem tendência a ocupar lugares de cátions como Na^+ e Mg^{2+} , que estabilizam a estrutura do DNA, além de ligações eletrostáticas entre a carga positiva e negativa do fosfato que são importantes para a ligação e intercalação entre os sulcos do DNA (ALMEIDA et al., 2017).

Figura 71 – Interação da des-7'-O-metilrouraimina com o B-DNA.

A des-7'-O-metilroraimina faz uma ligação de hidrogênio Guanina-16, um empilhamento Pi-Pi em T com Citosina-11, uma interação Pi-Sigma com Guanina-12 e ligação com um carbono da Citosina-15. Diferentemente da laurifolina, a des-7'-O-metilroraimina não possui cargas positivas na sua molécula para interagir com os grupos fosfato do DNA, contudo, possui anéis aromáticos não ligados (não fundidos) ligados por ligações que permitem a livre torção desses sistemas (bem como outros derivados bisbenzilisquinolínicos), tornando possível adquirir uma conformação apropriada para se ajustar ao ambiente ativo da proteína e/ou da curva helicoidal do sulco do DNA (STREKOWSKI; WILSON, 2007). Além disso, as principais forças de intercalação do DNA são as interações com elétrons π e ainda, que contribuem fortemente, as interações hidrofóbicas e de van der Waals (SONI et al., 2017).

Diante do exposto, infere-se que os alcaloides de *Cissampelos sympodialis* são interessantes candidatos a fármacos com ação anticancer e ainda, antibacteriana e antiparasita, já que essas atividades farmacológicas também podem ser alcançadas devido a ação de compostos nas Topoisomerases (MUKHERJEE; SASIKALA, 2013). Os alcaloides com esqueletos bisbenzilisquinolínicos, a princípio, demonstraram melhores resultados em relação aos alcaloides de núcleos fundidos, e adicionalmente, interagem mais facilmente com o DNA, indicando que seriam bons ligantes no estudo de modo de ligação com as cadeias.

Os esqueletos bisbenzilisquinolínicos quando comparados com outras estruturas, seriam candidatos a “venenos de topoisomerase” e, conseqüentemente, úteis no tratamento antitumoral, já que essas moléculas interagem tanto com a interface da topoisomerase quanto do DNA. Além disso, técnicas de química orgânica podem ser utilizadas no melhoramento dessas moléculas naturais a fim de melhorar tanto suas características farmacodinâmicas quanto farmacocinéticas.

5.4. Teste de citotoxicidade

O extrato etanólico bruto de *C. sympodialis*, a fração total de alcaloides (FAT) e as substâncias vicentina-2 (Cs-2) e canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo (Cs-4), foram avaliadas quanto a sua capacidade de induzir efeitos citotóxicos em células de câncer de mama (MDA-MB-231), melanoma humano (SK-MEL), carcinoma de cólon (HCT-116) e adenocarcinoma cervical (HeLa) e em células normais de queratinócitos humanos (HaCat).

O ensaio de MTT se baseia na conversão do MTT em cristais de formazan por células vivas, determinando a atividade mitocondrial, dado que para maioria de células a atividade das mitocôndrias está relacionada ao número de células viáveis, sendo largamente usado para mensurar os efeitos citotóxicos *in vitro* de drogas em linhagens celulares ou células primárias de pacientes (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Os resultados do ensaio foram expressos em porcentagem de crescimento em comparação com os grupos não tratados e podem ser vistos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Inibição do crescimento de células pelo EEB (extrato etanólico bruto), FAT (fração de alcaloides totais), vicianina-2 (Cs-2) e canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo (Cs-4).

Amostra	Inibição do crescimento (%)			
	MDA-MB-231	SK-MEL	HCT-116	HeLa
EEB	55,81 $\pm$ 2,67	9,16 $\pm$ 3,48	70,69 $\pm$ 0,63	-
FAT	96,77 $\pm$ 0,18	95,96 $\pm$ 0,07	99,18 $\pm$ 0,21	-
Cs-2	13,18 $\pm$ 0,56	0 $\pm$ 0,57	33,68 $\pm$ 1,35	-
Cs-4	40,11 $\pm$ 0,39	0 $\pm$ 0,87	14,25 $\pm$ 1,25	6,72 $\pm$ 0,57

MDA-MB-231 = câncer de mama; SK-MEL = melanoma humano; HCT-116 = carcinoma de cólon; HeLa = adenocarcinoma cervical.

Tabela 10 – Inibição do crescimento em células não-tumorais (HaCat).

Amostra	Inibição do crescimento (%)
	HaCaT
EEB	47,85 $\pm$ 0,59
FAT	98,64 $\pm$ 0,30
Cs-2	-
Cs-4	0 $\pm$ 4.17

O extrato etanólico bruto apresentou maior atividade em células de carcinoma de cólon, com 70,69% de inibição, atividade moderada contra células de câncer de mama, inibindo 55,81% do crescimento e não mostrou atividade contra células de melanoma humano e baixa atividade para queratinócitos normais.

A FAT demonstrou forte indução citotóxica em todas as linhagens testadas, inclusive células não-tumorais. Isso pode se justificar pela concentração da amostra e pela presença de diferentes estruturas de alcaloides encontrados na milona.

A vicianina-2 não demonstrou atividade citotóxica em células de câncer de mama e melanoma humano e, baixa atividade para carcinoma de cólon. O canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo mostrou-se sem ação citotóxica para nas células de melanoma humano, carcinoma de cólon e adenocarcinoma cervical. Dos dois flavonoides glicosilados testados, a maior inibição causada por eles foi de 40,11% em células de câncer de mama pelo canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo.

Os baixos valores de atividade citotóxica podem ser justificados pela glicosilação dessas substâncias. De modo semelhante, Wang e colaboradores (2018) avaliaram a citotoxicidade pelo método de MTT do canferol e três dos seus derivados glicosilados (canferol-7-O-glicosídeo, canferol-3-O-ramnosídeo e canferol-3-O-rutinosídeo) em células de carcinoma hepatocelular humano, células de câncer de cólon de ratos e melanoma de ratos; eles observaram que o canferol demonstrou forte atividade antiproliferativa, ao contrário de seus derivados glicosilados que não demonstraram atividade inibitória. Um fator que deve ser considerado é a concentração, os flavonoides foram testados na concentração de 25 μ M, uma concentração muito baixa para apresentar efeito significativo.

O grau de lipofilicidade é importante na atividade citotóxica, de modo que quanto maior sua afinidade aos lipídios melhor a sua atividade. O fato da hidrofília dos flavonoides aumentar de acordo com o número de radicais hidroxila e grupos osídicos reforça a baixa atividade citotóxica dos flavonoides glicosilados testados (YANG et al., 2014; VELEVA et al., 2016).

Em síntese, existe a possibilidade do EEB das partes aéreas de milona, após testes mais aprofundados, ser utilizado como tratamento complementar de câncer de cólon e de mama. A FAT demonstrou atividades elevadas nas três linhagens testadas, sendo necessários mais estudos a fim de descobrir a concentração segura de uso sem que aja repercussão em células saudáveis. E quanto aos glicosídeos, alterações estruturais podem ser realizadas para melhorar sua atividade citotóxica.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. promoveu o isolamento de quatro substâncias glicosiladas, sendo elas: o nucleosídeo adenosina, o flavonoide C-glicosídeo vicienina-2, e os O-glicosídeos quercetina-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo e canferol-3-O- β -glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo. Visto que são conduzidos estudos com a espécie desde os anos 80, se concentrando nos seus compostos alcaloídicos, os glicosídeos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie.

O estudo de espectrometria de massas da fração em estudo levou a identificação de 10 substâncias presentes na amostra: ácido cafeico-hexosídeo, salsolinol, guanosina, ácido siríngico-O-hexosídeo, magnoflorina, álcool benzílico-hexose-pentose, aromadendrina-hexosídeo, apigenina-6-C-glicosídeo, isoquercetina e astragalina.

O estudo *in silico* apontou que a roraimina é um bom candidato para estudos acerca da sua capacidade antitumoral por interação com a Topoisomerase II α e com o DNA e a des-7'-O-metilororaimina como ligante de DNA. De modo geral, os alcaloides bisbenzylisoquinolínicos demonstram interações com os alvos em questão, úteis na atividade anticâncer.

O ensaio de MTT apontou que o EEB das partes aéreas possui atividade inibitória de células de câncer de cólon e de mama. A FAT foi capaz de inibir fortemente as linhagens de câncer de cólon, câncer de mama e melanoma humano, embora tenha apresentado ação contra células normais. O teste também demonstrou que os flavonoides glicosilados não possuem atividade significativa contra as linhagens de células cancerosas testadas.

Conclui-se que a espécie tem potencial atividade antitumoral e que eventualmente pode ser usada como complemento no tratamento do câncer, além de teoricamente possuir compostos químicos que podem vir a se tornarem fármacos atuantes contra neoplasias.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGARWAL, J.; VERMA, D.L. Antioxidative activity and flavonoid composition from *Lepidium sativum*. **Nat. Sci**, v. 9, p. 21-25, 2011.
- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.
- AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1394-1398, 2011.
- AKAH, P. A.; NWAFOR, S. V. Studies on anti-ulcer properties of *Cissampelos mucronata* leaf extract. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 36-938, 1999.
- AKHREM, A. A.; MIKHAILOPULO, I. A.; ABRAMOV, A. F. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy of selected adenine nucleosides: Structural correlation and conformation about the glycosidic bond. **Organic Magnetic Resonance**, v. 12, n. 4, p. 247-253, 1979.
- AL-RASHIDA, M.; AHSEN, S. In search of a docking protocol to distinguish between DNA intercalators and groove binders: genetic algorithm vs. shape-complementarity based docking methods. **Rsc Advances**, v. 5, n. 88, p. 72394-72404, 2015.
- ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 1994. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 1994.
- ALMAQWASHI, A. A.; PARAMANATHAN, T.; ROUZINA, I.; WILLIAMS, M. C. Mechanisms of small molecule–DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 3971-3988, 2016.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; DE ASSIS, T. S.; DE 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, n. 3, p. 247–252, 1998.
- ALMEIDA, S. M. V.; RIBEIRO, A. G.; SILVA, G. C. L.; ALVES, J. E. F., BELTRÃO, E. I. C., OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; LIMA, M. D. C. A. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538-1556, 2017.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ALVES, M. F.; SCOTTI, M. T.; FELIX, M. B.; ISHIKI, H. M.; MELO, C. R.; RIBEIRO, F. F.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, K. M.; PAULA, A. F. R.; MENDONÇA-JR, F. J. B.; SCOTTI, L.; PAZ, A. R.; SANTOS, S. G.; DINIZ, M. F. F. M. In silico and in vivo toxicological evaluation of *Cissampelos sympodialis* secondary metabolites in *Rattus Norvegicus*. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 6, p. 566-576, 2017.

AMRESH, G.; SINGH, P. N.; RAO, C. V. Toxicological screening of traditional medicine Laghupatha (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 454-460, 2008.

BABAJIDE, J. O.; MABUSELA, W. T.; GREEN, I. Some alkaloids and flavonoids from *Cissampelos capensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 2, p. 16-29, 2015.

BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 386–394, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the Menispermaceae. Em: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Chicago: Elsevier, 2000, p. 1-190.

BHATT, M. K.; SHAH, N. Isolation and Structure Elucidation of Isoquercitrin from the Whole Herb of *Hygrophila salicifolia* (Acanthaceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 11, n. 2, p. 51-55, 2019.

BRAGA, J. M. A. Menispermaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

BRITO-ARIAS, M. Nuclear magnetic resonance of glycosides. In: **Synthesis and Characterization of Glycosides**. Springer, Cham, 2016. p. 369-389.

BUCKINGHAM, J.; BAGGALEY, K. H.; ROBERTS, A. D.; SZABÓ, L. F. Dictionary of Alkaloids. 2nd ed. New York: CRC Press, 2010.

BYSTROM, L. M.; LEWIS, B. A.; BROWN, D. L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R. L. Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017-1024, 2008.

CAI, M.; LIU, Y. M. Quantification of salsolinol enantiomers by stable isotope dilution liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 24, p. 4171-4177, 2008.

CAMERO, C. M.; TEMRAZ, A.; BRACA, A.; DE LEO, M. Phytochemical study of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 69-72, 2017.

CAVALCANTI, A. C.; GOMES, A. N. P.; PORTO, N. M.; AGRA, M. F.; MOURA, T. F. A. L.; OLIVEIRA, E. J. Pharmacognostic evaluation of *Cissampelos sympodialis* Eichl leaves. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 70–78, 2014.

CAVALCANTI, A. C.; MELO, I. C.; MEDEIROS, A. F.; NEVES, M. V.; 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, n. 3, p. 527–541, 2013.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHEN, G.; LI, X.; SALERI, F.; GUO, M. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1275, 2016.

CHEN, S. H.; CHAN, N.; HSIEH, T. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 139-170, 2013.

CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; MANZOCCHI, A. Complete ^1H and ^{13}C NMR spectral assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 781-784, 2007.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

CORNÉLIO, M. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CÔRTEZ, S. F.; THOMAS, G. Tracheal relaxant activity of cissaglaberrimine and trilobinine, two aporphinic alkaloids from *Cissampelos glaberrima*. **Planta Medica**, v. 65, n. 05, p. 462-464, 1999.

CORRÊA, M. F. P.; DE MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18 (Supl.), p. 785–797, 2008.

CORTÊS, 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). **Phytoterapy Research**, v. 9, p. 579-583, 1995.

CUNHA, W. E. M.; CAMILO, C. J.; NONATO, C. F. A.; MENDES, J. W. S.; CARVALHO, N. K. G.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES, F.F.G.; MATIAS, E.F.F.; ZENGIN, G.; COSTA, J. G. M. Antibiotic-potentiating activity of the Phanostenine isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 12, 2019.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DAI, X.; ZHUANG, J.; WU, Y.; WANG, P.; ZHAO, G.; LIU, Y.; JIANG, X.; GAO, L.; XIA, T. Identification of a flavonoid glucosyltransferase involved in 7-OH site glycosylation in tea plants (*Camellia sinensis*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

DE FREITAS, M. R. **Alcalóides isolados das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 1994. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa.

DE FREITAS, M. R.; CÔRTEZ, S. D.F.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Modification of Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 332–336, 1996.

DE LIRA, G. A. **Novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae).** 2001. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DE LIRA, G. A.; ANDRADE, L. M.; FLORÊNCIO, K. C.; DA SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DE-CUNHA, E. V. L. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 356–358, 2002.

DEVKOTA, H.P.; MIYAZAKI, S.; YAHARA, S. Amentoflavone and kaempferol glycosides from the aerial parts of *Cissampelos pareira*. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2017.

DU, X.; LI, Y.; XIA, Y.L.; AI, S.M.; LIANG, J.; SANG, P.; JI, X.; LIU, S.Q. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

EVANS, W.C. Alkaloids. In: **Trease and Evans Pharmacognosy**. Elsevier Health Sciences, 2009.

FAGGIO, C.; SUREDA, A.; MORABITO, S.; SANCHES-SILVA, A.; MOCAN, A.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S.M. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. **European journal of pharmacology**, v. 807, p. 91-101, 2017.

FEILY, A.; NAMAZI, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract as a possible novel and safe treatment for psoriasis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 127, n. 4, p. 241–242, 2009.

FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 222, 2012.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A.; CARVALHO JR, A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. I.; MAIS, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S.; SOUZA, V.C.; STEHMANN J.R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; LOHMANN, L. G. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012.

GAO, D. F.; XU, M.; ZHAO, P.; ZHANG, X. Y.; WANG, Y. F.; YANG, C. R.; ZHANG, Y. J. Kaempferol acetylated glycosides from the seed cake of *Camellia oleifera*. **Food chemistry**, v. 124, n. 2, p. 432-436, 2011.

GATTUSO, H.; DUCHANOIS, T.; BESANCENOT, V.; BARBIEUX, C.; ASSFELD, X.; BECUWE, P.; GROS, P.C.; GRANDEMANGE, S.; MONARI, A. Interaction of iron II complexes with B-DNA. Insights from molecular modeling, spectroscopy, and cellular biology. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 67, 2015.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Natural product Reports**, v. 32, n. 6, 779-810, 2015.

GHAVAM-HAGHI, F.; SADEGHI DINANI, M. Isolation and identification of astragalin and 2-methoxy tyrosol from the bulbs of *Allium paradoxum*. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 114-118, 2017.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of *AutoDock*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

GOUVEIA, R. G.; RIBEIRO, A. G.; SEGUNDO, M. Â. S. P.; OLIVEIRA, J. F.; LIMA, M. D. C. A.; LIMA SOUZA, T. R. C.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURA, R. O. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911-5921, 2018.

GRAÇA, V. C.; CALHELHA, R. C.; NUNES, F. M.; BERTHET, J.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, P. F. Isolation of secondary metabolites from *Geranium molle* L. with anticancer potential. **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 111859, 2019.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; VAN BREUSEGEM, F.; MUNNÉ-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 125-132, 2009.

HERNÁNDEZ-SANTOYO, A.; TENORIO-BARAJAS, A. Y.; ALTUZAR, V.; VIVANCO-CID, H.; MENDOZA-BARRERA, C. Protein-protein and protein-ligand docking. In: **Protein Engineering-Technology and Application**. InTech Rijeka, 2013. p. 66.

HEVENER, K.; VERSTAK, T. A.; LUTAT, K.E.; RIGGSBEE, D. L.; MOONEY, J. W. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 8, n. 6, p. 844-861, 2018.

HIMURA-LIMA, C. A.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SILVA, V. C.; VILEGAS, W. Flavonoides. In: EMERY, F. S.; MARCHETTI, J. M.; FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. **Farmacognosia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10576-10581, 2010.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55-95, 2017.

HUSAIN, S. Z.; MARKHAM, K. R. The glycoflavone vicenin-2 its distribution in related genera within the Labiatae. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1171-1173, 1981.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estatísticas de câncer. In: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 14 jan. 2020.

ISLAM, M. N.; ISHITA, I. J.; JUNG, H. A.; CHOI, J. S. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 55-62, 2014.

JIA, X.; XIE, H.; JIANG, Y.; WEI, X. Flavonoids isolated from the fresh sweet fruit of *Averrhoa carambola*, commonly known as star fruit. **Phytochemistry**, v. 153, p. 156-162, 2018.

KANG, J.; PRICE, W. E.; ASHTON, J.; TAPSELL, L. C.; JOHNSON, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of *Sorghum wholegrains* by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 211, p. 215-226, 2016.

KATO, H.; LI, W.; KOIKE, M.; WANG, Y.; KOIKE, K. Phenolic glycosides from *Agrimonia pilosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p. 1925-1929, 2010.

KAUR, R.; ARORA, S. Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. **Journal of Critical Reviews**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2015.

KHAN, A. Y.; KUMAR, G. Natural isoquinoline alkaloids: binding aspects to functional proteins, serum albumins, hemoglobin, and lysozyme. **Biophysical Reviews**, v. 7, n. 4, p. 407-420, 2015.

KIM, C. S.; KIM, K. H.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of the leaves of *Hosta longipes*. **Natural Product Sciences**, v. 20, n. 2, p. 86-90, 2014.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

KUKULA-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. In: **Pharmacognosy**. Academic Press, 2017. p. 163-198.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LANI, R.; HASSANDARVISH, P.; SHU, M. H.; PHOON, W. H.; CHU, J. J. H.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.; BAKAR, S. A.; ZANDI, K. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50-61, 2016.

LE ROY, J.; HUSS, B.; CREACH, A.; HAWKINS, S.; NEUTELINGS, G. Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 735, 2016.

LIMA, C. T. D.; TEIXEIRA, M.D.R. Flora of the canga of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Menispermaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 147-151, 2018.

LIMA, D. I. Identificação de compostos orgânicos na química de produtos naturais por técnicas de RMN. 2013. 111 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2013.

LIU, A., XU, L., ZOU, Z., YANG, S. Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata*. **China journal of Chinese materia medica**, v. 34, n. 7, p. 861-863, 2009.

LIU, R.; YE, Y.; QIANG, L.; LIAO, X.; ZHAO, Y. The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. **Life Science Journal**, v. 5, p. 37-40, 2008.

LU, J. H.; LIU, Y.; ZHAO, Y. Y.; TU, G. Z. New flavonoids from *Oxytropis myriophylla*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 2, p. 276-278, 2004.

MABRY T. J.; KAGAN, J.; RÖSLER, H. Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Flavonoids. 1964.

MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Science & Business Media, 1970.

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

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. ¹³C NMR of flavonoids—II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, n. 21, p. 2607-2612, 1976.

MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. **PLoS One**, v. 9, n. 4, 2014.

MASUELLI, L.; BENVENUTO, M.; MATTERA, R.; DI STEFANO, E.; ZAGO, E.; TAFFERA, G.; TRESOLDI, I.; GIGANTI, M.G.; FRAJESE, G.V.; BERARDI, G.; MODESTI, A.; BEI, R. In vitro and in vivo anti-tumoral effects of the flavonoid apigenin in malignant mesothelioma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 373, 2017.

MEDEIROS, A. F. D. **Aplicação de cromatografia a líquido de alta eficiência preparativa para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e estudo de farmacocinética preliminar de warifteína.** 2013. 168 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

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. **Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 97–102, 1998.

MELZIG, M. F.; PUTSCHER, I.; HENKLEIN, P.; HABER, H. In vitro pharmacological activity of the tetrahydroisoquinoline salsolinol present in products from *Theobroma cacao* L. like cocoa and chocolate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 153-159, 2000.

MENDONÇA-NETTO, S.; VARELA, R. W.; FECHINE, M. F.; QUEIROGA, M. N.; 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, n. 2, p. 165–169, 2008.

MORIYAMA, Hiroyoshi; IIZUKA, Toru; NAGAI, Masahiro. A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation. **Yakugaku Zasshi**, v. 121, n. 11, p. 817-820, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MOURA, W. C. S. Estudo *in silico*, síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados acridínicos com possível ação antitumoral. 2019. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2019.

MUKHERJEE, A.; SASIKALA, W. D. Drug–DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism. *In: Advances in protein chemistry and structural biology.* Academic Press, 2013. p. 1-62.

NAWWAR, M. A. M; EL-MOUSALLAMY, A. M. D; BARAKAT, H. H. Quercetin 3-glycosides from the leaves of *Solanum nigrum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1755-1757, 1989.

- NEGRI, G.; BARRETO, L. M. R. C.; SPER, F. L.; CARVALHO, C. D., CAMPOS, M.D.G. R. Phytochemical analysis and botanical origin of *Apis mellifera* bee pollen from the municipality of Canavieiras, Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.
- NONDO, R. S.; 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, n. 1, p. 33, 2011.
- OLIVEIRA, T. B.; RODRIGUES, R. P.; COSTA, F. B. A Quimioinformática na Farmacognosia. In: EMERY, F. S.; MARCHETTI, J. M.; FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. **Farmacognosia**, Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.
- OLIVEIRA - JÚNIOR, W. M. D.; Benedito, R. B.; SANTOS, C. C. D. M. P.; RODRIGUES, L. T. D.; Marinho, A. F.; DE MORAIS, L. C. S. L.; De 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, n. 4, 2011.
- OTT, C. Menispermaceae. **Flora of Ecuador**, v. 58, p. 1-81, 1997.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.
- PARK, J. S.; KIM, J. Y.; LEE, J. H.; YOUNG, H. S.; LEE, T. W. Isolation of adenosine and free amino acid composition from the leaves of *Allium tuberosum*. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 286-290, 1992.
- PATEL, N. K.; KUMAR, L. S.; GAJERA, J.; JADHAV, A. N.; MUGULI, G.; BABU, U. V. Isolation and characterization of flavonoid C-glycosides from *Prosopis glandulosa* Torr. leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 451, 2018.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2015.
- POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 82-95, 2013.
- PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. D. F. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 102–107, 2008.
- PORTO, N. M.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; OLIVEIRA, A. F. M.; AGRA, M. D. F. Leaf epidermal characteristics of *Cissampelos* L. (Menispermaceae) species from Northeastern Brazil. **Microscopy research and technique**, v. 74, n. 4, p. 370–376, 2011.

PRAMAN, S.; MULVANY, M. J.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; JANSAKUL, C. Hypotensive and cardio-chronotropic constituents of *Tinospora crispa* and mechanisms of action on the cardiovascular system in anesthetized rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 166-178, 2012.

PRIYADARSHINI, M. **Studies on periplasmic chaperone lola and outer membrane protein lolb in *Escherichia coli*. An analysis of lipoprotein interactions leading to identification of inhibitors: a molecular dynamics and in-silico study**. 2014. 152 f. Tese (Doutorado) – Anna University. Chennai, 2014.

RAMÍREZ, I.; CARABOT, A.; MELÉNDEZ, P.; CARMONA, J.; JIMENEZ, M.; PATEL, A.V.; CRABB, T.A.; BLUNDEN, G.; CARY, P. D.; CROFT, S. L.; COSTA, M. Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 645-647, 2003.

RHODES, D. G. A revision of the genus *Cissampelos*. Revisión del género *Cissampelos*. **Phytologia**, v. 30, n. 6, p. 415-484, 1975.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; ABD EL-SALAM, M.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RIGGIN, R. M.; MCCARTHY, M.J.; KISSINGER, P.T. Identification of salsolinol as a major dopamine metabolite in the banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 189-191, 1976.

RODRIGUES, E.; BARNES, J. Pharmacovigilance of herbal medicines. **Drug Safety**, v. 36, n. 1, p. 1-12, 2013.

ROLLINGER, J. M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Integrated in silico tools for exploiting the natural products' bioactivity. **Planta Medica**, v. 72, n. 08, p. 671-678, 2006.

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. L.; MILIC, N.; BORRELLI, F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 11, p. 1588-1596, 2013.

ROSARIO, S. L.; SILVA, A. J. R.; PARENTE, J. P. Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. **Planta Medica**, v. 62, n. 04, p. 376-377, 1996.

ROY, A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. **International Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2017.

SANTOS, C. A. M; REICHERT, C. L; SANTOS, T. G. Alcaloides isoquinolínicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SANTOS, E. L.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; TEIXEIRA, S. D. Flavonoids: Classification, biosynthesis and chemical ecology. In: JUSTINO, G. C. **Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health**. Rijeka, Croatia: InTech, 2017.

SANTOS, M. O.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACEDO, M. J.; MACEDO, J. G.; LACERDA, M. N. S.; MACÊDO, M. S.; SOUZA, M. M. A. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the Caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2767-2779, 2018.

SARASWATHI, V. S.; SARAVANAN, D.; SANTHAKUMAR, K. Isolation of quercetin from the methanolic extract of *Lagerstroemia speciosa* by HPLC technique, its cytotoxicity against MCF-7 cells and photocatalytic activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 171, p. 20-26, 2017.

SCHNEIDER, N.; HINDLE, S.; LANGE, G.; KLEIN, R.; ALBRECHT, J.; BRIEM, H.; BEYER, K.; CLAUBEN, H.; GASTREICH, M.; LEMMEN, C.; RAREY, M. Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 701-723, 2012.

SCOTTI, L.; BEZERRA MENDONCA, F. J.; RIBEIRO, F. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; SCOTTI, M. T. Natural product inhibitors of topoisomerases: review and docking study. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, n. 3, p. 275-291, 2018.

SCOTTI, L.; YARLA, N. S.; MENDONÇA FILHO, F. J. B.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; SCOTTI, M. T. CADD Studies applied to secondary metabolites in the anticancer drug research. In: **Anticancer Plants: Mechanisms and Molecular Interactions**. Singapore, 2018.

SEMWAL, D. K.; SEMWAL, R. B.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. From arrow poison to herbal medicine—the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological significance of *Cissampelos* (Menispermaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1011–1028, 2014.

SETZER, W. N.; BYLER, K. G. *In-silico* approaches to natural products drug discovery: A Review of the Recent Literature. In: DINIZ, M. F. F. M.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; ALVES, M. F. **Natural Products and Drug Discovery**. João Pessoa: Editora UFPB, 2018.

SHIM, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, B.; HONG, J. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry Letters**, v. 4, n. 4, p. 79-82, 2013.

SHIMA, K.; HISADA, S.; INAGAKI, I. Isolation of glucosyringic acid from *Anodendron affine*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 4, p. 894-895, 1971.

SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; GOUVEIA, D. R.; ERNST, M.; TEIXEIRA, S. P.; LOPES, N. P. Mass spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4309, 2014.

SILVA FILHO, F.A.; SOUZA, T.F.; RIBEIRO, A.G.; ALVES, J.E.F.; OLIVEIRA, J.F.; SOUZA, T.R.C.L.; MOURA, R.O.; LIMA, M.C.A.L.; CARVALHO JUNIOR L.B.; ALMEIDA, S.M.V. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, p. 582-589, 2019.

SILVA, V. A. **Estudo, por modelagem molecular, da inibição da enzima acetohidroxiácido sintase utilizando diferentes derivados pirimidinilsalicilatos**. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2017.

SINGH, A.; DUGGAL, S.; SINGH, J.; KATEKHAYE, S. An inside preview of ethnopharmacology of *Cissampelos pareira* Linn. **International Journal of Biological Technology**, v. 1, n. 1, p. 114-120, 2010.

SONI, A.; KHURANA, P.; SINGH, T.; JAYARAM, B. A DNA intercalation methodology for an efficient prediction of ligand binding pose and energetics. **Bioinformatics**, v. 33, n. 10, p. 1488-1496, 2017.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade do Brasil. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

STOCHMAL, A.; KOWALSKA, I.; JANDA, B.; PERRONE, A.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W. Gentisic acid conjugates of *Medicago truncatula* roots. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1272-1276, 2009.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1-2, p. 3-13, 2007.

TERAMOTO, R.; FUKUNISHI, H. Supervised consensus scoring for docking and virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 2, p. 526-534, 2007.

TERNAI, B.; MARKHAM, K. R. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—I: Flavones and flavonols. **Tetrahedron**, v. 32, n. 5, p. 565-569, 1976.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of molecular descriptors**. John Wiley & Sons, 2008.

TORRES, P. H.; SODERO, A. C.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer Cell Culture**. Humana Press, 2011. p. 237-245.

VEGA, M. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.

VELEVA, R. K.; MOSKOVA-DOUMANOVA, V.; TODOROVA, M.; TRENDAFILOVA, A.; DOUMANOV, J.; TOPOUZOVA-HRISTOVA, T. Cytotoxicity of flavonoid glycosides, flavonoids and phenolic acids from *Inula oculus-christi* on mammalian cell lines. **Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 219-224, 2016.

VICTOR, M. M.; DAVID, J. M.; SAKUKUMA, M. C.; FRANÇA, E. L.; NUNES, A. V.J. A simple and efficient process for the extraction of naringin from grapefruit peel waste. **Green Processing and Synthesis**, v. 7, n. 6, p. 524-529, 2018.

WALLER, G. R.; NOWACKI, E. K. The role of alkaloids in plants. In: **Alkaloid Biology and Metabolism in Plants**. Springer, Boston, 1978. p. 143-181.

WANG, J., FANG, X., GE, L., CAO, F., ZHAO, L., WANG, Z., & XIAO, W. (2018). Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **PLoS One**, v. 13, n. 5, 2018.

WANG, Y.; LIANG, Z.; LIAO, X.; ZHOU, C.; XIE, Z.; ZHU, S.; WEI, G. HUANG, Y. Identification of C-glycosyl flavones by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and quantification of five main C-glycosyl flavones in *Flickingeria fimbriata*. **BMC chemistry**, v. 13, n. 1, p. 94, 2019.

WET, H.; HEERDEN, F. R.; WYK, B. E. Alkaloidal variation in *Cissampelos capensis* (Menispermaceae). **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3001-3009, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 14 jan. 2020.

XIE, Z.; HUANG, J.; XIE, Z.; YU, X.; YANG, M.; YANG, D.; XU, X. Isolation and Purification of Isoquercitrin and Quercitrin from *sf Hypericum Japonicum* Thunb. ex Murray by Counter-Current Chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 778-782, 2014.

YANG, J.Y.; SANCHEZ, L.M.; RATH, C.M.; LIU, X.; BOUDREAU, P.D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W.R.; ROGER G. LININGTON, R.G; ZHANG, L.; DEBONSI, H.M.; GERWICK, W.H.; DORRESTEIN, P.C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of natural products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

YANG, Y.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; GUO, C.; XUE, M. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 3, p. 388-396, 2014.

YUAN, M.; SHI, D. Z.; WANG, T. Y.; ZHENG, S. Q.; LIU, L. J.; SUN, Z. X.; WANG R.; DING, Y. Transformation of trollioside and isoquercetin by human intestinal flora in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 3, p. 220-226, 2016.

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G.J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.