

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

YURI LIMA DE BARROS

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VISÍVEL E  
INFRAVERMELHO NA CARACTERIZAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE *Cissampelos*  
*sympodialis* Eichl. e *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil., ESPÉCIES DE  
IMPORTÂNCIA MEDICINAL**

João Pessoa – PB

2015

YURI LIMA DE BARROS

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VISÍVEL E  
INFRAVERMELHO NA CARACTERIZAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE *Cissampelos  
sympodialis* Eichl. e *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil., ESPÉCIES DE  
IMPORTÂNCIA MEDICINAL**

**Trabalho de Conclusão de Curso para ser apresentado junto ao curso de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.**

**Orientador (a):** Prof. Dr. Ronaldo José Lima  
Diniz Basílio

João Pessoa – PB

2015

B277aBarros, Yuri Lima de.

Aplicação da espectroscopia de absorção no UV- Visível e infravermelho na caracterização e discriminação de

*Cissampelos sympodialis* Eichl. e *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil., espécies de importância medicinal/ Yuri Lima de Barros.- - João Pessoa: [s.n.], 2015.  
28f. : il.

Orientador: Jonaldo José Lima Diniz Basílio.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Cissampelos sympodialis* 2. *Cissampelos glaberrima* 3. Espectrofotometria.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615(043.2)

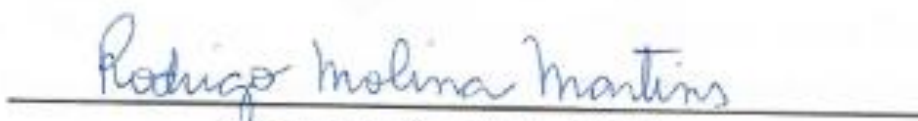
YURI LIMA DE BARROS

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VISÍVEL E  
INFRAVERMELHO NA CARACTERIZAÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE  
Cissampelos sympodialis Eichl. e Cissampelos glaberrima A. St. Hil.,  
ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA MEDICINAL**


Aprovado em 09/03/15



Prof. Dr Ronaldo José Lima Diniz Basílio  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
ORIENTADOR



Prof. Dr Rodrigo Molina Martins –  
Professor voluntário Universidade Federal da Paraíba – UFPB.  
EXAMINADOR



Drª. Niara Moura Porto – Doutora em Produtos  
Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB.  
EXAMINADORA

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Marcos Barros (em memória) e Mirian Inácio. Por todo incentivo, força, compreensão, ajuda e por terem me apoiado nos momentos difíceis. Sem vocês essa conquista não teria o mesmo valor.

Aos meus irmãos, Marcos Filho e Martina Barros, que me ajudaram e incentivaram a sempre seguir em frente e nunca desistir do meu objetivo.

A minha namorada, Talitta Dantas, que conviveu comigo os cinco anos de minha graduação e sempre me ajudou a enfrentar os problemas e as dificuldades do dia a dia, além de namorada uma grande amiga.

Aos meus amigos, que me ajudaram e me deram força, conselhos e estenderam as mãos quando mais precisei.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio, pela paciência e compreensão quando necessário. Obrigada por toda a orientação, conselhos e repreensões, com as quais aprendo todos os dias.

A meus companheiros de laboratório, Niara Moura Porto, J, Amanda Silva, Itamar Barbosa de Lima, Kiriaki Silva, Valéria Sampaio, Nathalia Diniz, Fernanda Leite, Rafael Costa, Anauara Lima, Rosyris Diniz, Jayane Miranda e Vanessa Bomfim pelo apoio e a minha ex-professora Dra. Maria De Fátima Agra pelo suporte técnico e científico além do companheirismo de todos os semestres.

A minha banca “Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio, Dr<sup>a</sup> Niara Moura Porto e Prof. Dr Rodrigo Molina Martins” por terem aceitado me avaliar e contribuir com meu trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, em especial ao funcionário da Coordenação de Farmácia, Sr. Petrônio.

Agradeço a Deus e a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar o sonho de ser farmacêutico.

## RESUMO:

Menispermaceae Juss. é uma família predominantemente tropical, compreende 71 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por 20 espécies distribuídas nas Américas, África e Ásia. No Brasil são referidas 10 espécies, das quais se destaca *Cissampelos sympodialis* Eichl., espécie exclusiva do território brasileiro. Devido sua semelhança morfológica com as demais espécies do grupo, compartilha nomes populares como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” e conseqüentemente, indicações terapêuticas. Assim, o objetivo deste trabalho visou estimular a aplicação de métodos alternativos na identificação de espécimes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil., enfocando a espectrofotometria na região do UV-Vis e Infravermelho com auxílio da análise multivariada dos espectros de amostras autênticas e seus possíveis adulterantes. Para isso, fizemos análise direta dos pós e extratos. Os extratos foram preparados com auxílio de banho de ultrassom com metanol grau HPLC, na proporção de 1:10 (p/v). Os espectros na região de UV-Vis foram obtidos em Espectrofotômetro ShimadzuUV-1650PC, células de quartzo de 1 cm e faixa de absorvância de 1100 a 190 nm e, os espectros no infravermelho, através da preparação de pastilhas de KBr (2 mg de amostra em 100 mg de KBr), utilizando Espectrofotômetro de FTIR IRPrestige-21. Os dados espectrais (absorvância) foram previamente normalizados (absorvância entre 0 e 1). Realizou-se a análise de componentes principais “principal component analysis” (PCA) e discriminante de Hotelling, considerando o nível de significância de 0,1%. A região espectral de 250-550nm (600 variáveis) foi selecionada para o estudo espectrofotométrico no UV-Vis. Após análise da região espectral que vai de 250 a 550 nm no UV-Vis e análise de componentes principais (PCA), foram observadas quatro bandas de absorção relevantes, no entanto, não apresentaram indícios que o perfil espectral na região de UV-Vis seja útil na discriminação de *C. sympodialis* e *C. glaberrima*. Na análise direta do pó não foi possível evidenciar distinção das duas espécies de *Cissampelos*, havendo sobreposição no espaço bidimensional. Na análise de extratos no infravermelho na região espectral selecionada (2000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) foi possível ser observada a dispersão das espécies nos componentes principais, com nítida distinção das duas espécies de *Cissampelos*, ficando evidenciada a diferença entre os dois grupos através de seu perfil espectral no infravermelho. Na análise interespecífica de extratos de espécimes foram observadas quatro bandas de absorção relevantes: bandas I ( $\lambda_{\text{máx}}$  503.5-504 nm), II ( $\lambda_{\text{máx}}$  467-391,5 nm), III ( $\lambda_{\text{máx}}$  317,5-361,5 nm) e IV ( $\lambda_{\text{máx}}$  269-291 nm). As bandas I e III não apresentaram dados importantes para distinção de *C. sympodialis* e *C. glaberrima*. *C. sympodialis* apresentou absorção com  $\lambda_{\text{máx}}$  (403,5-407nm) e (269–270 nm), diferindo de *C. glaberrima* que exibiu  $\lambda_{\text{máx}}$  (391.5 e 467nm) e (280–291nm), nas bandas II e IV, respectivamente. Na PCA, o primeiro e o segundo componentes principais (PCs) explicam, 61,47% e 29,53%, respectivamente, a variância-covariância existente dentro dos grupos. *Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima* estão distribuídas no PC1 positivo e negativo, com intersecção de amostra no PC1 positivo no intervalo de confiança de 95%. Na DA não temos indícios que o perfil espectral na região de UV-Vis seja útil na discriminação das duas espécies, visto que não apresentou diferença significativa (p igual a 0,022) entre os valores de CP1 e CP2. A região espectral de 2000–600 $\text{cm}^{-1}$  (519 variáveis) foi selecionada para o estudo espectrofotométrico na região do Infravermelho. Na PCA os três componentes principais (PCs) explicam a maior parte da variância-covariância existente dentro dos grupos, 65,26% (PC1), 13,12% (PC2) e 12,25% (PC3). Nítida distinção das duas espécies é observada no intervalo de confiança de 95%, com *C. sympodialis* distribuída no PC1 negativo e *C. glaberrima* no PC1 positivo, sem intersecção das amostras, já a análise do IV direta do pó apresentou sobreposição no espaço bidimensional e intervalo de confiança. Estes resultados corroboram com DA, visto que os dois grupos apresentaram diferença significativa (p igual a 2,44) entre os valores de PC1, PC2 e PC3, gerados a partir dos conjuntos de medidas no intervalo de 600 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  quando analisamos extratos do pó. Assim, podemos concluir que os métodos espectroscópicos, em especial na região do Infravermelho obtidos através dos extratos podem ser utilizados na identificação de amostras autênticas de *C. sympodialis* e *C. glaberrima*. Evidenciando a diferenças entre amostras de espécies distintas, através de seu perfil espectral, principalmente na região de impressão digital de forma rápida e com baixo custo, sem a necessidade de isolamento dispendioso de seus metabólitos secundários.

Palavras chave: *Cissampelos sympodialis*; *Cissampelos glaberrima*; espectrofotometria.

## ABSTRACT

Menispermaceae Juss. is a family of predominantly tropical plants, comprising 71 genus, of which *Cissampelos* L. is represented by 20 species distributed in the Americas, Africa and Asia. In Brazil are referred to 10 species, of which stands out *Cissampelos sympodialis* Eichl., exclusive specie of the Brazilian territory. Due to their morphological similarity with other species in the group, shared popular names like "Milona", "jarrinha", "orelha-de-onça" and "abuteira" and consequently, therapeutic indications. The objective of this study aimed to encourage the use of alternative methods for the identification of specimens of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil., focusing on spectrophotometry in the UV-Vis and IR region with the help of multivariate analysis of the spectra of authentic samples and their possible adulterants. For this, we direct analysis of powders and extracts. Extracts were prepared with the aid of ultrasound bath HPLC grade with methanol at a ratio of 1:10 (w / v). The spectra in the UV-Vis region were obtained from Shimadzu UV-1650PC spectrophotometer quartz cell of 1 cm and 1100 absorbance band at 190 nm and infrared spectroscopy by preparing KBr pellets (2 mg sample in 100 mg KBr) using FTIR Spectrophotometer IRPrestige-21. The spectra (absorbance) were previously normalized (absorbance between 0 and 1). Was held the principal component analysis "principal component analysis" (PCA) and discriminant of Hotelling, considering the 0.1% significance level. The spectral region of 250-550nm (600 variables) was selected for the spectrophotometric study on UV-Vis. After analysis of the spectral region that ranges from 250 at 550 nm in the UV-Vis spectroscopy and principal component analysis (PCA), four relevant absorption bands were observed, however, showed no evidence that the spectral profile in the UV-Vis region be useful in the discrimination of *C. sympodialis* and *C. glaberrima*. In direct analysis of the powder was not possible to show distinction of the two species of *cissampelos*, with overlap in the two-dimensional space. In infrared analysis extracts the selected spectral range (2000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) was observed dispersion can be of the species in the main components, with a clear distinction of the two kinds of *cissampelos*, being evident the difference between the two groups by their spectral profile in the infrared. In interspecific analysis specimens extracts were observed four relevant absorption bands: bands I ( $\lambda_{\text{máx}}$  503.5-504 nm), II ( $\lambda_{\text{máx}}$  467-391,5 nm), III ( $\lambda_{\text{máx}}$  317,5-361,5 nm) and IR ( $\lambda_{\text{máx}}$  269-291 nm). The bands I and III did not have important data for *C. distinction sympodialisee C. glaberrima*. *C. sympodialis* showed absorption  $\lambda_{\text{máx}}$  (403,5-407nm) and (269-270 nm), exhibited differing *C. glaberrima*  $\lambda_{\text{máx}}$  (391.5 and 467nm) and (280-291nm), in bands II and IV, respectively. In PCA, the first and second principal components (PCA) explain, 61.47% and 29.53%, respectively, the existing in variance-covariance within groups. *Cissampelos sympodialis* and *C. glaberrima* are distributed in positive and negative PC1, a sample of the positive PC1 intersection at the 95% confidence interval. In AD we have no indication that the spectral profile in the UV-Vis region is useful in discriminating the two species, whereas no significant difference ( $p$  equals 0.022) between the values of CP1 and CP2. The spectral region of 2000-600 $\text{cm}^{-1}$  (519 variables) was selected for the spectrophotometric study the infrared region. In PCA the three principal components (PCs) account for most of the variance-covariance existing within groups, 65.26% (PC1), 13.12% (PC2) and 12.25% (PC3). Clear separation of the two species is observed at the 95% confidence interval, with the negative distributed *C. sympodialis* and PC1 PC1 *C. glaberrima* the positive without intersection of the samples, since direct analysis of the powder showed IR overlap in two-dimensional space, and confidence interval. These results corroborate with AD, since the two groups showed significant difference ( $p = 2.44$ ) between the values of PC1, PC2 and PC3, generated from the sets of measures in the range 600-2000  $\text{cm}^{-1}$  when analyzed extracts powder. Thus, we conclude that the spectroscopic methods, especially in the infrared region obtained from the extracts can be used in the identification of authentic samples and *C. C. sympodialis glaberrima*. Evidencing the differences between samples of different species, through its spectral profile, particularly in the fingerprint region quickly and inexpensively without the need for expensive isolation of its secondary metabolites.

Keywords: *Cissampelos sympodialis*; *Cissampelos glaberrima*; spectrophotometry.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS.

### FIGURAS:

- Figura 1:** Espectros de UV-Vis (250-550 nm) de amostras de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima*.....7
- Figura 2** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região UV-Vis (250-550nm).....9
- Figura 3:** Análise discriminante de Hotelling, utilizando o PC1 e PC2, gerados a partir do perfil espectral na região UV-Vis (250-550nm), com valor-p igual a 0,02244.....10
- Figura 4:** Espectros de Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ) de amostras de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima*.....11
- Figura 5:** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região do Infravermelho do pó (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ).....11
- Figura 6:** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região do Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ).....12
- Figura 7:** Gráficos de dispersão PC1 x PC3 do perfil espectral na região do Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ).....13
- Figura 8:** Gráfico de pesos das variáveis originais no PC1.....14
- Figura 9:** Análise discriminante de Hotelling, utilizando o PC1 e PC2, gerados a partir do perfil espectral na região do Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ), com valor-p igual a 2,44.....15
- Quadro 1.** Valores do lambda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).....8



## LISTA DE ABREVIATURAS

**HPLC** – Cromatografia Líquida de alta eficiência

**UV-Vis** – Ultravioleta-visível

**KBr** – Brometo de potássio

**IV** – Infravermelho

**CBIOTEC** – Centro de Biotecnologia

**DA** – Discriminante de Hotelling.

**PCA** –Principal componente Analysis

**PCs** –Componentes principais

**DCF** – Departamento de Ciências Farmacêuticas

**UFPB** – Universidade Federal da Paraíba

**OBS:** As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontra-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
	2.1. Objetivo Geral .....	4
	2.2. Objetivos Específicos .....	4
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>5</b>
	3.1 Coletas e Identificação Botânica.....	5
	3.2 Análise espectroscópica .....	5
	3.3 Análise multivariada.....	6
<b>4.</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>7</b>
	4.1 Ultravioleta-visível.....	7
	4.2 Infravermelho.....	10
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>17</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Menispermaceae Juss. é uma família predominantemente tropical, conhecida quimicamente pela produção de alcaloides, notadamente os bisbenzilisquinolínicos (Barbosa-Filho et al., 2000). Compreende 71 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por 20 espécies distribuídas nas Américas, África e Ásia. No Brasil são encontradas dez espécies, das quais cinco ocorrem no Nordeste (Rhodes, 1975) e uma espécie, *Cissampelos sympodialis* Eichl. é exclusiva do território brasileiro.

As semelhanças morfológicas entre as espécies de *Cissampelos* dificulta a identificação quando em estado estéril (Porto et al., 2011), assim, nomes populares como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” são compartilhados e, conseqüentemente, indicações terapêuticas (Agra et al., 2007).

A problemática da distinção entre as espécies do gênero *Cissampelos* tem causado equívocos, não só do ponto de vista nomenclatural e taxonômico, como também na caracterização e reconhecimento das espécies e suas partes empregadas como medicinais.

No Brasil ocorrem cerca de 50% das espécies registradas mundialmente para o gênero, predominantemente constituído por trepadeiras herbáceas, ocorrentes em diferentes ecossistemas: Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica. Contudo, sabe-se pouco sobre a distribuição delas no país e ainda menos sobre a caracterização dessas espécies.

A análise anatômica mostra-se bastante útil na compreensão dos limites específicos de *Cissampelos* (Porto et al., 2008, 2010). Desta forma, a ampliação de caracteres em diferentes áreas do conhecimento para as espécies registradas no Brasil será de grande valia para reconhecimento de possíveis adaptações ecológicas e potencialidades econômicas.

Quimicamente o gênero caracteriza-se pela presença de alcaloides do tipo bisbenziltetrahydroisoquinolínicos e aporfínicos (Barbosa-Filho et al., 2000). Vários

alcaloides isoquinolínicos foram isolados, dentre os quais se destacam: milonina (Freitas et al., 1996), warifteína (Cortes et al., 1995), metilwarifteína, laurifolina (Barbosa-Filho et al., 1997), liriodenina e roraimina (Lira et al., 2002) e aporfínicos: cissaglaberrimina, oxobuxifolina, magnoflorina e trilobinina (Barbosa-Filho et al., 1997).

Os alcaloides de *Cissampelos* são responsáveis por diversas propriedades medicinais. Os extratos de *C. pareira* possuem ação anti-inflamatória (Amreshet al., 2004), efeito imunomodulador (Bafna&Mishra, 2005) e atividade contraceptiva (Ganguly et al., 2007). O extrato etanólico de folhas de *C. glaberrima* apresenta atividade broncodilatadora (Cornélio et al., 1999). *C. ovalifolia* possui ação antimalárica (Milliken, 1997) e *C. sympodialis* apresenta ação espasmolítica (Freitas et al., 1996), antianafilática (Thomas et al., 1997), antidepressiva (Almeida et al., 1998), anti-inflamatória (Lima et al., 2001; Alexandre-Moreira et al., 2003), efeito imunomodulador (Bezerra-Santos et al., 2004) e antialérgica (Bezerra-Santos et al., 2006, Cerqueira-Lima et al., 2010).

Recentemente, técnicas espectroscópicas foram introduzidas com uma abordagem de impressão digital, útil na avaliação de extratos vegetais (Luthria et al., 2008). A espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis) e no infravermelho (IV) são exemplos de técnicas retratadas como alternativas e complementares a confirmação da autenticidade de espécies vegetais (Li et al., 2004; Lonni et al., 2005; Yap et al., 2007. Basílio et al., 2012).

Devido à complexidade inerente dos espectros de UV-Vis e especialmente de Infravermelho, a interpretação real pode ser difícil. Na verdade, pequenas diferenças nos espectros dentro da mesma espécie de planta podem não ser óbvias. Entretanto, os espectrais aliados à análise multivariada pode constituir uma importante fonte de informações para o desenvolvimento de modelos de discriminação de amostras autênticas e seus possíveis adulterantes. Assim, o objetivo deste trabalho visa estimular à aplicação de técnicas alternativas na identificação de espécimes de *Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima*, dando suporte a cadeia produtiva, como também a própria conservação e preservação da biodiversidade local.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Aplicação de métodos alternativos na identificação de espécimes de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima*, enfocando a espectrofotometria na região do UV-Vis e Infravermelho com auxílio da análise multivariada dos espectros de amostras autênticas e seus possíveis adulterantes, fornecendo subsídios à discriminação dessas espécimes e propondo limites precisos para o farmacógeno e seus possíveis adulterantes.

### **2.2. Específicos**

- Realizar coletas para obtenção de amostras do farmacógeno e seus adulterantes;
- Preparar dos extratos de folhas;
- Realizar análises espectroscópicas de material pulverizado e seus extratos;
- Tratar os dados espectroscópicos com auxílio da análise multivariada;
- Selecionar dados espectroscópicos que auxiliem na identificação do farmacógeno.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Coletas e Identificação Botânica**

O material botânico foi obtido através de coleta de campo nas localidades já referidas para espécies de *Cissampelos*. Amostras de referência foram herborizadas, seguindo-se a metodologia descrita por Forman e Bridson (1989), e posteriormente, depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), com duplicatas na coleção de referência do Centro de Biotecnologia (CBIOTEC), ambos da Universidade Federal da Paraíba. Parte do material fresco será utilizado para a identificação botânica e análise espectroscópicas.

#### **3.2 Análise espectroscópica**

Para o UV-Vis foram usados (1 g) da amostra previamente seca em estufa a 40 °C durante 24 horas, posteriormente pulverizadas. Os extratos foram preparados com auxílio de banho de ultrassom com metanol grau HPLC, na proporção de 1:10 (p/v), filtrados e, posteriormente, secos em rotaevaporador. Em seguida, resolubilizados em metanol para a análise espectrofotométrica no UV-Vis.

Os espectros na região de UV-Vis foram obtidos em Espectrofotômetro ShimadzuUV-1650PC, células de quartzo de 1 cm e faixa de absorvância de 1100 a 190 nm.

Para o Infravermelho foram usados (1 g) de amostra previamente seca em estufa a 40 °C durante 24 horas e foram pulverizadas. Parte do material pulverizado foi utilizado para análise direta. Os extratos foram preparados com auxílio de banho de ultrassom com metanol grau HPLC, na proporção de 1:10 (p/v), filtrados e, posteriormente, secos em rotaevaporador. Os espectros no infravermelho foram obtidas através de pastilhas de KBr (2 mg de amostra em 100 mg de KBr), utilizando Espectrofotômetro de FTIRIR Prestige-21.

Os espectros foram investigados em triplicata, considerando-se a média dos registrados e os dados exportados no formato ASCII para o pré-tratamento no programa Microsoft Excel 2007.

### **3.3 Análise multivariada**

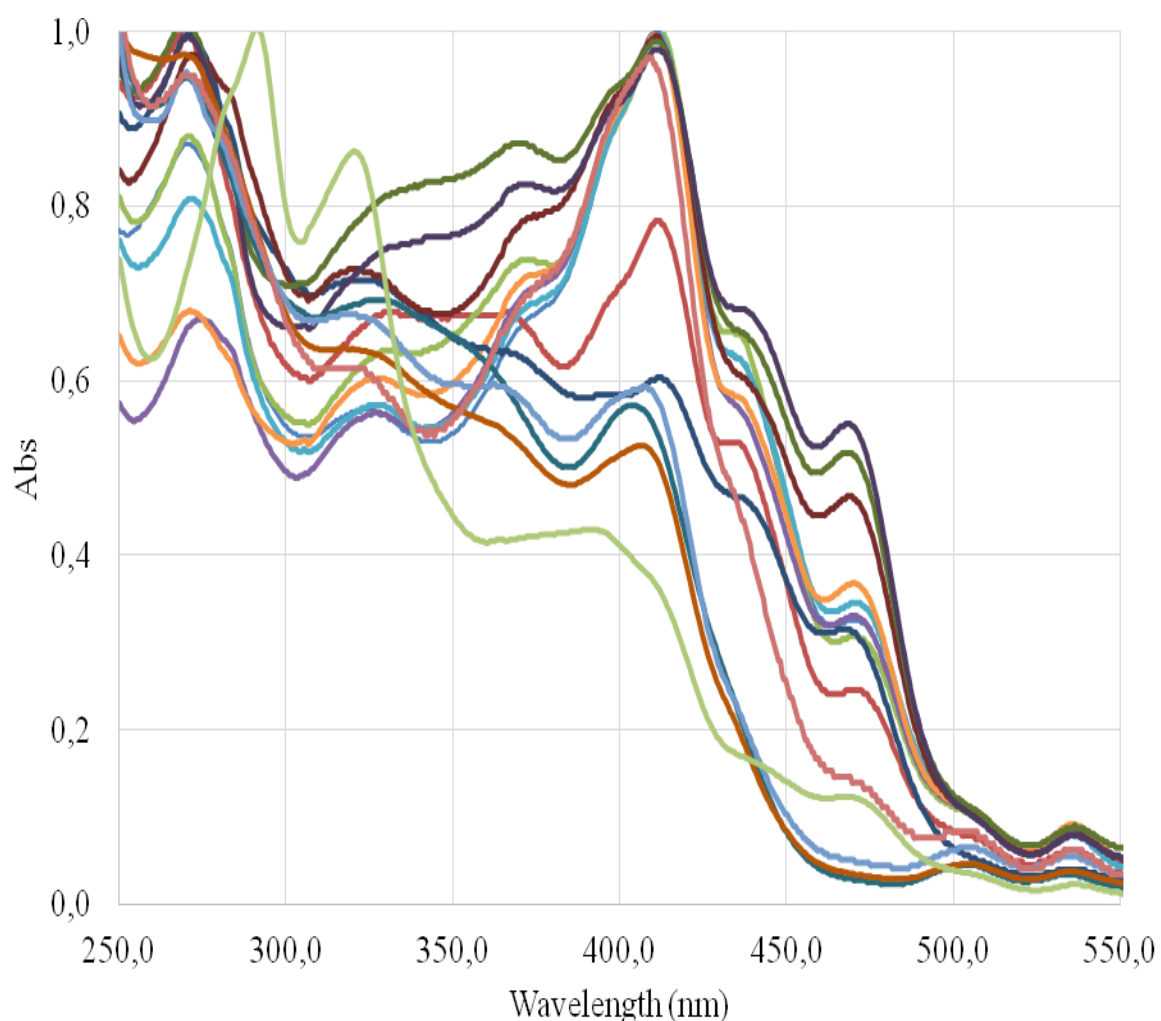
Os dados espectrais foram previamente normalizados (absorbância entre 0 e 1). Realizou-se a análise de componentes principais “principal component analysis” (PCA) dos valores obtidos, para a redução das variáveis, com a obtenção de novas variáveis (componentes principais), posteriormente foi explorada a distribuição dos espécimes no espaço bidimensional, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o método de variância-covariância entre os grupos.

Os componentes principais que mais contribuírem para a distinção das amostras foram utilizados na análise discriminante de Hotelling (DA), considerando o nível de significância de 0,1%. As matrizes foram processadas no software PAST 3.01.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ultravioleta-visível

A região espectral de 250-550nm (600 variáveis) foi selecionada para o estudo espectrofotométrico UV-Vis (Fig. 1), pois a faixa de 240–190 nm apresentou-se saturada, provavelmente devido à presença de enonas conjugadas. Além disso, foram excluídos os valores de comprimento de onda acima de 550 nm, por se tratar de uma região típica de interferentes, como clorofilas e carotenoides (SHIPMAN et al., 1976).



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 1.** Espectros de UV-Vis (250-550 nm) de amostras de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima*.



Na análise interespecífica de espécimes de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima* foram observadas quatro bandas de absorção relevantes (Quadro1.): bandas I ( $\lambda_{\text{máx}}$ 503.5-504 nm), II ( $\lambda_{\text{máx}}$ 467-391,5 nm), III ( $\lambda_{\text{máx}}$ 317,5-361,5 nm) e IV ( $\lambda_{\text{máx}}$ 269-291 nm).

As bandas I e III não apresentaram dados importantes para distinção de *C. sympodialis* e *C. glaberrima*, o que pode estar relacionado à sobreposição de absorção nestas regiões, especialmente na banda I. Em contrapartida, *C. sympodialis* apresentou absorção com  $\lambda_{\text{máx}}$  (403,5-407nm) e (269–270 nm), diferindo de *C. Glaberrima* que exibiu  $\lambda_{\text{máx}}$ (391.5 e 467nm) e (280–291nm), nas bandas II e IV, respectivamente. De acordo com Nagarajan et al. (2011), a região da banda IV é característica do cromóforo C=N. Com base nos dados químicos, tal absorbância pode ser relacionada com alcaloides tropoisquinolínicos, característicos do gênero (MENACHERY, 1996).

**Quadro 1.** Valores do lambda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).

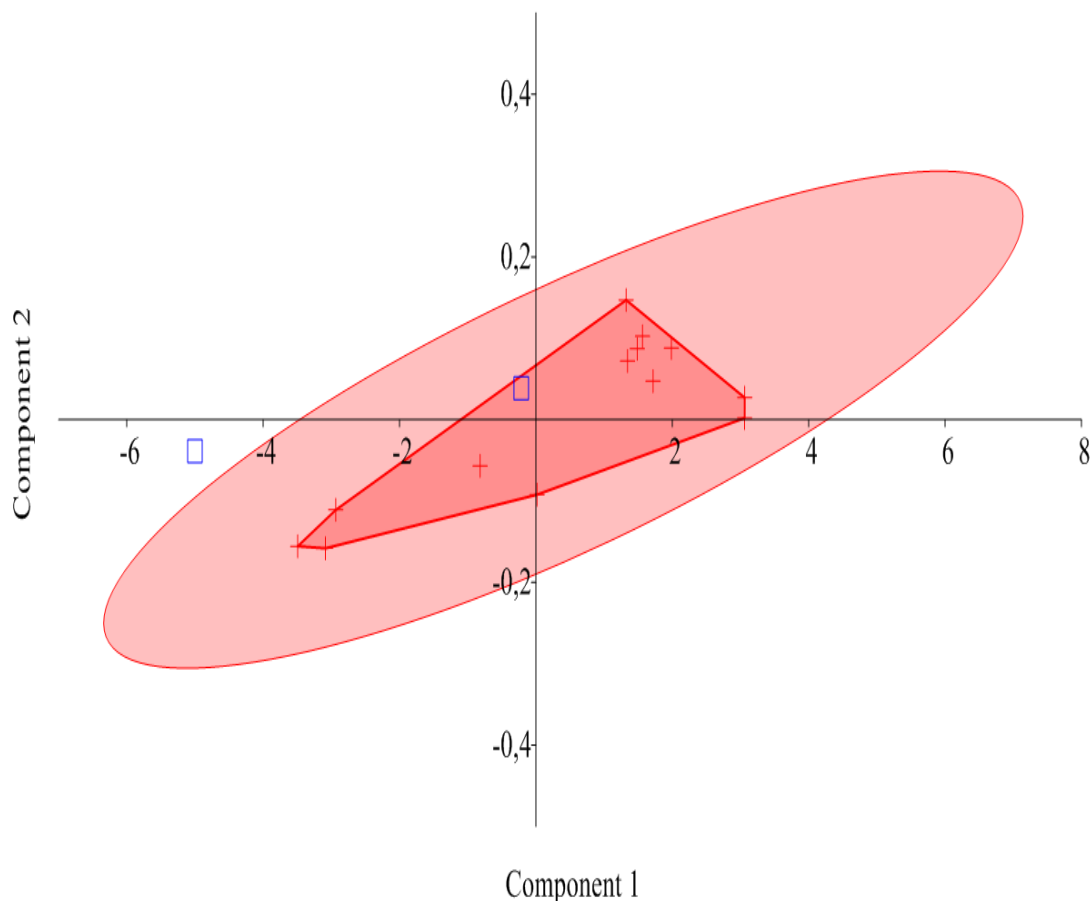
espécies	$\lambda_{\text{máx}}$ * (nm)			
	banda IV	banda III	banda II	banda I
<i>C. sympodialis</i>	269-270	317,5-361,5	403,5-407	503.5-504
<i>C. glaberrima</i>	280-291	391,5-467	403,5-407	

**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para reduzir os dados de UV-Vis e obter o máximo de variação entre as amostras num espaço bidimensional, a partir do perfil espectral. O primeiro e o segundo componentes principais (PCs) explicam, 61,47% e 29,53%, respectivamente, a variância-covariância existente dentro dos grupos.

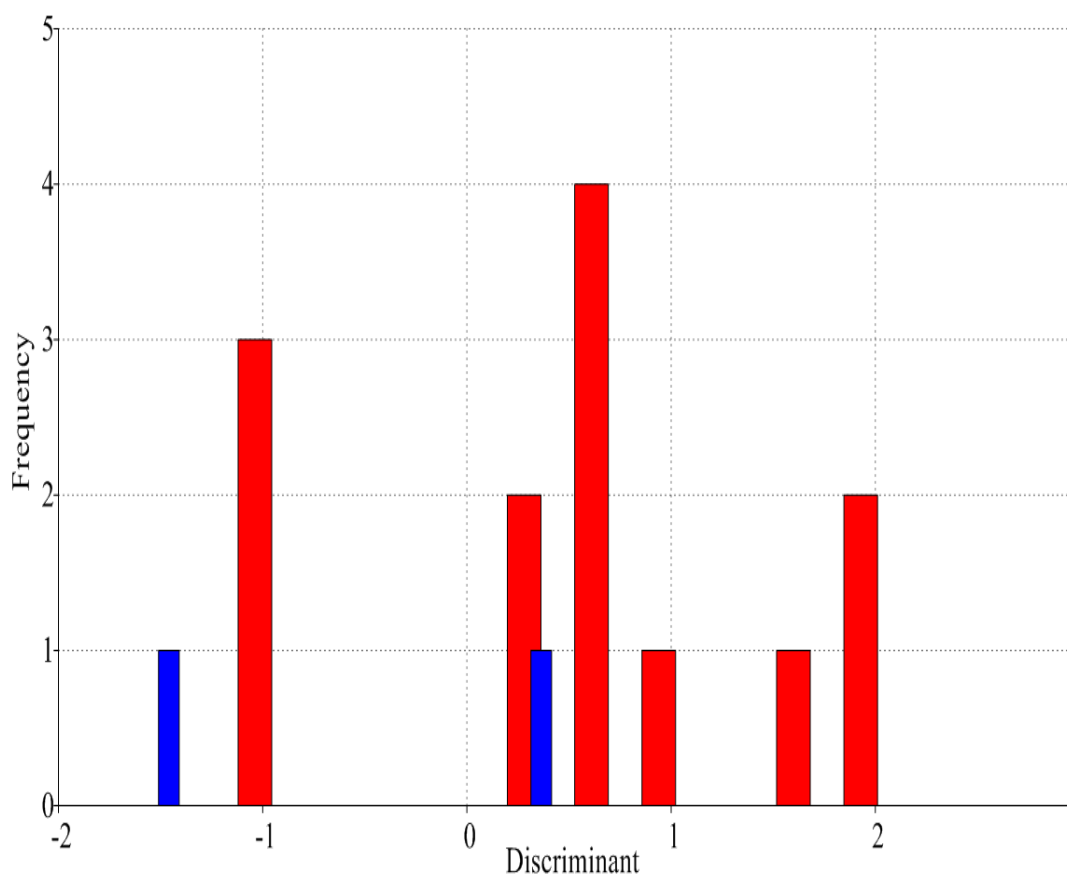
Na figura 2. é mostrado o gráfico de dispersão das espécies nos componentes principais PC1ePC2. Conforme se pode perceber, não há diferença entre os dois grupos.

*Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima* estão distribuídas no PC1 positivo e negativo, com intersecção de amostra no PC1 positivo no intervalo de confiança de 95%. Isto pode ser confirmado também na Fig. 3, onde é apresentado o histograma das variáveis no eixo que maximiza a distância entre os grupos. Podemos ver que as duas espécies não são discriminadas. Assim, podemos dizer que, com nível de significância de 0,1 não temos indícios que o perfil espectral na região de UV-Vis seja útil na discriminação de *Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima*, visto que não apresentou diferença significativa ( $p$  igual a 0,022) entre os valores de CP1 e CP2, gerados a partir dos conjuntos de medidas no intervalo de 250 a 550 nanômetros.



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 2.** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região UV-Vis (250-550nm). Legenda: *C. sympodialis* (+); *C. glaberrima* (□).

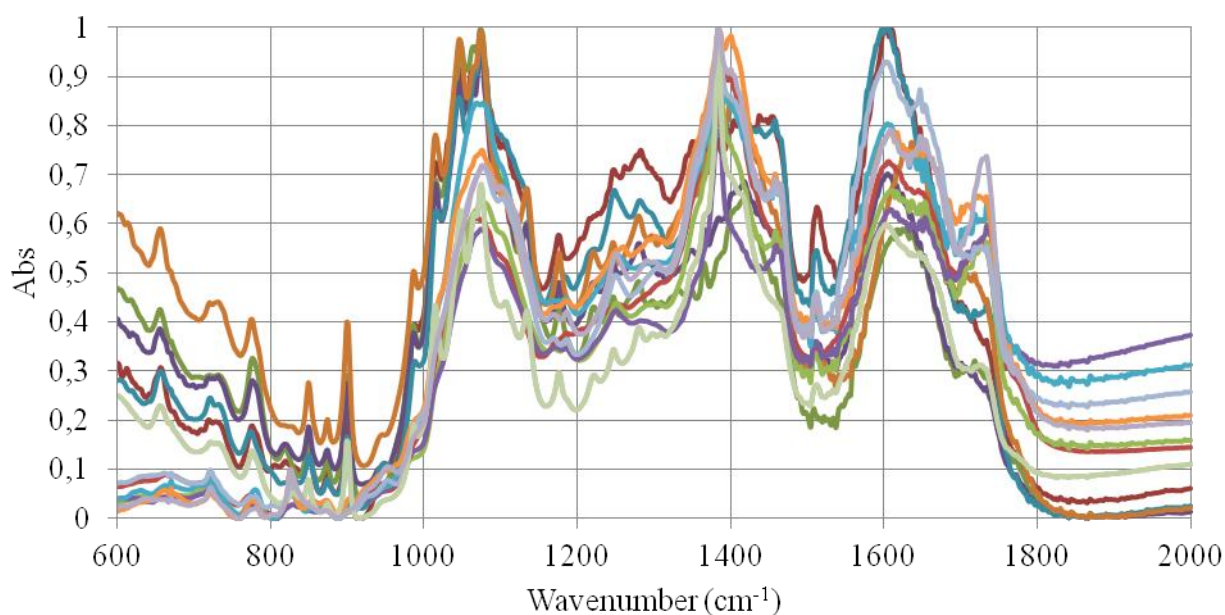


**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 3.** Análise discriminante de Hotelling, utilizando o PC1 e PC2, gerados a partir do perfil espectral na região UV-Vis (250-550nm), com valor-p igual a 0,02244. Legenda: *C. sympodialis* (vermelho); *C. glaberrima* (azul).

## 4.2 Infravermelho

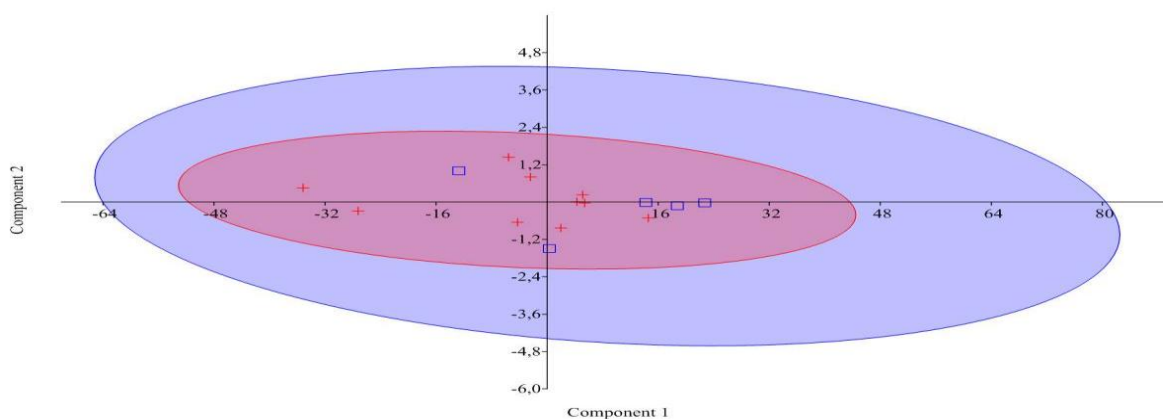
A região espectral de  $2000\text{--}600\text{cm}^{-1}$  (519 variáveis) foi selecionada para o estudo espectrofotométrico na região do Infravermelho (Fig. 4), pois a faixa acima de  $2000\text{cm}^{-1}$  não apresentou deformação e/ou estiramento evidente, exceto na região típica grupos OH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, presentes em todas as amostras, mas eliminadas por se tratar de deformações consideradas interferentes para análise comparativa das amostras.



Fonte: Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 4.** Espectros de Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ) de amostras de *Cissampelos sympodialis* e *Cissampelos glaberrima*.

Conforme se pode perceber (Fig. 5), não há diferença entre os dois grupos. *Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima* estão distribuídas no PC1 positivo e negativo, com intersecção de amostra no PC1 positivo no intervalo de confiança de 95%.

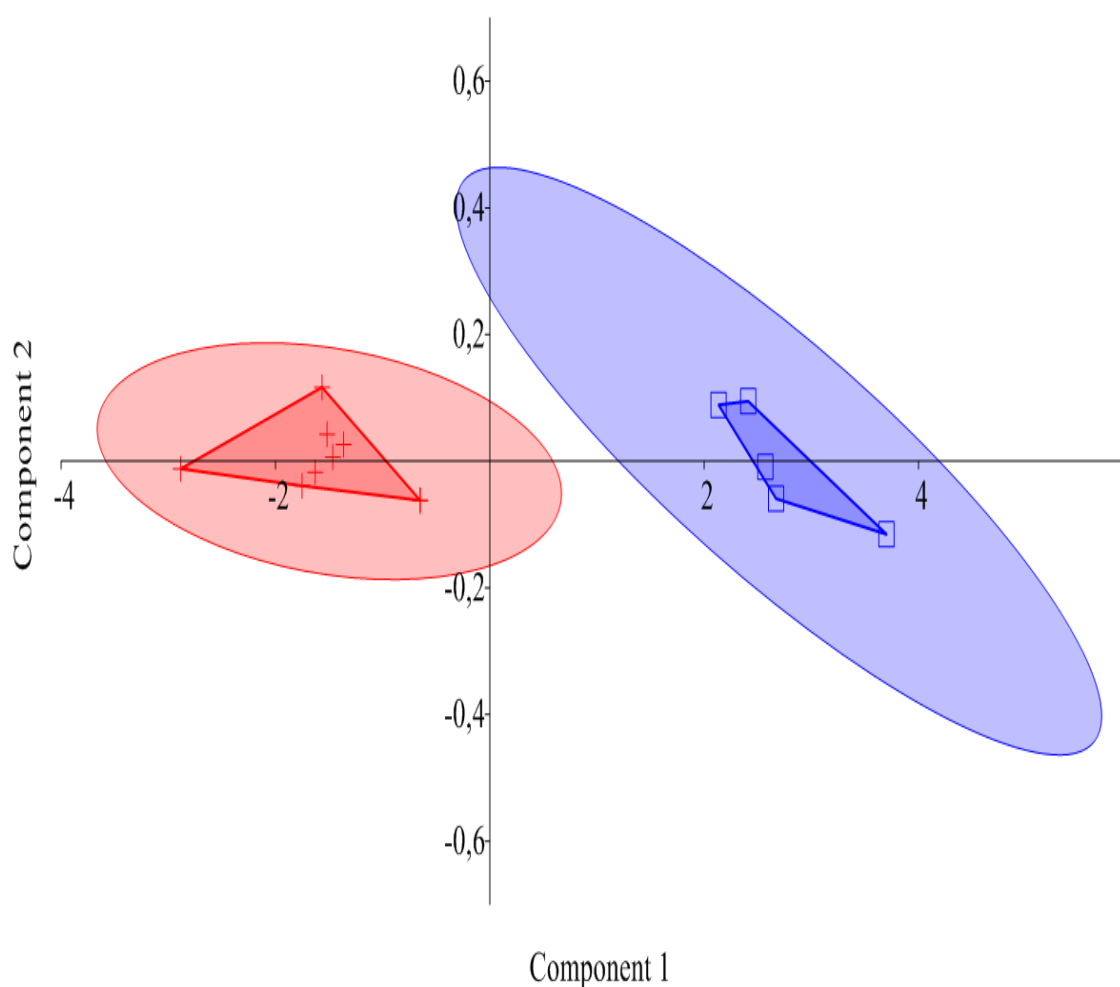


Fo

nte: Pesquisa direta, 2014/2015.

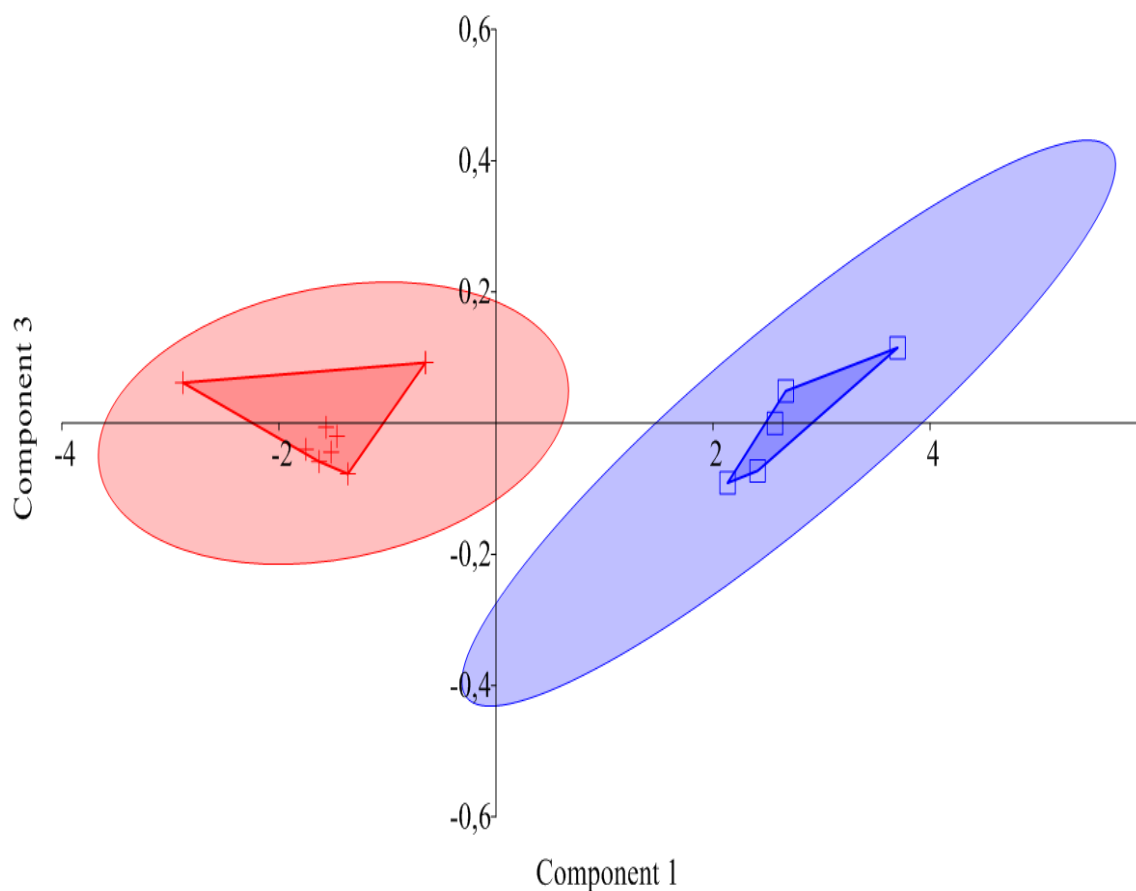
**Figura 5.** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região do Infravermelho do pó (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ). Legenda: *C. sympodialis* (+); *C. glaberrima* (□).

Na PCA os três componentes principais (PCs) explicam a maior parte da variância-covariância existente dentro dos grupos, 65,26% (PC1), 13,12% (PC2) e 12,25% (PC3). Nas figuras (6-7) são mostrados os gráficos de dispersão das espécies nos componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Conforme se pode perceber, há uma nítida distinção dos dois grupos no intervalo de confiança de 95%. *Cissampelos sympodialis* está distribuída no PC1 negativo e *C. glaberrima* no PC1 positivo, sem intersecção das amostras.



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

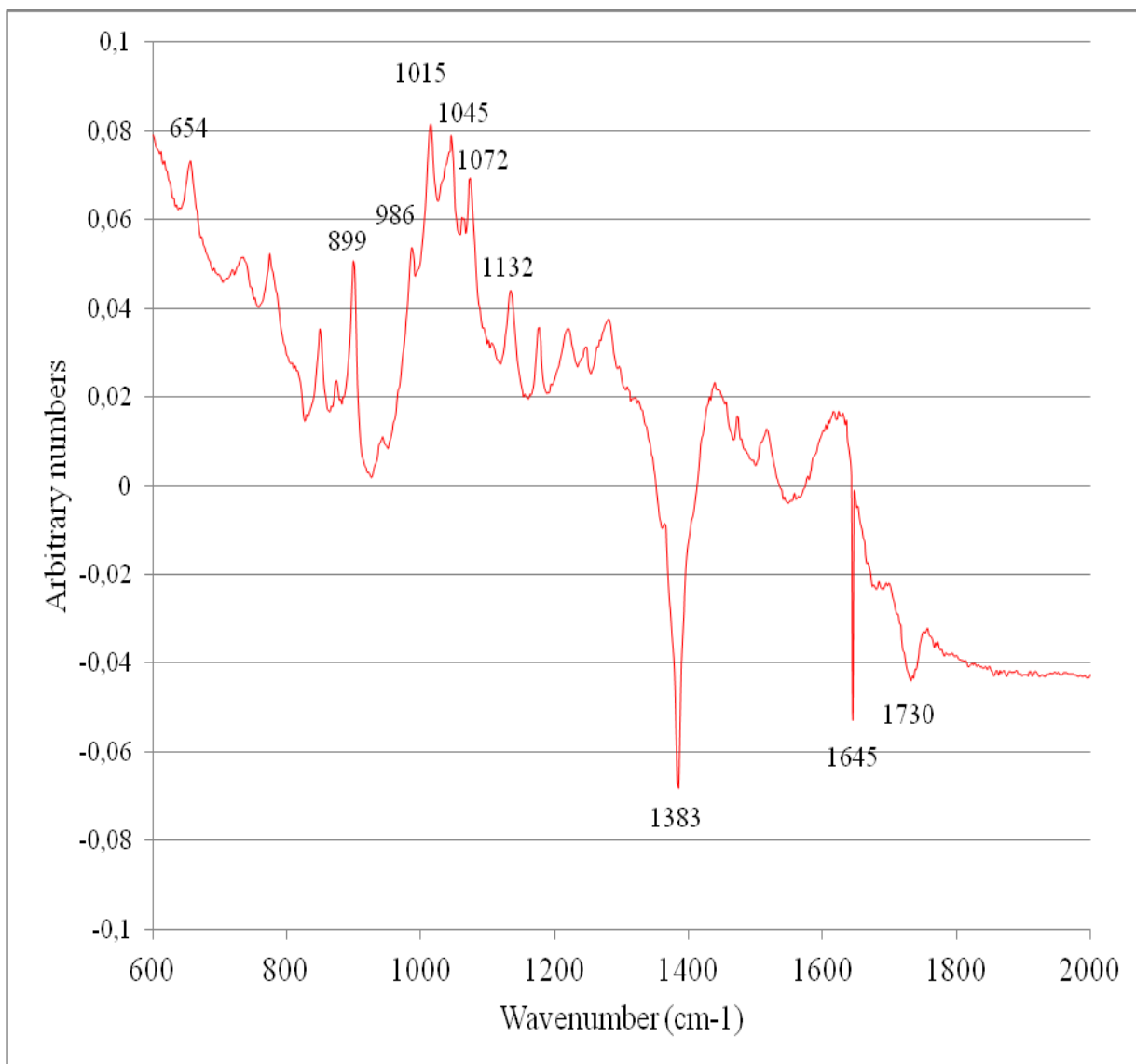
**Figura 6.** Gráficos de dispersão PC1 x PC2 do perfil espectral na região do Infravermelho (600-2000  $\text{cm}^{-1}$ ). Legenda: *C. sympodialis* (+); *C. glaberrima* (□).



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 7.** Gráficos de dispersão PC1 x PC3 do perfil espectral na região do Infravermelho ( $600-2000\text{ cm}^{-1}$ ). Legenda: *C. sympodialis* (+); *C. glaberrima* (□).

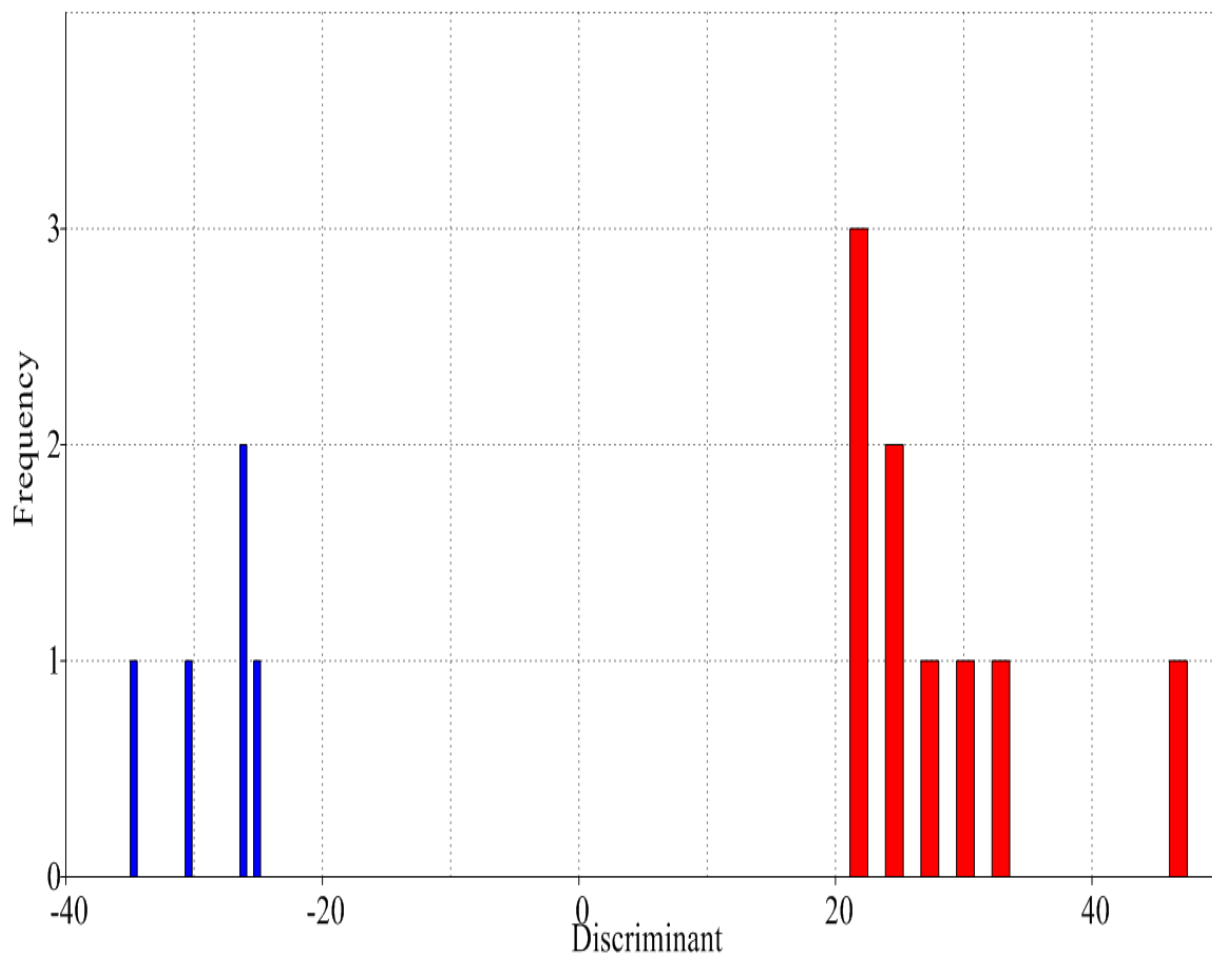
Os pesos das variáveis originais que permitem evidenciar as regiões espectrais mais importantes na discriminação de *C. sympodialis* e *C. glaberrima* no PC1 são exibidos na fig. 8. Vários comprimentos de onda apresentam valores de peso próximos à zero, sendo a região espectral de maior importância para a discriminação dos grupos localizada entre  $899$  e  $1132\text{ cm}^{-1}$  no eixo positivo do PC1, responsáveis pelo agrupamento de espécimes de *C. glaberrima*. Além das variáveis mais influentes no eixo negativo, com picos evidentes em  $1383\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$ ),  $1645\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{C}=\text{C}$ ) e  $1730\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{C}=\text{O}$ ), agrupando os espécimes de *C. sympodialis*, no PC1 negativo.



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 8.** Gráfico de pesos das variáveis originais no PC1.

Os resultados apresentados com relação à PCA corroboram com análise discriminante demonstrada na Fig.9. onde é apresentado o histograma das variáveis no eixo que maximiza a distância entre os grupos. Podemos ver que as duas espécies são claramente discriminados. Visto que os dois grupos apresentaram diferença significativa ( $p$  igual a 2,44) entre os valores de PC1, PC2 e PC3, gerados a partir dos conjuntos de medidas no intervalo de 600 a 2000 $\text{cm}^{-1}$ .



**Fonte:** Pesquisa direta, 2013/2014.

**Figura 9.** Análise discriminante de Hotelling, utilizando o PC1 e PC2, gerados a partir do perfil espectral na região do Infravermelho ( $600\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ), com valor-p igual a 2, 44. Legenda: *C. sympodialis* (vermelho); *C. glaberrima* (azul).

A utilização de métodos espectroscópicos é restrita a elucidação estrutural de compostos a partir de matrizes complexas, à base de plantas. Além disso, em estudos fitoquímicos como dispositivo de triagem na purificação de metabólitos secundários para comparação com amostras autênticas (Harbone, 1998). Contudo, quaisquer variações no perfil espectral podem ser detectadas, especialmente na região de impressão digital, seja em decorrentes de erros de amostragem, contaminação da amostra ou mesmo a presença de adulterantes. Nesta região, as diferenças entre os espectros não são visível a olho nu, no entanto, a utilização da análise multivariada pôde auxiliar na interpretação dos resultados no presente trabalho.



## 5. CONCLUSÕES

Existem fortes indícios que o perfil espectral na região do Infravermelho, em especial na região de “impressão digital”, seja útil na distinção de *Cissampelos sympodialis* e *C. glaberrima*. Assim, podemos concluir que métodos espectroscópicos aliados a análise multivariada são técnicas alternativas importantes que podem ser utilizadas na identificação de amostras autênticas de *C. sympodialis* e seus possíveis adulterantes. Evidenciando a diferença de amostras de espécies distintas, através de seu perfil espectral, de forma rápida e com baixo custo, sem a necessidade de isolamento dispendioso de seus metabólitos secundários.

## 6. REFERÊNCIAS

Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **17**: 116-155, 2007.

Alexandre-Moreira, M. S.; Piuvezam, M. R.; Peçanha, L. M. T. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **36**: 199-205, 2003.

Almeida, R. N.; Navarro, D. S.; Assis, T. S.; Medeiros, I. A.; Thomas, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.** **63**: 247–252, 1998.

Amresh, G.; Reddy, G. D.; Rao, C. H. V.; Shirwaikar, A. Ethnomedical value of *Cissampelos pareira* extract in experimentally induced diarrhoea. **Acta Pharmaceutica** **54**: 27-35, 2004.

Bafna, A. R.; Mishra, S. H., Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las raíces de *Cissampelos pareira* Linn. **Ars Pharmaceutica** **46**: 253–262, 2005.

Barbosa-Filho, J. M.; Agra, M. F.; Thomas, G. 1997. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciênc. Cul.** **49**: 386-394, 1997.

Barbosa-Filho, J. M.; Leitão Da-Cunha, E. V.; Gray, A.I. Alkaloids of the Menispermaceae. Pp 54: 1-190. In: Cordell G.A. (ed.). The alkaloids. Illinois, Acad Press. 2000.

Basílio, I. J. L. D.; Bhattacharyya, J.; Moura, R. K. P.; Agra, M. F. Application of UV/VIS Spectrophotometry and Multivariate Analysis to Characterization of the Species of *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child. **Chemistry and Biodiversity** **9**: 1114-1124, 2012.

Bezerra-Santos, C. R.; Balestieri, F. M. P.; Rossi-Bergmann, B.; Peçanha, L. M. T.; Piuevezam, M. R. *Cissampelossympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **J. Ethnopharmacol.** **95**: 191-197, 2004.

Bezerra-Santos, C. R.; Vieira-De-Abreu, A.; Barbosa-Filho, J. M.; Bandeira-Melo, C.; Piuevezam, M. R.; Bozza, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelossympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int. Immunopharmacol.** **6**: 1152-1160, 2006.

Cerqueira-Lima, A. T., Alcântara-Neves, N. M., Costa, R. A., Barbosa-Filho, J. M., Piuevezam, M. R., Montchilo, R., Barboza, R., Oliveira, E. J., Marinho, A. F., Figueiredo, C. A. Effect of *Cissampelossympodialis* Eichl. and its Alkaloid, Warifteine, in an Experimental Model of Respiratory Allergy to Blomia tropicalis. **Current Drug Targets** **11**: 1458-1467, 2010.

Cornélio, M. L.; Barbosa-Filho, J. M.; Côrtes, S. F.; Thomas, G. Tracheal relaxant activity of cissaglaberrimine and trilobinine, two aporphinic alkaloids from *Cissampelos glaberrima*. **Planta Medica** **65**: 462-464, 1999.

Cortes, S. F.; Alencar, J. L.; Thomas, G.; Barbosa-Filho, J. M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelossympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research** **9**: 579-583, 1995.

Forman, L.; Bridson, D. **The herbarium Handbook**. Great Britain: Royal Botanic Gardens, Kew. 1989.

Freitas, M. R.; Cortes, S. F.; Thomas, G.; Barbosa-Filho, J. M. Modification of Ca<sup>2+</sup> metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelossympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **J. Pharm. Pharmacol.** **48**: 333-336, 1996.

Ganguly, M.; Kr. Borthakur, M.; Devi, N.; Mahanta, R. Antifertility activity of the methanolic leaf extract of *Cissampelos pareira* in female albino mice. **J. Ethnopharmacol.** **111**: 688-691, 2007.

Johansen, D.A. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, p. 523, 1940.

Li, Y. M.; Sun, S. Q.; Zhou, Q.; Qin, Z.; Tao, J. X.; Wang, J.; Fang, X. Identification of American ginseng from different regions using FT-IR and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 36 (2004) 227–232, 2004.

Lima, K. V. B.; Ribeiro, R.; Balestieri, F. M. P.; Thomas, G.; Piuvezam, M. R. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) leaf extract. ***Acta Farmaceutica Bonaerense* 20**: 275-279, 2001.

Lonni, A. A.; Scarminio, S.; Silva, L. M.; Ferreira, D. T. Numerical taxonomy characterization of *Baccharis* genus species by ultraviolet-visible spectrophotometry. ***Analytical science* 21** (3): 235-239, 2005.

Luthria, D. L.; Mukhopadhyay, S.; Robbins, R. J.; Finley, J. W.; Banuelos, G. S.; Harnly, J. M. UV Spectral Fingerprinting and Analysis of Variance – Principal Component Analysis: a Useful Tool for Characterizing Sources of Variance in Plant Materials. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56** (14): 5457-5462, 2008.

Milliken, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. ***Economic Botany* 51**: 212-237, 1997.

Porto, N. M.; Basílio, I. J. L. D.; Agra, M. F. Estudo Farmacobotânico de Folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). ***Revista Brasileira de Farmacognosia* 18**: 102-107, 2008.

Porto, N. M.; De Figueiredo, R. C. B. Q.; Oliveira, A. F. M.; Agra, M. F. Leaf epidermal characteristics of *Cissampelos* L. (Menispermaceae) species from Northeastern Brazil. ***Microscopy Research and Technique* 74**(4): 370-376, 2011.

Porto, N. M.; Figueiredo, R. C. B. Q.; Oliveira, A. F. M., Agra, M. F. 2010. Leaf epidermal characteristics of *Cissampelos* L. (Menispermaceae) species from Northeastern Brazil. **Microsc. Res. Techniq.** **74** (4): 370–376, 2011.

Rhodes, D.G. 1975. A revision of the genus *Cissampelos*. **Phytologia** **30**: 415-485.

Shepherd, G. J. **FITOPAC v. 2.1.2**. 2011.

Thomas, G.; Araújo, C. C.; Duarte, J. C.; Souza, D. P. Bronchodilatory activity of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos* *sympodialis* (Menispermaceae) in guinea-pig. **Phytomedicine** **4**: 233-238, 1997.

Horborne J.B., Phytochemical methods, A guide to Modern techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, UK, Edition 3, 1998.