



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

**ANÁLISE METABOLÔMICA DAS FOLHAS DE *Cissampelos sympodialis*  
Eichler E A RELAÇÃO COM A ATIVIDADE RELAXANTE EM  
TRAQUEIA DE COBAIA**

**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

João Pessoa - PB  
2015

**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

**ANÁLISE METABOLÔMICA DAS FOLHAS DE *Cissampelos sympodialis*  
Eichler E A RELAÇÃO COM A ATIVIDADE RELAXANTE EM  
TRAQUEIA DE COBAIA**

Tese 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 a obtenção do título de Doutor  
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área  
de Concentração: Farmacoquímica.

**Orientadores: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira  
Prof. Dr. Jan Schripsema  
Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**

João Pessoa - PB  
2015

M528a    Melo, Ingrid Christie Alexandrino Ribeiro de.  
            Análise metabólica das folhas de *Cissampelos*  
            *sympondialis* Eichler e a relação com atividade relaxante em  
            traqueia de cobaia / Ingrid Christie Alexandrino Ribeiro de  
            Melo.- João Pessoa, 2015.  
            126f. : il.  
            Orientadores: Eduardo de Jesus Oliveira, Jan Schripsema,  
            Bagnólia Araújo da Silva  
            Tese (Doutorado) - UFPB/CCS  
            1. Produtos naturais. 2. *Cissampelos sympondialis*.  
            3. Metabólica. 4. Alcaloides. 5. Atividade espasmolítica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

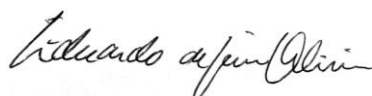
**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

**ANÁLISE METABOLÔMICA DAS FOLHAS DE *Cissampelos sympodialis*  
Eichler E A RELAÇÃO COM A ATIVIDADE RELAXANTE EM  
TRAQUEIA DE COBAIA**

Tese 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 a obtenção do título de Doutor  
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área  
de Concentração: Farmacoquímica.

**Aprovada em 31/08 /2015**

Comissão Examinadora:



**Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador

---

**Profa. Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva**  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)  
Examinador Externo

---

**Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Externo

---

**Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno

---

**Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno

*Á Deus pelo dom da vida;  
Á minha família, especialmente aos meus pais Maria José e Cristóvão,  
pelo amor incondicional, apoio e motivação e ao  
meu noivo Leonardo Antunes Trindade,  
por sua paciência e dedicação, estando ao meu lado a todo momento.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Eduardo de Jesus Oliveira, pela oportunidade e confiança que me foi concedida, além dos muitos ensinamentos transmitidos. Por ser um exemplo de profissional e pessoa íntegra, qualidades que com certeza contribuíram para minha formação.

Ao co-orientador Professor Jan Schripsema da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela aquisição dos espectros e a grande contribuição científica na realização desse trabalho.

À co-orientadora Professora Bagnólia pelos ensinamentos contínuos, desde as disciplinas do mestrado. Por ter aberto as portas do Laboratório de Farmacologia Funcional fornecendo todo o suporte para a realização dos ensaios farmacológicos.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Funcional, especialmente Iara Leão Luna e Souza e Luiz Henrique César Vasconcelos pelo comprometimento e imensa ajuda durante os experimentos.

Aos funcionários do Biotério Prof. Thomas George do CBIotec/UFPB pelo fornecimento dos animais e aos demais técnicos e funcionários por terem me auxiliado por diversas vezes, especialmente Gilvandro (CT), Raimundo Nonato, Vicente Carlos e Crispim.

As amigas que pude construir durante os seis anos desta caminhada (mestrado e doutorado). As amigas do laboratório LAFAM, especialmente Aline Cavalcanti, Eugênia Abrantes e Ayala Nara, pelos anos de convivência e companheirismo e aos amigos de turma de doutorado Augusto, Ísis, Niara, Antonilêni, Fábio Tenório e a todos que me apoiaram direta e indiretamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

*Cissampelos sympodialis* Eichler, pertence a família Menispermaceae, sendo conhecida popularmente como “milona”. A espécie tem demonstrado por meio de testes pré-clínicos, potencial de interferir em processos relacionados com a fisiopatologia da asma, exercendo múltiplos efeitos sinérgicos. A warifteína, um alcaloide bisbenzilisquinolínico, tem sido apontada como a principal substância bioativa presente nas folhas e nas raízes desta espécie. O presente estudo utilizou metodologia metabolômica baseada em RMN e combinação com análise multivariada para analisar a variação química qualitativa e quantitativa dos constituintes presentes nos extratos hidroalcoólicos das folhas durante o desenvolvimento da planta (entre 60 a 210 dias após o plantio, codificados como CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> e CsF<sub>210</sub>) e a relação com o efeito *in vitro* sobre traqueia isolada de cobaia. Os dados de RMN-<sup>1</sup>H dos seis extratos das folhas foram submetidos à análise por PCA e os teores dos compostos identificados foram quantificados por RMNq-<sup>1</sup>H. O teor de warifteína e metilwarifteína foram determinados por CLAE e o teor de fenólicos totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como o composto fenólico padrão. Os extratos submetidos à análise por RMN-<sup>1</sup>H foram simultaneamente testados quanto à sua potência em relaxar *in vitro* a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol. Para estudar a relação entre o perfil químico e a atividade farmacológica foi empregada a técnica de PLS (Partial Least Squares). O estudo foi capaz de identificar e quantificar vinte substâncias dentre metabólitos primários e secundários presentes em todos os extratos das folhas. Os teores dos alcaloides majoritários decaem de  $2,0 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$  para warifteína e  $1,0 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$  para metilwarifteína a níveis não detectáveis, a partir de 90 dias após o plantio para a warifteína e a partir de 120 dias para metilwarifteína. Os compostos fenólicos e os flavonóis quercetina ( $0,1 \pm 0,05$  a  $1,0 \pm 0,12 \text{ mmol/L}$ ) e caempferol ( $0,4 \pm 0,12$  a  $1,0 \pm 0,16 \text{ mmol/L}$ ) se comportam de forma contrária, aumentando os seus níveis no sentido da frutificação. Através da análise de PCA foi possível diferenciar todos os extratos, demonstrando que o ciclo vegetativo está associado com diferenças claras na composição química, principalmente devido a variações na concentração de açúcares, compostos fenólicos e derivados do ácido quínico. O extrato (CsF<sub>210</sub>) originado das folhas no período da frutificação foi o mais distinto entre as amostras, sendo os sinais atribuídos aos derivados do ácido quínico, quercetina e caempferol responsáveis por esta discriminação. Os seis extratos foram capazes de relaxar a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol, sendo o extrato CsF<sub>210</sub> ( $\text{CE}_{50} = 74,6 \pm 7,9 \mu\text{g/mL}$ ) mais potente em relação aos extratos CsF<sub>90</sub> ( $\text{CE}_{50} = 231,6 \pm 38,9 \mu\text{g/mL}$ ) e CsF<sub>180</sub> ( $\text{CE}_{50} = 239,7 \pm 15,1 \mu\text{g/mL}$ ) na presença de epitélio funcional. Não houve correlação entre o teor de alcaloides determinados por CLAE e a atividade espasmolítica dos extratos. Por outro lado, a análise por PLS demonstrou correlação entre os sinais de derivados dos flavonóis quercetina e caempferol e a potência espasmolítica dos extratos. Em conjunto nossos resultados demonstram pela primeira vez que os alcaloides bisbenzilisquinolínicos warifteína e metilwarifteína não parecem estar envolvidos nas ações espasmolíticas dos extratos polares de *Cissampelos sympodialis*.

Palavras-Chaves: *Cissampelos sympodialis*; Metabolômica; PLS; RMN; PCA; CLAE; Alcaloides; Atividade espasmolítica.

## ABSTRACT

*Cissampelos sympodialis* Eichl., (Menispermaceae) is popularly known as “milona”. This species has shown potential to interfere with the pathophysiology of asthma by exerting multiple synergistic effects. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid has been considered as the main bioactive substance present in the leaves and roots of this species. The present work used a metabolomics approach combined with multivariate data analysis to study quantitative and qualitative chemical variations in the leaf extracts during the phenological development of the plant (between 60 and 210 days after seedling, and the corresponding extracts were coded as CsL<sub>60</sub>, CsL<sub>90</sub>, CsL<sub>120</sub>, CsL<sub>150</sub>, CsL<sub>180</sub> e CsL<sub>210</sub>) and its relation with the relaxing effect using *in vitro* guinea pig tracheal. <sup>1</sup>H-NMR data from extracts were submitted to PCA analysis and the concentration of the identified compounds was quantified by <sup>1</sup>H qNMR. The contents of warifteine and methylwarifteine were determined by HPLC and the total phenolic content of extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method, using galic acid as standard. Extracts submitted to <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy were simultaneously screened to determine their potency in relaxing *in vitro* guinea-pig tracheal pre-contracted with carbachol. To investigate the relationship between chemical profile and pharmacological activity we used PLS regression. The method was able to identify and to quantitate 20 primary and secondary metabolites in the extracts. The concentration of the major alkaloids decrease from  $2.0 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$  for warifteine and  $1.0 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$  for methylwarifteine to undetectable levels from 90 days onwards after seedling for warifteine and 120 days for methylwarifteine. Phenolic compounds and derivatives of the flavonols quercetin and kaempferol behave in na opposite fashion, increasing its levels towards fructification (from  $0.1 \pm 0.05$  to  $1.0 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$  for quercetin and from  $0.4 \pm 0.12$  to  $1.0 \pm 0.16 \text{ mmol/L}$  for kaempferol). The metabolomics study based on <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy with PCA was able to discriminate all extracts demonstrating that the phenological cycle is associated with clear differences in chemical composition, mainly due to variations in the concentration of sugars and quinic acid derivatives. The extract obtained during fructification (CsL<sub>210</sub>) was the most distinctive amongst all samples mainly due to signals from quinic acid derivatives, kaempferol and quercein derivatives. The content of major alkaloids decreased from  $2.0 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$  for warifteine and  $1.0 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$  to methylwarifteine to undetectable levels from 90 days onwards after seedling for warifteine and 120 days for methylwarifteine. The phenolic compounds and flavonoids quercetin ( $0.1 \pm 0.05$  a  $1.0 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$ ) and kaempferol ( $0.4 \pm 0.12$  a  $1.0 \pm 0.16 \text{ mmol/L}$ ) behaved in an opposite fashion, increasing its concentration towards fructification. The six extracts relaxed the trachea pre-contracted with carbachol guinea pig, and the CsF<sub>210</sub> extract ( $\text{EC}_{50} = 74.6 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ ) more potent compared to CsL<sub>90</sub> extracts ( $\text{EC}_{50} = 231.6 \pm 38.9 \mu\text{g/ml}$ ) and CsL<sub>180</sub> ( $\text{EC}_{50} = 239.7 \pm 15.1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of functional epithelium. There was no correlation between the content of alkaloids as determined by HPLC and the spasmolytic activity of the extracts. PLS analysis revealed a moderate correlation between <sup>1</sup>H-NMR signals for quercetin and kaempferol derivatives and the spasmolytic activity of extracts. Taken together our results demonstrate for the first time that bisbenzylisoquinoline alkaloids warifteine and methylwarifteine do not seem to participate in the spasmolytic actions of polar *Cissampelos sympodialis* extracts.

**Keywords:** *Cissampelos sympodialis*; metabolomics; PLS; NMR; PCA; HPLC; Alkaloids; spasmolytic activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichler.....	<b>21</b>
<b>Figura 2 -</b>	Alcaloides isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 3 -</b>	Sumário dos alvos terapêuticos da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 4 -</b>	Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa.....	<b>30</b>
<b>Figura 5 -</b>	Acoplamento fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC $\beta_1$ .....	<b>31</b>
<b>Figura 6 -</b>	Acoplamento fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via Gs-AC-PKA e NO-sGC-PKG.....	<b>33</b>
<b>Figura 7 -</b>	Esquema de preparação dos extratos.....	<b>49</b>
<b>Figura 8 -</b>	Protocolo experimental para avaliação da atividade relaxante.....	<b>55</b>
<b>Figura 9 -</b>	Sobreposição de espectros de RMN- $^1H$ das amostras de folhas que representam o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ) de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 10 -</b>	Espectro de RMN- $^1H$ ( $\delta$ 0,9 a 3 ppm) das amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 11 -</b>	Espectro de RMN- $^1H$ ( $\delta$ 4,1 a 5,41 ppm) das amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 12 -</b>	Espectro de RMN- $^1H$ ( $\delta$ 6,3 a 8,5 ppm) das amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 13 -</b>	Estrutura do ácido quínico.....	<b>60</b>
<b>Figura 14 -</b>	Estrutura dos flavonóis.....	<b>61</b>
<b>Figura 15 -</b>	Espectro COSY (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) obtido da amostra CsF <sub>210</sub> .....	<b>63</b>
<b>Figura 16 -</b>	Espectro HMBC (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) obtido da amostra CsF <sub>210</sub> .....	<b>64</b>

<b>Figura 17 -</b>	Cromatograma obtido por CLAE para determinação do teor de alcaloides.....	<b>73</b>
<b>Figura 18 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>60</sub> em traqueia de cobaia pré contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>80</b>
<b>Figura 19 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>90</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>81</b>
<b>Figura 20 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>120</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>82</b>
<b>Figura 21 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>150</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>83</b>
<b>Figura 22 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>180</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>84</b>
<b>Figura 23 -</b>	Registros representativos do efeito relaxante do CsF <sub>210</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).....	<b>85</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Teor de aminoácidos identificados nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>66</b>
<b>Gráfico 2 -</b>	Teor de ácidos orgânicos identificados nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>67</b>
<b>Gráfico 3 -</b>	Teor de compostos derivados do ácido quínico identificados nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>68</b>
<b>Gráfico 4 -</b>	Teor de carboidratos identificados nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>69</b>
<b>Gráfico 5 -</b>	Teor de flavonóis identificados nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>70</b>
<b>Gráfico 6 -</b>	Teor de fenólicos totais nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> durante o ciclo vegetativo (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>72</b>
<b>Gráfico 7 -</b>	"Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros RMN- <sup>1</sup> H (δ -0,06 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> referentes ao ciclo de coletas (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>75</b>
<b>Gráfico 8 -</b>	"Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros de RMN- <sup>1</sup> H (δ -0,06 a 8,7 ppm) das amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> , referentes ao ciclo de coletas (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ).....	<b>76</b>
<b>Gráfico 9 -</b>	"Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros RMN- <sup>1</sup> H (δ 5,5 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> referentes ao ciclo de coletas.....	<b>77</b>
<b>Gráfico 10 -</b>	"Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros de RMN- <sup>1</sup> H (δ 5,5 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> referentes ao ciclo de coletas.....	<b>78</b>
<b>Gráfico 11 -</b>	Efeito relaxante de CsF <sub>60</sub> (■), CsF <sub>90</sub> (□), CsF <sub>120</sub> (●), CsF <sub>150</sub> (○), CsF <sub>180</sub> (▲) e CsF <sub>210</sub> (Δ) sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional em traqueia de cobaia.....	<b>86</b>
<b>Gráfico 12 -</b>	Correlação linear entre o teor de alcaloides e a atividade relaxante em	

	traqueia de cobaia dos extratos das folhas de <i>Cissampelos</i> <i>sympodialis</i> .....	87
<b>Gráfico 13 -</b>	Correlação linear entre o índice pluviométrico e o teor de alcaloides dos extratos das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	89
<b>Gráfico 14 -</b>	Correlação linear entre o teor de fenólicos totais e a atividade relaxante em traqueia de cobaia dos extratos das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	90
<b>Gráfico 15 -</b>	Correlação linear entre o teor de ácido quínico e a atividade relaxante em traqueia de cobaia dos extratos das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	91
<b>Gráfico 16 -</b>	Predição dos valores de PC1 vs PC2 na calibração do modelo PLS.....	93
<b>Gráfico 17 -</b>	Predição dos valores de PC1 vs PC2 na validação cruzada do modelo PLS.....	94
<b>Gráfico 18 -</b>	"Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PLS de espectros RMN- $^1\text{H}$ ( $\delta$ 6,02 - 8,5 ppm) de amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> referentes ao ciclo de coletas (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ) em função dos valores de pCE <sub>50</sub> dos extratos na presença de epitélio funcional.....	95
<b>Gráfico 19 -</b>	"Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PLS de espectros RMN- $^1\text{H}$ ( $\delta$ 6,02 - 8,5 ppm) de amostras de folhas de <i>C. sympodialis</i> referentes ao ciclo de coletas (CsF <sub>60</sub> a CsF <sub>210</sub> ) em função dos valores de pCE <sub>50</sub> dos extratos na presença de epitélio funcional.....	96
<b>Gráfico 20 -</b>	Coeficiente de regressão entre os dados de RMN- $^1\text{H}$ ( $\delta$ 6,02 - 8,5 ppm) dos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> e os respectivos valores de pCE <sub>50</sub> na presença de epitélio funcional.....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Equipamentos utilizados .....	<b>47</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Dados da colheita e material vegetal.....	<b>48</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Condições cromatográficas do método para quantificação de warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>53</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ ) e as constantes de acoplamento (Hz) detectadas a partir de espectros de RMN 1D e 2D em 50% de MeOH- $\text{d}_4$ em $\text{D}_2\text{O}$ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ tampão pH 6,0).....	<b>62</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Concentração (mmol/L) média $\pm$ desvio padrão (n=5) dos metabólitos identificados nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	<b>65</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Concentração média $\pm$ desvio padrão de fenólicos totais encontradas nos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>C. sympodialis</i> .....	<b>71</b>
<b>Tabela 7-</b>	Teor de warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	<b>74</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Valores de $\text{CE}_{50}$ dos extratos das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh em anéis de traqueia de cobaia.....	<b>86</b>

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1</b> – Equação da quantificação absoluta.....	<b>51</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FTA: Fração total de alcaloides

FA: Fração aquosa

CsF: Extrato das Folhas de *Cissampelos sympodialis*

cAMP: Monofosfato Cíclico de Adenosina

cGMP: Monofosfato Cíclico de Guanosina

EDRFs: Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RMNq-<sup>1</sup>H: Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de hidrogênio

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

TSP: Ácido Trimetilsilil Propanóico

AESA: Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba

HMD: Human Metabolome Database

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

COSY: Correlation Spectroscopy

PCA: Principal Component Analysis

PC: Principal Component

PLS: Partial Least Squares

PLS-DA: Partial Least Squares Discriminant Analysis

HCA: Hierarchical Cluster Analysis

CE<sub>50</sub>: Concentração Eficaz Média

CCh: Carbacol

AA: Ácido Araquidônico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica .....</b>	<b>19</b>
2.1	Considerações sobre <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	20
2.1.1	Estudo Químico de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	21
2.1.2	Potencial Farmacológico e Toxicológico de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	24
2.2	Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso.....	29
2.3	Variação do Conteúdo Metabólico em Plantas.....	34
2.4	Metabolômica.....	34
2.4.1	Aplicações da Metabolômica.....	36
2.4.2	Etapas da Análise Metabolômica.....	37
2.4.2.1	Preparo da Amostra.....	37
2.4.2.2	Aquisição de Dados.....	39
2.4.2.3	Análise Multivariada dos Dados.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	Objetivo Geral.....	44
3.2	Objetivos Específicos.....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1	Reagentes e Padrões.....	46
4.2	Equipamentos.....	47
4.3	Material Vegetal e Colheita.....	47
4.4	Preparação dos Extratos.....	49
4.5	Análise por RMN.....	50
4.6	Análise Multivariada.....	50
4.7	RMN Quantitativo.....	51
4.8	Teor de Fenólicos Totais.....	51
4.9	Teor de warifteína e metilwarifteína.....	52
4.10	Animais.....	53
4.11	Preparação das Soluções-Estoques.....	54
4.12	Avaliação da Atividade Relaxante dos Extratos em Traqueia Isolada de Cobaia.....	54
4.13	Análise Estatística.....	55



<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1	Perfil Metabólico de <i>Cissampelos sympodialis</i> .....	57
5.2	Quantificação dos Compostos Identificados.....	65
5.3	Teor de Fenólicos Totais.....	71
5.4	Teor de Alcaloides.....	72
5.5	Análise Multivariada dos Dados de RMN- <sup>1</sup> H.....	74
5.6	Efeito dos Extratos das Folhas sobre as Contrações Tônicas Induzidas por Carbacol em Traqueia de Cobaia.....	79
5.7	Estudo de Correlações.....	87
5.7.1	Correlação Potência <i>versus</i> Teor de Alcaloides.....	87
5.7.2	Correlação Alcaloides <i>versus</i> Índice Pluviométrico.....	88
5.7.3	Correlação Potência <i>versus</i> Teor de Fenólicos Totais.....	89
5.7.4	Correlação Potência <i>versus</i> Teor de Ácido Quínico.....	91
5.7.5	Correlação da Informação Química <i>versus</i> Atividade Farmacológica.....	92
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>125</b>

# **Introdução**

## 1 Introdução

O uso dos produtos naturais iniciou-se há muitos anos, sendo utilizados de forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos, representando um importante papel na saúde mundial. O estudo contínuo sobre plantas medicinais com foco no conhecimento do processo metabólico e do efeito das plantas sobre a fisiologia humana têm ampliado cada vez mais o campo de aplicação das plantas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2012; DEY et al., 2012). Os metabólitos secundários, pela diversidade de tipos estruturais complexos, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para a espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos. Portanto, de grande utilidade para a descoberta de novos fármacos e outros bioprodutos (FUNARI et al., 2013).

Estudos fitoquímicos com espécies vegetais utilizadas no tratamento da asma têm sido realizados com o objetivo de encontrar novas substâncias terapêuticas, que possam servir como fármacos ou, então, como protótipos para novos medicamentos e que tenham menos efeitos adversos em relação aos tratamentos atuais (MANGUEIRA et al., 2010).

A espécie *Cissampelos sympodialis* Eichler pertence à família Menispermaceae, sendo utilizada largamente na medicina popular e indígena para o tratamento de distúrbios inflamatórios, incluindo a asma. Suas folhas e raízes são empregadas no tratamento de doenças do aparelho respiratório, reumatismo e artrite. Trata-se de uma trepadeira, conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira”. Sua ocorrência é verificada em vários estados brasileiros, como Paraíba, Ceará, Alagoas e Bahia (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997; AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007). A espécie tem demonstrado por meio de testes pré-clínicos, potencial de interferir em processos relacionados com a fisiopatologia da asma, exercendo múltiplos efeitos sinérgicos (CAVALCANTI et al., 2013). Dentre estes efeitos, tem-se a comprovação do aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias (PIUVEZAM et al., 1999), diminuição na produção de imunoglobulina antígeno-específico (BEZERRA SANTOS et al., 2004), redução da produção e deposição de muco nas vias aéreas (BEZERRA-SANTOS et al., 2012), e uma atividade broncodilatadora direta (THOMAS et al., 1997a). A warifteína, um alcalóide bisbenzilisiquilolínico, foi apontada como a principal substância bioativa presente nas folhas e nas raízes desta espécie (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS et al., 1997).

Sabe-se que o teor de metabólitos é afetado por condições ambientais e esta variação qualitativa e quantitativa pode influenciar a resposta farmacológica. A época em que o material vegetal é coletado é um dos critérios de maior importância, visto que a quantidade e a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano e o crescimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A metabolômica proporciona uma visão geral de todos os metabólitos presentes no organismo sob certas condições e tem se desenvolvido como um importante campo da ciência das plantas e produtos químicos naturais (SEGER; STURM, 2007; SCHRIPSEMA, 2010). Para garantir a constância de princípios ativos e/ou marcadores químicos, e a reprodutibilidade das ações farmacológicas de um produto natural, se faz necessário um rigoroso controle de qualidade e a metabolômica fornece uma poderosa ferramenta para a compreensão do metabolismo vegetal, mostrando-se especialmente útil para efeitos de controle de qualidade ou taxonômicos (HEYMAN; MEYER, 2012; YANG et al., 2014).

Para análise do metaboloma, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada uma técnica apropriada, pois necessita de amostras com pouca massa; proporcionando uma análise rápida, altamente reprodutível e não destrutiva. Além disso é uma técnica que responde a qualquer substância orgânica que possua átomos de hidrogênio ou carbono, sendo assim bastante universal. A espectroscopia de RMN permite a determinação de estruturas moleculares dos compostos individuais, mesmo em misturas, e muitos sinais podem ser identificados sem a necessidade de mais fracionamento do extrato, com o auxílio de técnicas de correlação homonucleares e heteronucleares de RMN. Além de ser uma técnica útil do ponto de vista qualitativo, a espectroscopia de RMN também pode ser empregada para a quantificação dos compostos presentes na planta, pois a intensidade do sinal dos compostos é proporcional à sua concentração molar (VERPOORTE; CHOI; MUSTAFA, 2008; KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011).

Com o intuito de investigar a variação na composição química e atividade biológica dos extratos das folhas de *C. sympodialis*, o presente estudo utilizou a análise metabolômica, empregando a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  em combinação com análise multivariada, para conhecer os metabólitos presentes nesta espécie, buscando verificar a variabilidade química nos estágios de desenvolvimento vegetal, e sua relação com o efeito relaxante na musculatura lisa das vias aéreas.

# **Fundamentação**

## **Teórica**

## 2 Fundamentação Teórica

### 2.1 Considerações sobre *Cissampelos sympodialis*

A família Menispermaceae, a qual pertence a espécie *Cissampelos sympodialis* Eichler, é composta por cerca de 70 gêneros e 420 espécies, sendo representada no Brasil por cerca de 15 gêneros e 108 espécies. O gênero *Cissampelos* é composto por 19 espécies, sendo 9 encontradas no Brasil e destas, três de ocorrência no estado da Paraíba: *Cissampelos sympodialis*, *Cissampelos pareira* e *Cissampelos fasciculata*. As espécies possuem semelhanças anatômicas que são distinguíveis após exame microscópico de suas folhas (BARROSO, 1978; PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008; BRAGA, 2015).

*Cissampelos sympodialis* (Figura 1) é conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira”. Trata-se de uma espécie trepadeira encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do país, do Ceará a Minas Gerais; ocorrendo frequentemente em áreas abertas, sobre arbustos em solo argiloso (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997). As folhas são características da espécie: glabras, com formato deltoide e pecíolo espessado nas extremidades. A ausência de sacos secretores, geralmente presentes no feixe vascular e no pecíolo, registrados para várias espécies de Menispermaceae, inclusive em *C. pareira* e *C. fasciculata*, é um caráter não observado em *Cissampelos sympodialis*. Já os frutos são do tipo drupáceo e de coloração vermelho alaranjado quando maduros (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007; PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008). A germinação das sementes ocorre de 18 a 25 dias, a floração em cerca de 150 dias após o plantio e o período entre a floração e a maturação dos frutos é de aproximadamente 26 dias (FONSECA; FIGUEIREDO, 1999).

Suas folhas e raízes são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças do aparelho respiratório, reumatismo e artrite (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007). É considerada uma espécie de grande importância farmacológica pelas diversas atividades já confirmadas, em destaque o seu potencial de interferir em processos relacionados com a fisiopatologia da asma, exercendo múltiplos efeitos sinérgicos (CAVALCANTI et al., 2013).

**Figura 1** - *Cissampelos sympodialis* Eichler: **A.** Planta adulta; **B.** Detalhe das folhas deltoides e os frutos maduros (cor vermelha).



Fonte: CAVALCANTI et al., 2013.

### 2.1.1 Estudo Químico de *Cissampelos sympodialis*

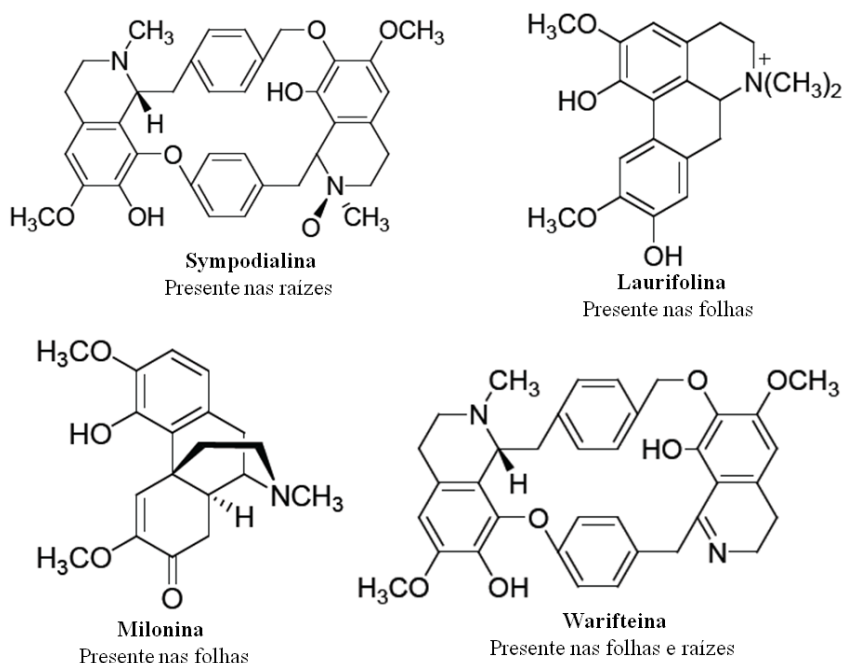
A família Menispermaceae é caracterizada pela presença de alcaloides, havendo relatos do isolamento de 1522 destas moléculas, em 160 espécies diferentes (BARBOSA-FILHO; DA-CUNHA; GRAY, 2000). Quanto à sua estrutura química, destacam-se em abundância os alcaloides bisbenzylisoquinolínicos, seguido pelos aporfínicos e os protoberberínicos (ARAGÃO, 2002).

Estudos fitoquímicos com *C. sympodialis* permitiram a identificação e caracterização estrutural dos seguintes alcaloides (Figura 2): sympodialina, laurifolina (ALENCAR, 1994), milonina (DEFREITAS et al., 1995), warifteina (CÔRTES et al., 1995), metilwarifteina (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997), coclaurina (LIRA, 2001), liriodenina, roraimina (LIRA et al., 2002), des-7'-O-metilroraimina e seu epímero epi-des-7'-O-metilroraimina (MARINHO et al., 2013) e a sousina (MEDEIROS, 2013).

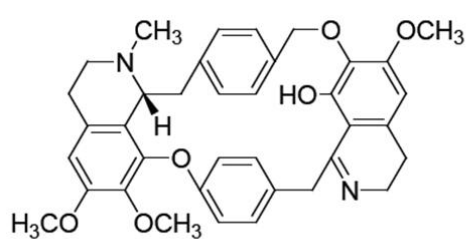
A principal substância bioativa presente no extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis* é considerada como sendo a warifteína, um alcaloide bisbenzilisiquilolínico, que ocorre tanto nas folhas como nas raízes, a uma concentração de aproximadamente 1% do peso do extrato etanólico concentrado (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS et al.,1997). A warifteína, juntamente com seu derivado, a metilwarifteína e a milonina, um alcaloide morfinâmico, são considerados os marcadores da espécie e foram implicados nas ações farmacológicas descritas para o extrato das folhas da planta (MARINHO; BARBOSA-FILHO; OLIVEIRA, 2011).

O screening fitoquímico com quatro lotes de folhas de *C. sympodialis*, demonstrou além dos alcaloides, a presença de compostos fenólicos representados principalmente por taninos e flavonoides no extrato hidroalcoólico das folhas. A análise histoquímica das folhas revelou reação positiva mais intensa para alcaloides, compostos fenolicos, polissacarídeos ácidos e lipídios totais (CAVALCANTI et al., 2014).

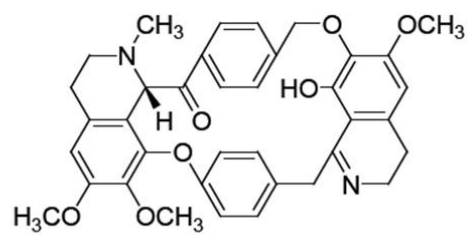
**Figura 2** - Alcaloides isolados de *Cissampelos sympodialis*.



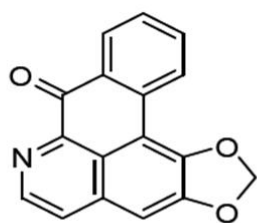




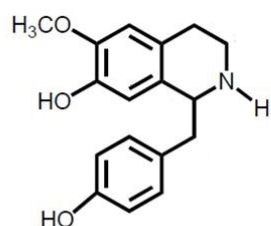
**Metilwarifteina**  
Presente nas folhas e raízes



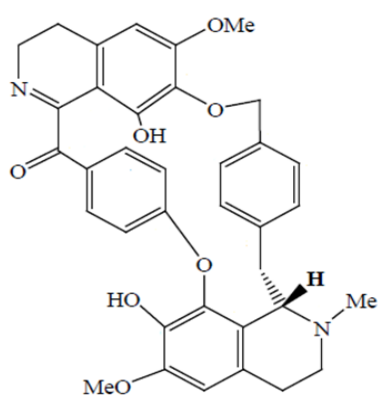
**Roraimina**  
Presente nas raízes



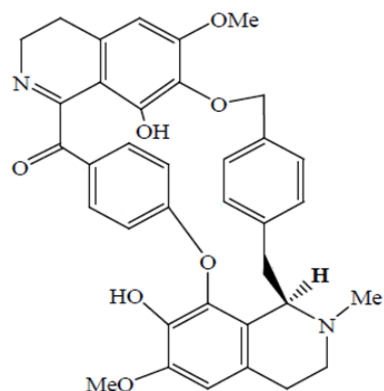
**Liriodenina**  
Presente nas raízes



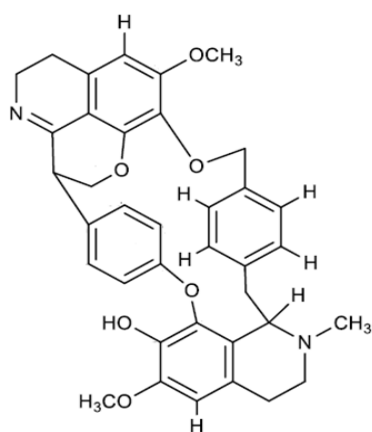
**Coclaurina**  
Presente nas folhas



**des-7'-O-metilroraimina**  
Presente nas raízes



**epi-des-7'-O-metilroraimina**  
Presente nas raízes



**Sousina**  
Presente nas raízes

### 2.1.2 Potencial Farmacológico e Toxicológico de *Cissampelos sympodialis*

Um dos primeiros relatos da atividade farmacológica de *C. sympodialis* trata de sua ação sobre o tônus muscular. Dentre os estudos, se investigou o efeito da fração aquosa (FA) do extrato etanólico das raízes e foi verificada a atividade relaxante na musculatura lisa de traqueia de cobaias. A fração é equipotente à aminofilina e sua ação parece envolver o aumento intracelular do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), como demonstrado em macrófagos alveolares de cobaia, provavelmente associado à inibição de enzimas fosfodiesterases (THOMAS et al., 1995). Estudos posteriores com a FA do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie confirmaram a atividade broncodilatadora, com comprovada ação espasmolítica (THOMAS et al., 1997a), aumento de cAMP e inibição das enzimas fosfodiesterases em culturas de células de musculatura lisa de traqueia de cobaias (THOMAS et al., 1997b).

Estudos imunológicos com a FA do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis* demonstraram ação imunomoduladora e anti-inflamatória, em decorrência de níveis elevados de interleucina 10 (IL-10) *in vitro*, que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e monócitos (PIUVEZAM et al., 1999). Também foi possível demonstrar que a FA inibe a desgranulação dos neutrófilos por um mecanismo cAMP dependente (THOMAS et al., 1999). Um experimento posterior, utilizando modelo de macrófagos infectados com *Tripanosoma cruzi*, corrobora com o fato de que o efeito anti-inflamatório do extrato pode estar, em parte, relacionado com uma diminuição da atividade de macrófagos resultante da produção aumentada de IL-10. A função dos linfócitos B, também foi estudada e os resultados mostraram que a FA inibiu a resposta proliferativa *in vitro* de células B, podendo indicar um mecanismo adicional para o efeito anti-inflamatório da fração (ALEXANDRE-MOREIRA; PIUVEZAM; PEÇANHA, 2003). A atividade anti-inflamatória pode estar relacionada com os compostos que regulam os mecanismos de edema induzido por TPA (12-O-tetradecanoil forbol acetato) e de migração de neutrófilos induzido por carragenina (BATISTA-LIMA et al., 2001).

A propriedade antialérgica da FA do extrato etanólico das folhas da espécie foi testada a fim de verificar a habilidade em modificar a produção de IgE sérica induzida por um antígeno específico. A administração oral de FA durante a sensibilização de camundongos com ovalbumina (OVA) reduziu de forma significativa a produção de IgE (BEZERRA SANTOS et al., 2006). O tratamento também diminuiu o edema de pata induzida por OVA e

aumentou a produção de IFN- $\alpha$  (BEZERRA SANTOS et al., 2004). A administração intraperitoneal de FA inibiu a reação de choque anafilático, a produção de IgE e a proliferação da resposta celular (BEZERRA SANTOS et al., 2005).

A partir de estudos realizados com a warifteína, principal alcaloide isolado da espécie, observou-se um antagonismo reversível, não específico e não competitivo à histamina, carbacol e bradicinina em íleo de cobaia. Além de antagonizar contrações induzidas por ocitocina e bradicinina em útero de rato, enquanto que, em traqueia de cobaia, o alcaloide inibiu o tônus espontâneo (CÔRTEZ et al., 1995). O alcaloide promoveu efeito relaxante do músculo liso vascular de aorta de coelhos por meio da inibição dos canais de cálcio e a modificação dos estoques de cálcio intracelulares sensíveis à noradrenalina (DEFREITAS et al., 1996). Um estudo posterior utilizando abordagens funcionais e eletrofisiológicas para investigar os mecanismos pelos quais a warifteína promove relaxamento vascular da aorta torácica de rato, forneceu evidências de que o alcaloide induz através de um mecanismo independente do endotélio, relaxamento que envolve a ativação dos canais de K<sup>+</sup> (ASSIS et al., 2013). Demonstrou ainda, potencial anti-alérgico por produzir efeitos inibitórios sobre a eosinofilia e cisteinil-leucotrienos (BEZERRA SANTOS et al., 2006), além de apresentar proteção contra choque anafilático de forma IgE dependente, em comparação com o grupo não tratado e sensibilizado com a ovalbumina (COSTA et al., 2008). A ação da warifteína sobre os linfócitos B, também foi estudada e os resultados sugerem que a substância é um potente inibidor da resposta das células B tanto *in vitro* como *in vivo* e que este efeito pode ser devido ao aumento dos níveis intracelulares de cAMP (ROCHA et al., 2010). A substância também exibiu uma potente atividade anti-inflamatória, através da resposta sobre a migração de neutrófilos, reduzindo a adesão e a migração celular (LIMA et al., 2014).

A milonina, mais um importante alcaloide presente apenas nas folhas da planta, apresentou atividade vasorelaxante mediada pelo endotélio, provavelmente através da liberação de óxido nítrico, ativação da via do óxido nítrico-cGMP e abertura de canais de K<sup>+</sup> (CAVALCANTE et al., 2010).

Os efeitos do tratamento oral com 400 mg/kg da FA do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis*, 8 mg/kg da fração total de alcaloides (FTA) ou 4 mg/kg de warifteína, foram comparados em modelo murino de alergia respiratória induzida por *Blomia tropicalis*. Todos os tratamentos levaram a uma redução no número de células totais e nos níveis de eosinófilos e peroxidase no lavado broncoalveolar (LBA); além da diminuição da produção de IgE, da

ativação de leucócitos e na degranulação dos mastócitos. Porém, a FA apresentou melhores resultados em todos os parâmetros analisados em comparação com a FTA ou warifteína, o que pode ser explicado pelo efeito aditivo ou sinérgico dos diferentes compostos dentro do extrato (CERQUEIRA-LIMA et al., 2010). Os dados obtidos nos estudos *in vivo* com o tratamento por instilação nasal com FA ou seus alcaloides warfteína, metilwarifteína ou milonina, permitiram concluir que o tratamento é eficiente no modelo experimental de asma. Entretanto, a FA apresentou melhor efeito quando comparado aos alcaloides isolados e sua atividade ocorre provavelmente por inibição da migração de células inflamatórias para o pulmão, produção de muco e danos teciduais (VIEIRA et al., 2013).

Por outro lado, um estudo também comparativo, demonstrou que a FA e a warifteína inibiram a hiper-reatividade das vias aéreas e o remodelamento pulmonar, através de um mecanismo, parcialmente dependente da IL-13 e inibição de eosinófilos, além de promover a redução da produção e deposição de muco nas vias aéreas. Os autores sugerem que a warifteína representa o principal componente ativo responsável pelos efeitos de *C. sympodialis*. No entanto, outros constituintes principalmente alcaloides como metilwarifteína, milonina e roraimina, podem também contribuir para os efeitos anti-alérgicos do extrato (BEZERRA-SANTOS et al., 2012). Também foi demonstrado que a FA modula células da imunidade inata, principalmente as células T reguladoras no modelo experimental de alergia alimentar induzido por OVA. Os dados mostram que o tratamento oral com a FA ou com os alcaloides warifteína ou metilwarifteína, melhoram os sintomas da doença. Porém, novos estudos devem ser realizados para demonstrar a ligação destes alcaloides a alvos moleculares específicos (COSTA et al., 2013).

Outras atividades farmacológicas foram relacionadas à FA das folhas de *C. sympodialis*, como ação anti-depressiva (ALMEIDA et al., 1998; MENDONÇA-NETTO et al., 2008); efeitos cardiovasculares (MEDEIROS et al., 1998), papel no tratamento da psoríase, devido a atividade imunomoduladora (FEILY; NAMAZI, 2009) e ação antinociceptiva (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2011).

Estudos que avaliam a toxicidade dos efeitos de *C. sympodialis* apontam para a segurança de se utilizar a FA do extrato etanólico das folhas, que é a fração utilizada em todos os testes farmacológicos com a espécie (CAVALCANTI et al., 2013).

Um estudo de toxicidade subaguda realizado em cães usando uma dose oral cinco vezes maior do que a utilizada na medicina popular (45 mg/kg/dia), demonstrou que a FA não

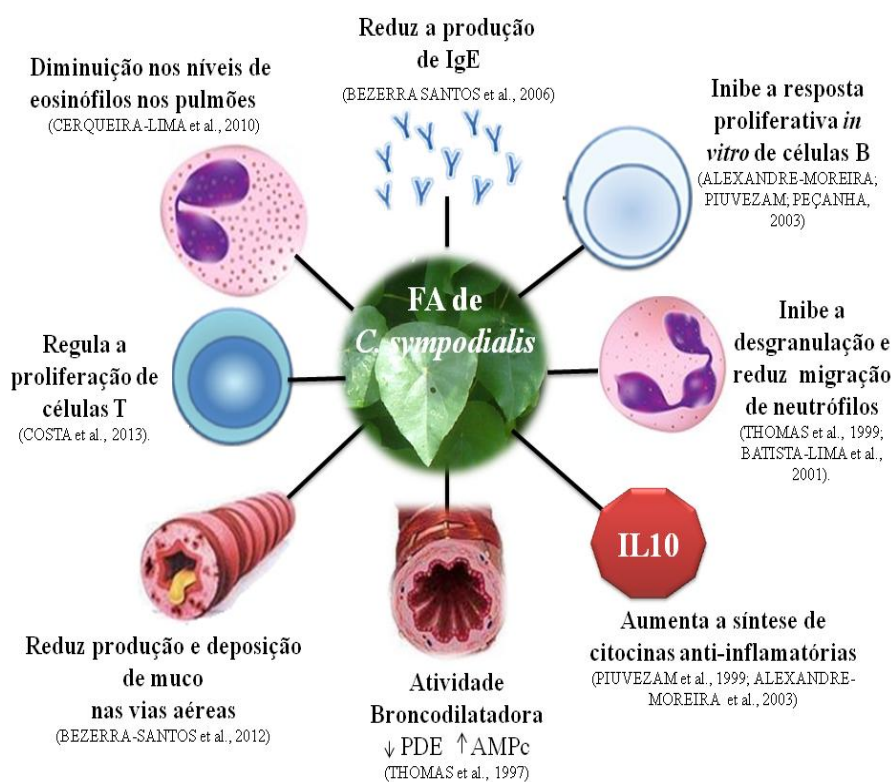
induziu qualquer efeito significativo sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos (DINIZ et al., 2002). O tratamento oral com a FA em doses terapêuticas (9,0, 45,0 e 225,0 mg/kg), foi investigado quanto a segurança durante todo o período de gestação em ratas. A prole não mostrou malformações e nenhuma interferência sobre o ganho de peso da ninhada foi observado, o que reflete a ausência de efeitos adversos durante a gravidez (MAIOR et al., 2003). A administração crônica de FA em doses de 45 e 225 mg/kg produziu uma redução do consumo de alimentos e uma perda de peso corporal em ratas, semelhante aos efeitos observados pela metanfetamina e pelo mazindol. O efeito anoréxico observado em FA foi associado ao alcaloide morfínâmico milonina, uma vez que apresenta similaridade estrutural com drogas que atuam sobre o sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 2005). Um teste de toxicologia clínica preliminar com a infusão aquosa das folhas de *C. sympodialis*, avaliou o efeito estimulante da espécie sobre o reflexo de Hoffmann do músculo sóleo neuromotor de voluntários adultos. Um grupo recebeu a infusão em uma concentração de 1% das folhas secas da espécie e um outro grupo recebeu a infusão de placebo. Assim, a ingestão do chá das folhas numa concentração de 10 mg/mL, não afetou o reflexo de Hoffmann, sugerindo que a atividade neuromotora não é afetada (SOUZA et al., 2000).

A citotoxicidade dos alcaloides isolados warifteína e milonina foi avaliada em cultura primária de hepatócitos de rato e em fibroblasto pulmonar de hamster chinês (células V79). A warifteína e a milonina mostraram toxicidade semelhantes aos efeitos citotóxicos em células V79. No entanto, a milonina se mostrou menos tóxica do que a warifteína em hepatócitos e células V79. A cimetidina, um inibidor do citocromo P450, não foi capaz de proteger as células contra a ação da warifteína ou milonina para a concentração utilizada, o que significa que os efeitos tóxicos induzidos por estes compostos são, provavelmente, independentes do sistema do citocromo P450 (MELO et al., 2003). Embora os resultados tenham demonstrado um efeito citotóxico dos alcaloides testados, a toxicidade não é reproduzida durante a administração da FA nos estudos de toxicidade aguda e subaguda em ratos e cães, como mencionado anteriormente. Vale ressaltar que os alcaloides milonina, warifteína e metilwarifteína são encontrados em pequenas quantidades no extrato etanólico das folhas, com warifteína ocorrendo em 1% (em peso) do concentrado extraído. No entanto, a concentração destes alcaloides na FA é prevista ser muito menor, devido à sua reduzida solubilidade aquosa. Apesar das indicações de baixa toxicidade, estudos toxicológicos crônicos devem ser

realizados com a FA na dose terapêutica pretendida para o uso humano (CAVALCANTI et al., 2013).

Diante do exposto, é notória a capacidade da fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sympodialis* em restaurar o equilíbrio fisiológico no processo asmático (Figura 3). Apesar de a warifteína ter sido implicada na resposta farmacológica da fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas, não há nenhum estudo fitoquímico demonstrando que esta fração contenha concentrações apreciáveis de warifteína ou de outros alcaloides bisbenzilisquinolínicos. Além disso, o fato de warifteína isoladamente reproduzir algumas das ações da fração aquosa, não prova que estes alcaloides participem dos efeitos da fração, a menos que se demonstre ocorrerem também na fração aquosa. De qualquer forma, os resultados farmacológicos para a fração aquosa são promissores. Isto, somado à sua baixa toxicidade, a torna uma opção interessante como terapia alternativa aplicada no tratamento da asma e outras doenças imunológicas.

**Figura 3** - Sumário dos alvos terapêuticos da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis*.



Adaptado de (BEZERRA-SANTOS et al., 2012).

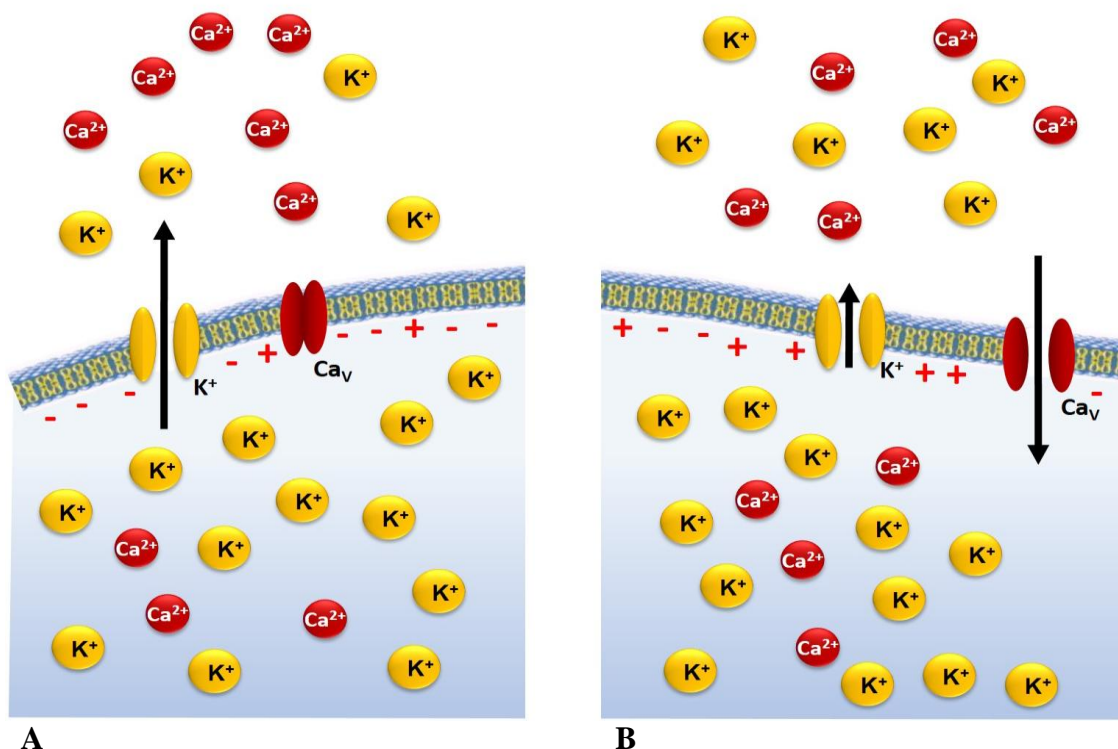
## 2.2 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

O músculo liso, também chamado de músculo visceral, corresponde a aproximadamente 5% da massa muscular total do ser humano. Mesmo com esse pequeno percentual, as células musculares lisas fazem parte das paredes de muitos órgãos e são vitais para diversas funções do organismo, controlando ou regulando o funcionamento da maioria desses órgãos. Os modelos experimentais utilizando músculo liso favorecem a investigação de substâncias terapêuticas que possam ser utilizadas para o tratamento das doenças que acometem tal músculo (CINGOLANI; HOUSSAY, 2004; LIMA et al., 2005).

No músculo liso, um aumento na concentração de cálcio citoplasmático  $[Ca^{2+}]_c$  é a causa primária para a produção da contração e está envolvido na proliferação celular do músculo liso (HILL-EUBANKS et al., 2011). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular, que permite o influxo de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma através dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) (CATTERALL, 2011), e outra intracelular, representada pelos estoques intracelulares, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS), que liberam  $Ca^{2+}$  para o citosol (MA; PAN, 2003). A regulação funcional da  $[Ca^{2+}]_c$ , para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois tipos de acoplamentos: um acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana ( $V_m$ ), e acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada apenas com a mudança do  $V_m$  (REMBOLD, 1992).

O acoplamento eletromecânico leva a resposta contrátil através da despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ( $[K^+]_e$ ) (Figura 4) ou a ligação de bloqueadores dos canais de  $K^+$ . Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons  $K^+$  através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente. O aumento na  $[K^+]_e$  diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos  $Ca_v$  que leva ao influxo de  $Ca^{2+}$  com consequente contração (REMBOLD, 1996).

**Figura 4** - Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa. **A.** Potencial de repouso, efluxo de íons  $K^+$ . **B.** Despolarização, influxo de  $Ca^{2+}$ .



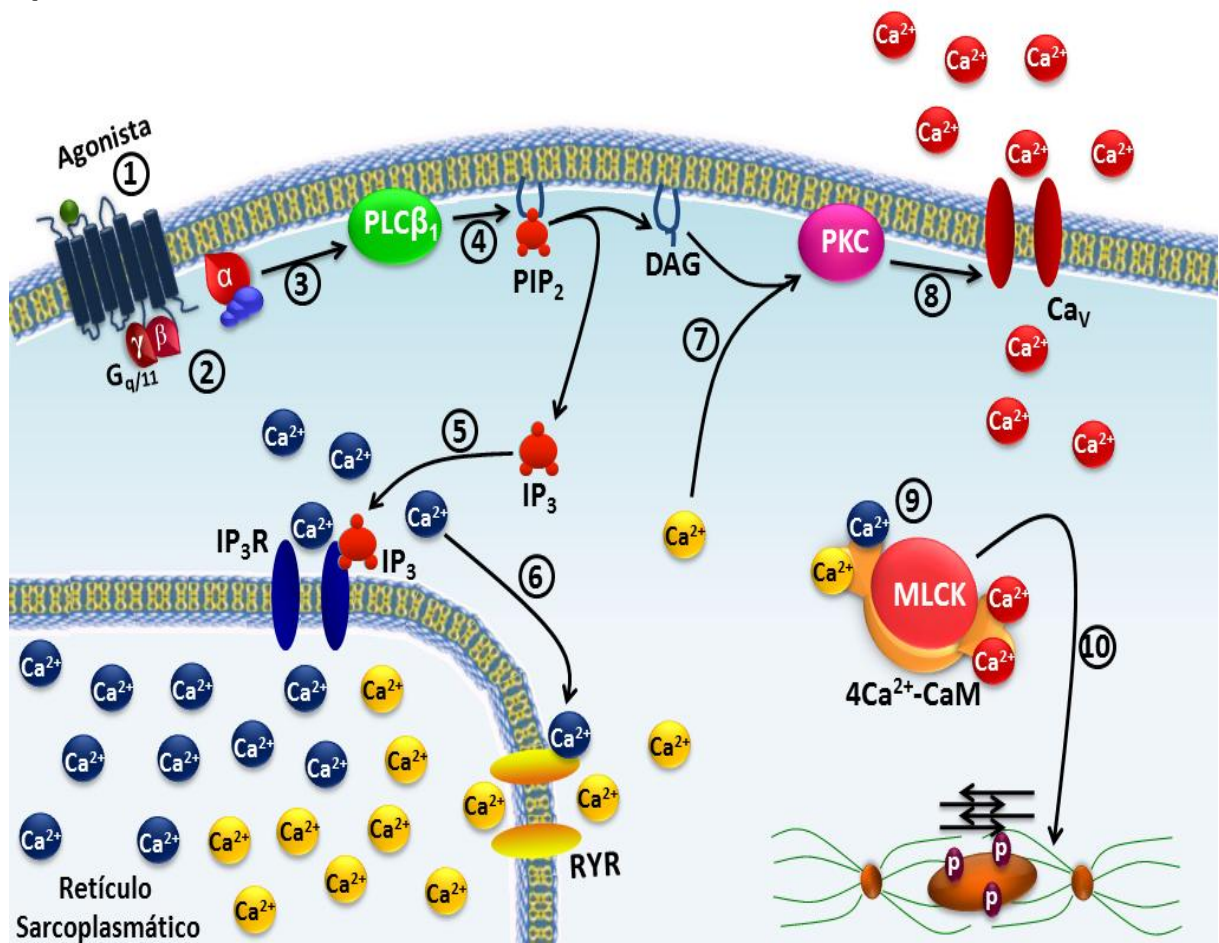
Fonte: SOUZA, 2014.

O acoplamento fármaco-mecânico (Figura 5) induz a resposta contrátil por meio da ligação de agonistas a receptores acoplados à proteínas G (GPCRs) e ativação da cascata do inositol, através das proteínas  $G_{q/11}$ . Mediante a ação da fosfolipase C  $\beta_1$  (PLC $\beta_1$ ) ocorre a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP $_2$ ), originando o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP $_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O IP $_3$  medeia a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) por ativar os receptores de IP $_3$  (IP $_3$ R) e o DAG por ativar a proteína cinase dependente de  $Ca^{2+}$  (PKC), que, por sua vez, leva a um aumento na  $[Ca^{2+}]_c$ , através da ativação direta dos  $Ca_v$  ou, indiretamente, por inibição de canais de  $K^+$  presentes na membrana plasmática. O aumento na  $[Ca^{2+}]_c$  favorece a ligação do  $Ca^{2+}$  com a proteína calmodulina (CaM), formando o complexo cálcio-calmodulina (4 $Ca^{2+}$ -CaM), que por sua vez, ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), a qual fosforila a cadeia leve regulatória da miosina (rMLC), promovendo a interação dos filamentos de miosina com os de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001; BERRIDGE, 2008). A elevação na  $[Ca^{2+}]_c$  também



pode ocorrer por um processo denominado de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), através de receptores de rianodina (RyR) presentes no RS, que são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à cafeína, e que são ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  previamente liberado via  $\text{IP}_3\text{R}$  (MCHALE et al., 2006; DELLIS et al., 2006).

**Figura 5** - Acoplamento fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação da via  $\text{G}_{q/11}$ - $\text{PLC}\beta_1$ .



Fonte: CORREIA, 2013.

1. Ligação do agonista ao receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2. Troca do GDP por GTP na subunidade  $\alpha$  das proteínas  $\text{G}_{q/11}$ , tornando-a ativa; 3. Ativação da enzima  $\text{PLC}\beta_1$  pela subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP; 4. Hidrólise de  $\text{PIP}_2$  em  $\text{IP}_3$  e  $\text{DAG}$ ; 5.  $\text{IP}_3$  ativa o  $\text{IP}_3\text{R}$  no RS, liberando o  $\text{Ca}^{2+}$  do estoque; 6. Ativação do  $\text{RyR}$  pelo  $\text{Ca}^{2+}$  liberado, fazendo com que mais  $\text{Ca}^{2+}$  seja liberado para o citoplasma; 7. Ativação da  $\text{PKC}$  pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{DAG}$ ; 8. Fosforilação dos  $\text{Ca}_v$  por  $\text{PKC}$ , promovendo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 9. Aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  contribui para a formação do complexo  $4\text{Ca}^{2+}$ - $\text{CaM}$  e ativação da  $\text{MLCK}$ ; 10.  $\text{MLCK}$  fosforila a  $\text{rMLC}$ , desencadeando a contração do músculo liso.

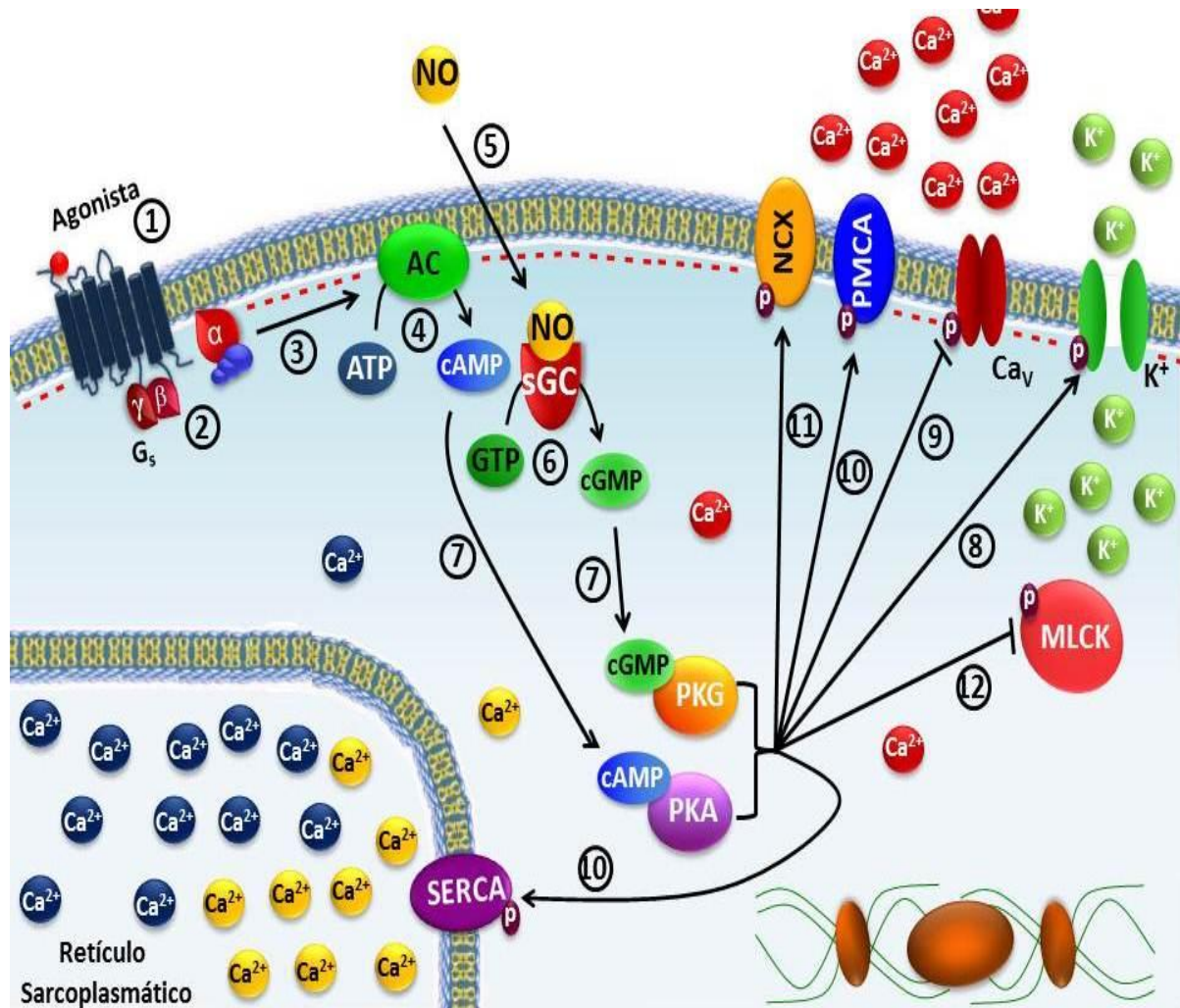
O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção dos estímulos contráteis ou por ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração intracelular de cálcio e aumento da atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina (GURNEY, 1994).

O mecanismo eletromecânico do relaxamento é resultado da repolarização ou hiperpolarização da membrana. Este processo pode ocorrer pela abertura de canais de  $K^+$  na membrana celular, induzido por drogas, tais como: cromacalina, levocromalina e nicorandil ou pela liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do epitélio (EDHFs), como os metabólitos do ácido araquidônico, derivados do citocromo P450 e endocanabinóide, onde o relaxamento promovido é dependente do epitélio, porém não se observa aumento dos níveis intracelulares de GMPc ou AMPc. Ou ainda, em função da liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (EDRFs), como o óxido nítrico (NO) ou prostaciclina ( $PGI_2$ ) (GURNEY, 1994; ARCHER et al., 2002).

O acoplamento fármaco-mecânico (Figura 6) que leva ao relaxamento envolve a fosforilação, via proteína cinase dependente de cAMP (PKA) ou de cGMP (PKG), de vários substratos, ocasionando: (a) o aumento na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando o sequestro e a extrusão de  $Ca^{2+}$ , respectivamente, resultando na diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$ ; (b) a inativação do  $IP_3R$ , pela PKG, reduzindo sua capacidade de liberar o  $Ca^{2+}$  do RS; (c) ativação do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , diminuindo a  $[Ca^{2+}]_c$ ; (d) a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM, causando uma redução nos níveis de rMLC fosforilada; (e) a inibição direta dos  $Ca_v$ , e (f) a ativação de canais de  $K^+$  que, por hiperpolarização, bloqueando os  $Ca_v$  (DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Uma droga que venha a interferir em quaisquer dos mecanismos que levam à contração nos músculos lisos, induzindo como consequência o relaxamento muscular, pode ser muito útil, tendo em vista que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: a asma, hipertensão, cólicas intestinais, uterinas (SANTOS et al., 2013).

**Figura 6** - Acoplamento fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via Gs-AC-PKA e NO-sGC-PKG.



Fonte: CORREIA, 2013.

1. Ligação do agonista ao receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2. Troca do GDP por GTP na subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_s$ , tornando-a ativa; 3. Ativação da ciclase de adenilil (AC) pela subunidade  $\alpha_s$ -GTP; 4. AC converte o ATP em cAMP; 5. NO gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas estimula a atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC); 6. sGC converte a guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP); 7. cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: 8. Ativam os canais de  $K^+$ ; 9. Inibem os  $Ca_v$ ; 10. Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; 11. ativam do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ . Todos esses mecanismos diminuem a  $[Ca^{2+}]_c$ ; 12. inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a ativação da rMLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso.

### **2.3 Variação do Conteúdo Metabólico em Plantas**

Os metabólitos são divididos em dois grandes grupos; os metabólitos primários e secundários. O primeiro grupo compreende moléculas essenciais nos processos básicos de qualquer ser vivo, sendo responsáveis por funções vitais, participando de reações necessárias à manutenção, crescimento e funcionamento normal de uma célula. E os metabólitos secundários, tais como flavonoides, alcaloides, taninos, óleos essenciais; que apresentam geralmente estrutura complexa e de baixo peso molecular, possuindo atividades biológicas marcantes. Diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se geralmente em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas. Estão frequentemente relacionados à sobrevivência da planta, atuando como atrativos para polinizadores, ou na defesa contra herbívoros, patógenos, proteção contra raios ultravioleta, dentre outras funções (FUMAGALI et al., 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O metabolismo e a acumulação de ingredientes ativos, a maioria dos quais são metabólitos secundários, é o reflexo da influência de fatores bióticos e abióticos durante o período de desenvolvimento, além de fatores genéticos. Certos metabólitos são sintetizados apenas sob ambientes específicos, ou seu conteúdo pode aumentar significativamente sob determinado ambiente, podendo ainda haver uma variação diária ou sazonal (LIU et al., 2015).

Os fatores ambientais, tais como a sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, disponibilidade de nutrientes, entre outros, apresentam correlações entre si e podem atuar em conjunto no metabolismo secundário. A época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano, sendo relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários. As variações também podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos (GOBBONETO; LOPES, 2007).

### **2.4 Metabolômica**

Durante a década de 80 e 90, após investidos grandes esforços no sequenciamento do código genético de diversos organismos, ficou evidente que o conhecimento das sequências de todos os genes não é suficiente para se entender todos os mecanismos moleculares de uma

célula. Em consequência, surgiram novas áreas da biologia de sistemas: a Transcriptômica, Proteômica e a Metabolômica, com o objetivo de isolar e caracterizar respectivamente, o RNA, as proteínas e os metabólitos de um organismo vivo (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

O produto inicial da expressão gênica em um organismo é conhecido como transcriptoma e se caracteriza por um conjunto de moléculas de RNA mensageiro (RNAm) sintetizadas a partir de genes que codificam proteínas e, assim direcionam a síntese do produto final da expressão gênica. A proteômica pretende descrever todas as proteínas produto da expressão gênica, fornecendo informações sobre os processos celulares. A metabolômica estuda as mudanças na expressão dos metabólitos em sistemas biológicos, complementando a genômica e a proteômica, por permitir avaliações objetivas do fenótipo (BINNECK, 2004).

A metabolômica, por estar mais perto do fenótipo, pode fornecer informações quando as outras técnicas “ômicas” não fornecerem. Alterações nos níveis de RNAm nem sempre resultam em alterações de proteínas, e uma vez traduzida, uma proteína pode estar ou não enzimaticamente ativa. Assim, as alterações observadas no transcriptoma e no proteoma, não necessariamente correspondem às alterações fenotípicas. Por outro lado, a metabolômica está associada ao genótipo de um organismo, a sua fisiologia e ao meio ambiente, oferecendo a oportunidade de relacionar o fenótipo ao genótipo do organismo (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; TYAGI et al., 2010).

A metabolômica é o estudo sistemático do perfil químico de um organismo e suas variações, e neste sentido pode ser considerada uma ferramenta apropriada para estudar as interações organismo-ambiente, mecanismos de defesa/tolerância a estresses em plantas e o desenvolvimento de tecnologias e produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes e que sejam economicamente viáveis e sustentáveis (VIANT, 2008).

Metabolômica é um campo de pesquisa interdisciplinar que utiliza conhecimentos nas áreas de biociências, química, quimiometria e informática. Além disso, a metabolômica se vale de várias técnicas analíticas, refletindo a complexidade química e a variação nas concentrações dos metabólitos (BINO et al., 2004; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005). A análise de múltiplas amostras de um organismo sob condições diferentes, pode facilitar a identificação de padrões ou marcadores biológicos que são específicos de uma determinada espécie ou de um determinado estágio de desenvolvimento da planta. Pode-se identificar

também, padrões característicos de plantas doentes, estressadas ou ainda padrões metabólicos de plantas em determinadas estações do ano (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011).

#### **2.4.1 Aplicações da Metabolômica**

A metabolômica tem sido amplamente utilizada em conjunto com ferramentas estatísticas, na pesquisa de diversas áreas. Em 2006, o Food and Drug Administration (FDA) publicou o "Critical Path Opportunities Report and List", no qual a metabolômica é destacada por exercer um papel significativo no desenvolvimento de biomarcadores, simplificando ensaios clínicos e definindo populações de risco.

Diversas patologias são estudadas utilizando a análise metabolômica, incluindo câncer (CHAN et al., 2015; XU et al., 2015; XIE et al., 2015), esquizofrenia, doença de Alzheimer (CHANG et al., 2015), Parkinson (LI et al., 2013), doença cardiovascular (SOININEN et al., 2015), doença renal (ZHANG et al., 2014), diabetes (WU et al., 2015) e asma (IBRAHIM et al., 2013). Estes estudos têm como objetivo compreender não só a patogênese da doença, mas também investigar a possibilidade de diagnóstico, prognóstico e novos alvos terapêuticos.

As aplicações da metabolômica compreendem todo o espectro de desenvolvimento farmacêutico, incluindo a descoberta de drogas alvo; de biomarcadores de segurança e eficácia clínica; mecanismos de ação da droga; validação de modelos experimentais pré-clínicos contra perfis de doenças humanas. Porém, é na área da toxicologia que exibe impacto significativo, fornecendo informações mais rápidas e reproduzíveis sobre o metabolismo de drogas e de toxicidade em fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico, em comparação com os métodos tradicionais (KUMAR et al., 2014). Os estudos nesta área envolvem por exemplo, a detecção do potencial de toxicidade com doses mais baixas, podendo também monitorar eventos precoces que antecedem a toxicidade evidente, prevendo os sinais detectados mais adiante por parâmetros convencionais; auxiliando na avaliação da segurança (MATTES et al., 2014).

Metabolômica também representa uma ferramenta de investigação para a botânica e taxonomia, proporcionando um método simples e rápido na discriminação de espécies vegetais (FREDERICH et al., 2009) e na análise de organismos geneticamente modificados, detectando diferenças entre o cultivar selvagem e o transgênico, tendo em vista que a inserção de genes pode provocar diversas modificações no perfil metabólico do vegetal (TYAGI, et al., 2010). Contribui de forma significativa para o estudo das respostas metabólicas de plantas ou

Melo, I. C. A. R

outros organismos as mudanças ambientais (ZHANG et al., 2011), por identificação de compostos diferentes; tais como subprodutos do estresse metabólico, moléculas de transdução de sinal do estresse ou moléculas que são parte da resposta de aclimação das plantas (SHULAEV et al., 2008). A metabolômica também pode ser utilizada para o entendimento da relação planta-patógeno, importante para estabelecer métodos eficazes no controle de pragas (LÓPEZ-GRESA et al., 2010).

Outro campo de atuação é na área nutricional, sendo possível avaliar as mudanças induzidas pela dieta na expressão gênica e, assim, ao modificar os nutrientes e biomoléculas assumidos na dieta, pode-se intervir na interação entre nutrientes e metabolismo humano, para alcançar e manter o melhor estado de saúde. Graças a metabolômica, parece ser possível avaliar o estado nutricional de um indivíduo para entender como um único nutriente influencia na regulação metabólica e, portanto, a formulação de dietas personalizadas que, se seguidas em uma idade precoce, pode prevenir o aparecimento de determinadas doenças crônicas (DESSÍ et al., 2014).

#### **2.4.2 Etapas da Análise Metabolômica**

A análise metabolômica de plantas ideal é aquela em que apenas um método de extração seja suficiente para extrair todos os metabólitos da planta, e, uma tecnologia que seja capaz de analisar todos metabólitos mesmo em baixas concentrações, quantificando-os, e fazendo uma integração das redes metabólicas, com as enzimas envolvidas no processo de biossíntese, permitindo visualizar os metabólitos formados e suprimidos em determinadas condições (CAPRINI, 2007). Entretanto estes métodos de extração e análise ideais raramente são possíveis em situações concretas. O processo consiste em três etapas distintas: preparo da amostra, aquisição de dados e análise dos dados, descritas a seguir.

##### **2.4.2.1 Preparo da Amostra**

O preparo da amostra de planta envolve mais outras três etapas: colheita, secagem e extração do material vegetal. A colheita do material vegetal requer cuidado especial, pois reações indesejáveis no conteúdo metabólito podem ocorrer durante o processo, devido à degradação enzimática ou oxidação. Por esta razão, a colheita deve ser conduzida de forma rápida e o material congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta, a fim de

cessar as reações metabólicas do organismo, sendo possível estudar posteriormente o metaboloma da planta daquele momento. O material congelado pode ser mantido em congelador durante semanas ou meses antes da extração (KIM; VERPOORT, 2010; KIM; CHOI; VERPOORT, 2010).

O processo de secagem mantém as amostras em ambiente seco, evitando a absorção de água que ativa reações enzimáticas e/ou degradação dos metabólitos lábeis, tais como compostos fosforilados (ROESSNER; BACIC, 2009). A liofilização é a técnica mais comum e adequada para a secagem do material vegetal, por ser considerada rápida, permitindo a análise simultânea de inúmeras amostras num período de 24-48 h e relativamente branda em comparação com outras técnicas que utilizam calor para evaporar e eliminar a água. Porém, somente as moléculas de água livre podem ser removidas. As moléculas de água firmemente ligadas, a exemplo do grupo hidroxila dos polissacarídeos, grupo carbonila e amino das proteínas, são mais difíceis de remover. Por liofilização, o material é primeiro congelado e em seguida, exposto a baixa pressão, de modo que a água que está no estado sólido, sublima, passando diretamente para a fase gasosa. Uma forma de melhorar a secagem é pulverizar a planta previamente com auxílio de nitrogênio líquido, o que aumenta a superfície de contato da amostra, melhorando a secagem e o rendimento da extração (KIM; VERPOORT, 2010).

Na extração, muitos fatores devem ser controlados para evitar variações experimentais, tais como a temperatura e o tempo de extração, que quanto maiores, maior também será o rendimento, porém há o risco de formação de artefatos. Outro fator é a razão entre a amostra e o solvente, que devem ser iguais no preparo de todas as amostras (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005). Como as plantas contêm uma ampla variedade de compostos com polaridades totalmente diferentes, nenhum método ou solvente de extração é capaz de detectar todos os metabólitos em uma única operação (VERPOORTE; CHOI; MUSTAFA, 2008).

A extração com ultrassom é o método mais comumente utilizado, por ser considerado muito simples, rápido e não apresentar limitações em relação à extração (KIM; VERPOORT, 2010). A técnica promove o intumescimento e a hidratação do material vegetal, o que leva à quebra das paredes celulares e o aumento da transferência de massa, resultando numa melhor eficiência de extração (VINATORU, 2001).

A escolha do solvente de extração deve levar em conta principalmente a sua polaridade, seletividade e toxicidade; além disso, devem satisfazer os requisitos específicos da



ferramenta analítica a ser adotada (MALTESE; KOOY; VERPOORTE, 2009). Ao utilizar solventes aquosos, é preconizado a adição de tampões, sendo o mais comum o tampão fosfato em pH 6,0. A prática evita a formação de artefatos durante a extração e possíveis alterações no tempo de retenção quando se usa cromatografia e no deslocamento químico dos sinais em espectroscopia de RMN. Pode-se usar solventes deuterados para a fase de extração quando a análise utilizar a espectroscopia de RMN, com a vantagem de permitir a medição dos extratos diretamente após a extração, sem qualquer necessidade de evaporação e reconstituição da amostra (KIM; VERPOORT, 2010; KIM; CHOI; VERPOORT, 2010).

#### **2.4.2.2 Aquisição de Dados**

Na etapa de aquisição dos dados uma variedade de tecnologias de análise podem ser empregadas, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, do inglês: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM), Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para se estabelecer como uma ferramenta adequada para obtenção do perfil metabólito, esta deve ser rápida, confiável, sensível e adequada para automação, bem como abranger um número significativo de metabólitos, pois nenhum dos métodos existentes são capazes de atingir a identificação e quantificação de todos os metabólitos num organismo. Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, porém a RMN e EM são consideradas as principais e as mais empregadas para a análise do metaboloma (FIEHN et al., 2000; VERPOORTE; CHOI; MUSTAFA, 2008).

Na CLAE-EM a seleção de compostos vem a partir de qualquer método de extração ou do tipo de coluna utilizada, permitindo a separação de muitos compostos por CLAE e subsequente análise por EM com ionização por eletrospray, que parece ser o detector mais adequado. Um problema da EM por eletrospray é a dificuldade de ionização de muitos compostos. Com o auxílio das recentes colunas de cromatografia líquida de ultra performance (CLUE) a resolução se torna cada vez melhor. No entanto, a obtenção dos perfis cromatográficos dependem frequentemente de comparações com compostos de referência. Muitas vezes, é possível identificar a classe de compostos a qual o metabólito pertence, mas não a sua exata identificação (MALONEY, 2004; ALLWOOD; GOODACRE, 2009).

A CG-EM mostra alta sensibilidade, resolução e um padrão reprodutível de fragmentação de moléculas que podem ser facilmente identificados por comparação com banco de dados. A desvantagem desta técnica é que os compostos submetidos a este procedimento precisam ser voláteis e estáveis durante a análise, uma vez que são submetidos a altas temperaturas. Métodos de derivação para tornar compostos mais voláteis são aplicados antes da análise, porém representa uma etapa a mais no preparo da amostra (SCHRIPSEMA, 2010).

Espectrometria de Massas representa uma ferramenta indispensável na metabolômica quando se pretende identificar novos biomarcadores. Apresenta sensibilidade muito alta, podendo identificar dezenas de compostos em uma única análise. No entanto, deve ser considerado que em EM, um único sinal  $MH^+$  indica a presença de um composto com uma fórmula molecular específica, mas a informação estrutural não é obtida, podendo existir muitos isômeros (ROBERTSON, 2005; SCHRIPSEMA, 2010).

Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica rápida, não-destrutiva, com reprodutibilidade elevada, que requer pouca preparação da amostra, diminuindo a chance de perda da amostra ou a introdução de variabilidade na preparação. Em espectroscopia de RMN, não existe qualquer processo de separação de analito envolvido, como é o caso das análises cromatográficas, o que pode constituir em uma desvantagem para amostras complexas como extratos vegetais com significativa sobreposição de sinais. Nestes casos, o assinalamento definitivo de sinais pode ser realizado muitas vezes apenas com o auxílio de técnicas de correlação homo e heteronucleares. Apresenta sensibilidade relativamente baixa, porém os dados fornecidos sobre o conteúdo estrutural dessas moléculas, a reprodutibilidade da análise e a quantificação da amostra são superiores a espectrometria de massas (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011; PIMENTA et al., 2013; TUGIZIMANA; PIATER; DUBERY, 2013).

Independentemente do custo associado à manutenção do equipamento, a utilização de RMN para identificar um grande volume de amostra de fármacos pode ser mais viável que a identificação por CLAE devido ao baixo custo na obtenção de um único espectro de hidrogênio, considerando os gastos com consumíveis e o curto tempo de aquisição requerido para registrar um espectro (PODGORSKII; MIKHALEV; KALABIN, 2011). Uma outra grande vantagem da análise por RMN é a facilidade de quantificação dos compostos uma vez que os sinais são proporcionais à sua concentração molar, refletindo os níveis reais dos metabólitos presentes na planta, sem a necessidade de curvas de calibração. Embora ainda

pouco explorada, a RMN quantitativa de Hidrogênio (RMNq- $^1\text{H}$ ), possui várias vantagens sobre as técnicas convencionais de quantificação, tais como: o padrão de referência não precisa ser estruturalmente relacionado ao analito de interesse, a preparação da amostra é relativamente simples e há possibilidade de identificar e quantificar várias substâncias simultaneamente em único espectro (GÖDECKE et al., 2012).

#### **2.4.2.3 Análise Multivariada dos Dados**

Qualquer que seja a técnica escolhida para a aquisição dos dados, esta irá originar uma quantidade enorme de informações que precisam ser processadas e interpretadas. Dessa forma, para lidar com o vasto conjunto de dados da metabolômica, é necessário utilizar a Análise Multivariada de Dados, que representa uma área relevante da estatística. Um dos objetivos desta análise é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilita a visualização de todo o conjunto de dados (PANERO et al., 2009).

Métodos de reconhecimento de padrões são utilizados para extrair informação e detectar tendências nos dados, baseados nas medidas multivariadas das amostras. Podem ser classificados em métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados ou exploratórios como, por exemplo, a análise de componentes principais (do inglês: Principal Component Analysis, PCA); ou métodos de reconhecimento de padrões supervisionados, como a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês: Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) (LYRA et al., 2010; SOUZA; POPPI, 2012).

Nos métodos não supervisionados, a separação de classes acontece sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras e visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. Por outro lado, nos métodos supervisionados, é necessário que exista alguma informação inicial sobre a identidade das amostras para a formação das classes e o objetivo é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras (SOUZA; POPPI, 2012).

PCA é uma técnica que reduz a dimensionalidade de dados multivariados, pois fornece um número reduzido de novas variáveis, que são obtidas a partir de correlação linear com as variáveis originais que possam descrever uma proporção significativa da variabilidade inerente às amostras, e, portanto reduzir o número de variáveis necessárias para descrever o conjunto de dados. Estas novas variáveis ortogonais, as componentes principais calculadas,

têm a propriedade de serem obtidas em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 fornece mais informação estatística (variância) que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim sucessivamente (KACHIGAN, 1991).

Em PCA, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados pela construção de gráficos de "scores" e "loadings", cujos eixos são as componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados. Os "scores" fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os "loadings" fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. O estudo do conjunto de "scores" e "loadings" permite ainda estimar a influência das variáveis em cada amostra (PANERO et al., 2009; WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001).

PLS é a análise multivariada que utiliza a informação do espectro como um todo para construir um modelo de regressão, relacionando à propriedade de interesse. O método não requer um conhecimento exato de todos os compostos presentes na amostra, podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes na construção do modelo. A construção de um modelo PLS utiliza as respostas analíticas, bem como as informações de interesse, para detectar a variância dos dados da matriz de dados independentes X e da matriz dependente Y, através de suas decomposições sucessivas e simultâneas, correlacionando-as. No modelo PLS, as variáveis perdem a ortogonalidade, não sendo mais componentes principais e sim variáveis latentes (VLs), levando a pequenas redundâncias de informação que otimizam a relação linear entre os "scores" (ROCHA, 2009; WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001).

# **Objetivos**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar a variação química quantitativa e qualitativa dos constituintes presentes nos extratos das folhas durante o desenvolvimento de *Cissampelos sympodialis* Eichler, e sua relação com o efeito espasmolítico *in vitro* sobre traqueia isolada de cobaia.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos das folhas de *C. sympodialis* coletadas em diferentes estágios do ciclo vegetativo da planta;
- Obter dados por espectroscopia de RMN e submetê-los a análises multivariadas no sentido de correlacionar o perfil químico dos extratos obtidos nos diferentes estágios do ciclo vegetativo com a atividade farmacológica;
- Identificar os metabólitos através de técnicas de  $^1\text{H}$ -RMN unidimensionais e técnicas de correlação homonucleares e heteronucleares bidimensionais;
- Quantificar os alcaloides warifteína e metilwarifteína nos extratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta;
- Determinar o teor de fenólicos totais dos extratos das folhas de *C. sympodialis*;
- Quantificar por RMNq- $^1\text{H}$  os compostos identificados no extratos das folhas de *C. sympodialis*;
- Determinar a eficácia e a potência relativas dos diferentes extratos das folhas de *C. sympodialis* em anéis de traqueia de cobaia;
- Estudar a correlação entre efeito espasmolítico e a concentração dos alcaloides warifteína e metilwarifteína e entre o teor de fenólicos nos extratos;
- Avaliar a correlação entre o índice pluviométrico e o teor de alcaloides.

# **Material e**

# **Métodos**

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Reagentes e Padrões

Os solventes grau HPLC trietilamina e metanol; os solventes deuterados:  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOD}$  e o padrão Ácido Trimetilsilil Propanóico- $\text{d}_4$  (TSP) foram fornecidos pela Tedia<sup>®</sup> (Tedia Brazil). O fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foi adquirido pela Dinâmica<sup>®</sup> e água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação Purelab Option-Q (Elga<sup>®</sup>). O reagente de Folin-Ciocalteu foi obtido da Fluka e o padrão de Ácido gálico da Sigma-Aldrich (EUA).

Os padrões de warifteína e metilwarifteína foram isolados a partir das raízes utilizando a marcha para isolamento de alcaloides com extração ácido-base, a partir do extrato hidroalcoólico de raízes de *C. sympodialis* (MUKHERJEE; KEIFER, 2003), seguido de purificação e identificação (MARINHO; BARBOSA-FILHO; OLIVEIRA, 2011).

Os reagentes e materiais utilizados nos ensaios farmacológicos foram os seguintes: cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ) adquiridos da Química Moderna. Cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) adquiridos da Vetec. Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) fornecido pela Fmaia. O  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) adquiridos da Nuclear (Brasil). A mistura carbogênica (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) foi adquirida da White Martins. O cloridrato de carbamilcolina (CCh) foi obtido da Merck (Brasil) e o ácido araquidônico e óleo de castor (Cremophor<sup>®</sup>) adquiridos da Sigma-Aldrich.

Utilizou-se solução de Krebs ( $\text{NaCl}$  118,0 mM,  $\text{KCl}$  4,55 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,70 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,10 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,52 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25,0 mM e glicose 11,0 mM) ajustada ao pH 7,4 com  $\text{HCl}$  ou  $\text{NaOH}$  1N. Todas as solução utilizadas em experimentos funcionais foram gaseificadas com carbogênio e mantidas a 37 °C.



## 4.2 Equipamentos

**Tabela 1-** Equipamentos utilizados.

Equipamento	Fabricante/Marca/Modelo
CLAE	Shimadzu <sup>®</sup> : detector UV
Liofilizador	Teroni <sup>®</sup> LS 3000 C
Ultrassom	Unique <sup>®</sup> (40 kHz)
Balança	Shimadzu <sup>®</sup> AW 220
Agitador/aquecedor	Fisatom <sup>®</sup> 752
Evaporador Rotatório	Buchi <sup>®</sup> RII
Centrífuga	IEC <sup>®</sup> Centra MP4R
Espectrômetro	Bruker Avance II 500
Espectrofotômetro	Elx808 Absorbance Microplate
pHmetro	Reader <sup>®</sup>
Transdutor de força	Gehaka
Bomba termostática	World Precision Instruments Vernon Hills
Amplificador	Modelo AECAD04F
Sistema de Aquisição	ANCAD

## 4.3 Material Vegetal e Colheita

As folhas de *C. sympodialis* foram coletadas de espécies cultivadas no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O voucher (AGRA 1476) da espécie foi depositado no Herbário Lauro Pires Xavier da UFPB. As seis amostras de folhas (Tabela 2) são referentes aos seis meses de coletas subsequentes, de março a agosto do ano de 2012, com

um intervalo de aproximadamente 30 dias entre cada coleta, representando o estágio de desenvolvimento do vegetal, desde 60 dias após o plantio, até a sua frutificação. As amostras originadas, foram nomeadas de acordo com o período em que o material vegetal foi coletado: CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> e CsF<sub>210</sub>

As colheitas foram realizadas entre os dias 23 a 27 de cada mês e entre 9 e 10 horas da manhã. Foram coletadas quinze folhas de cada oito indivíduos, compreendendo um total de aproximadamente 60 g de folhas, selecionadas de acordo com seu aspecto íntegro, tamanho médio a grande, de cor verde e textura espessa. As folhas muito jovens eram evitadas e os pecíolos descartados.

Os índices pluviométricos da cidade de João Pessoa foram registrados a cada mês de colheita com base nas informações fornecidas pela Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba (AESAs).

**Tabela 2-** Dados da colheita e material vegetal.

<b>AMOSTRA</b>	<b>PERÍODO DE COLHEITA</b>	<b>ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO (mm)*</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL VEGETAL</b>
CsF <sub>60</sub>	Março/2012	71,0	Folhas médias, jovens, de coloração verde claro, coletadas 60 dias após o plantio
CsF <sub>90</sub>	Abril/2012	46,6	Folhas médias, jovens, de coloração verde claro, coletadas 90 dias após o plantio
CsF <sub>120</sub>	Maior/2012	216,5	Folhas médias, jovens, de coloração verde claro, coletadas 120 dias após o plantio
CsF <sub>150</sub>	Junho /2012	540,7	Folhas maduras, medianas a grandes, de coloração verde escuro, coletadas 150 dias após o plantio.
CsF <sub>180</sub>	Julho/2012	290,5	Folhas grandes maduras de coloração verde escuro, coletadas 180 dias após o plantio. Presença de flores.
CsF <sub>210</sub>	Agosto/2012	81,1	Folhas grandes, maduras de coloração verde escuro, coletadas 210 dias após o plantio. Presença de frutos.

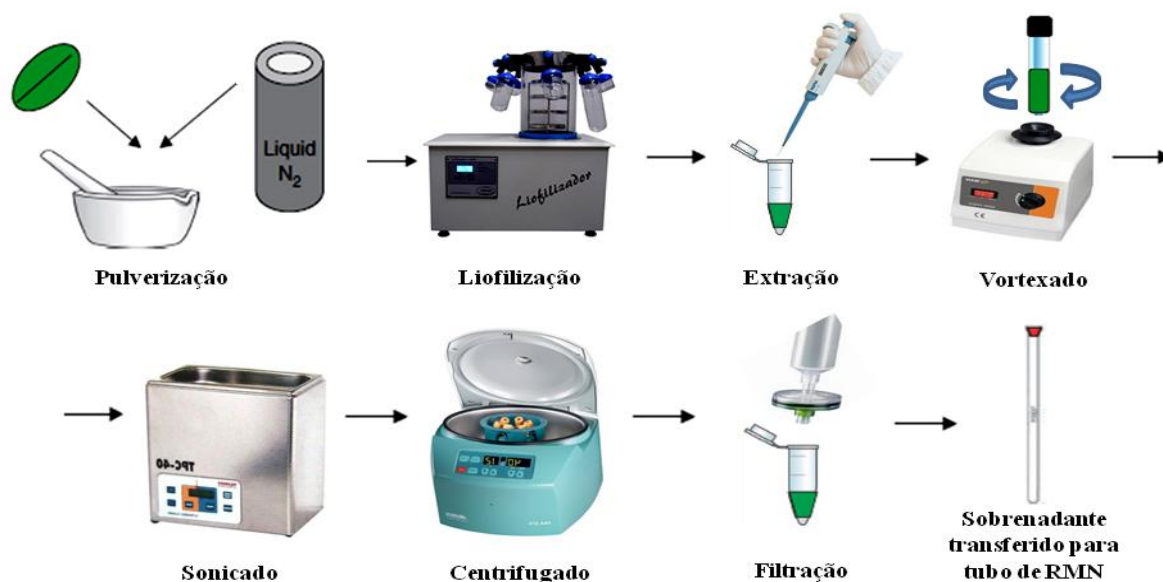
\* Fonte: AESA, 2012.

#### 4.4 Preparação dos Extratos

As folhas coletadas foram trituradas com nitrogênio líquido e liofilizadas. O material vegetal pulverizado (100 mg) foi agitado em vórtex por um minuto, com uma mistura de 750  $\mu\text{L}$  de metanol- $\text{d}_4$  e 750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (90 mM) em  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 6,0) contendo 0,1% do Ácido Trimetilsilil Propanóico (TSP). O pH foi ajustado usando NaOD (1,0 M). Em seguida, a dispersão foi sonicada por 20 minutos em banho de ultrassom e centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{L}$  do filtrado foi transferido para um tubo de RMN (Figura 7). O processo foi realizado em quintuplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras utilizadas nos ensaios farmacológicos, porém não se usou TSP e ao invés de solventes deuterados, foram utilizados solventes grau HPLC. O sobrenadante foi também filtrado, processado em evaporador rotatório e por fim, liofilizado, obtendo-se o extrato seco.

**Figura 7** - Esquema de preparação dos extratos



Adaptado de: KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010.

#### 4.5 Análise por RMN

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  foram obtidos em espectrômetro a 500 MHz para o canal de  $^1\text{H}$ , utilizando pré-saturação do sinal de água e 125 MHz para o canal de  $^{13}\text{C}$ .

Para atribuir os picos selecionados, foram aplicados métodos bidimensionais de RMN, tais como espectroscopia de correlação homonuclear  $^1\text{H}$   $^1\text{H}$  (COSY) e correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC). Os assinalamentos foram conferidos manualmente com os deslocamentos químicos reportados no Human Metabolome Database (HMD).

#### 4.6 Análise Multivariada

Foi realizada a correção da fase e linha de base dos espectros de  $^1\text{H}$  dos extratos das folhas obtidos a 500 MHz, utilizando o software MestreNova® (versão 6.1.0-6224). Em seguida, empregando-se o mesmo programa, referenciou-se os espectros pelo sinal do TSP em  $\delta$  0,00.

Para a análise de PCA, os dados espectrais foram reduzidos a regiões equidistantes com valor de 0,04 ppm, correspondendo à região de  $\delta$  -0,06 a 8,7 ppm, gerando uma matrix de 218 variáveis para cada espectro, que por sua vez, foram reduzidos a arquivos ASCII e os dados transferidos para o programa Excel, para uma melhor organização dos dados.

O mesmo tratamento foi utilizado na análise de PLS, originando 30 variáveis, compreendendo a região de  $\delta$  6,02 a 8,5 ppm. Porém para a construção do modelo PLS foi gerado uma matriz de dados independentes X formada pelos deslocamentos químicos dos espectros das amostras e uma matriz dependente Y formada pelos valores de  $\text{pCE}_{50}$  que representa o log inverso da  $\text{CE}_{50}$  expressa em mol/L.

Todos os dados foram normalizados pela área e métodos de reconhecimento de padrões não supervisionado (PCA) e supervisionado (PLS) foram aplicados por meio do Software The Unscrambler® versão 9.7.

## 4.7 RMN Quantitativo

A concentração absoluta dos compostos a partir dos dados de RMN- $^1\text{H}$ , foi determinada pela comparação da intensidade integrada das ressonâncias da amostra e um padrão de concentração conhecida, neste caso o TSP, e efetuado o cálculo descrito na Equação mostrada no Quadro 1. O método parte da premissa que a intensidade de um determinado sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos que o geraram, permitindo, assim, que a concentração de um analito X seja determinada pela área integrada desse sinal utilizando para tanto um padrão de referência (SANTOS; COLNAGO, 2013). Os requisitos para seleção dos sinais utilizados na quantificação foram: o sinal deveria estar separado dos demais sinais e ser tão simples quanto possível, ou seja, um singlete foi preferido a um multiplete.

**Quadro 1 - Equação da Quantificação Absoluta**

$$C_x = \frac{I_x \cdot C_{\text{TSP}} \cdot N_{\text{TSP}}}{I_{\text{TSP}} \cdot N_x}$$

Onde:  $C_x$  = Concentração do analito;  $I_x$  = área integrada do analito;  $C_{\text{TSP}}$  = Concentração do padrão interno;  $N_{\text{TSP}}$  = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância do padrão interno;  $I_{\text{TSP}}$  = área integrada do padrão interno;  $N_x$  = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância do analito.

## 4.8 Teor de Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nos seis extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. sympodialis* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-

Ciocalteu (WATERHOUSE, 2012), utilizando ácido gálico como o composto fenólico padrão.

Uma alíquota de 20 µL de cada extrato, preparado conforme descrito no item 4.4, foi transferida para um balão volumétrico. Adicionou-se 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1.58 µL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida a 765 nm utilizando-se cubetas de vidro. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de Fenólicos Totais foi determinado pela equação da regressão linear a partir da curva de calibração construída com soluções padrões de ácido gálico (100, 250, 500, 1000 e 1500 µg/mL) e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 miligramas de planta (mgEAG/100mg), considerando-se o erro padrão da média (e.p.m.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi:  $A = 0,0008274C - 0,0007594$ , com o coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9912$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico e  $A$  é a absorbância a 765 nm.

#### **4.9 Teor de warifteína e metilwarifteína**

A concentração dos alcaloides nos extratos foi determinada utilizando método (Tabela 3) através de CLAE-UV descrito e validado em estudo anterior (MARINHO; BARBOSA-FILHO; OLIVEIRA, 2011). Os extratos quantificados foram os mesmos utilizados nos experimentos para avaliação da atividade relaxante (Item 4.12). As amostras foram preparadas em triplicata na concentração de 1 mg/mL de extrato em H<sub>2</sub>O + trietilamina 0.01% : metanol (40:60 v/v), a solução foi filtrada em membrana de nylon 0,45 µm antes da análise de CLAE.

O teor de alcaloides foi determinado pela equação da regressão linear a partir da curva de calibração construída com soluções padrões de warfteína e metilwarfteína (2, 3, 10, 20, 30 µg/mL) e expresso em média ± desvio padrão. A equação da curva de calibração e coeficientes de correlação da warfteína e metilwarfteína foram respectivamente:  $A = 16040C + 23298$  e  $r^2 = 0,9967$ ;  $A = 16603C - 4751$  e  $r^2 = 0,9988$ , onde  $C$  é a concentração do alcaloide e  $A$  é a área do pico.

**Tabela 3** - Condições cromatográficas do método para quantificação de warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de *C. sympodialis*

Parâmetros	Especificações
Fase Estacionária	C <sub>18</sub> 250 x 4,6 mm (5µm)
Fase Móvel	Trietilamina 0,05% e metanol
Modo de Eluição	Gradiente
	0 - 5 minutos (60% metanol)
	5 - 15 minutos (72% metanol)
	15 - 25 minutos (80% metanol)
	25 - 30 minutos (60% metanol)
Tempo de Corrida	30 minutos
Comprimento de Onda	278 nm
Fluxo de Eluição	1mL/min
Volume de Injeção	50 µL
Temperatura	40 °C

Fonte: MARINHO; BARBOSA-FILHO; OLIVEIRA, 2011.

#### 4.10 Animais

Cobaias adultas (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g, foram obtidos do biotério Prof. Thomas George do IpeFarM/UFPB. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, mantidos à temperatura de  $21 \pm 1$  °C, submetidos a um ciclo claro escuro de 12 h. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados e realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IpeFarM/UFPB sob número de Protocolo 0705/12 (Anexo I).

#### 4.11 Preparação das Soluções-Estoques

Os extratos hidroalcóolicos das folhas de *C. sympodialis* foram solubilizados em Cremophor<sup>®</sup> (3% v/v) e diluídos em água destilada até a concentração de 10 mg/mL. A concentração final de Cremophor<sup>®</sup> nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v); nessa concentração, o Cremophor<sup>®</sup> é desprovido de efeito relaxante ou contrátil significativo em traqueia de cobaia, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas da UFPB (dados não mostrados). A partir das soluções padrão na concentração de 10 mg/mL, foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 1 mg/mL e 0,1 mg/mL.

#### 4.12 Avaliação da Atividade Relaxante dos Extratos em Traqueia Isolada de Cobaia

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido de secção dos vasos cervicais. A traqueia foi removida e limpa de todo o tecido conectivo e adiposo e dividida em segmentos contendo 3-4 anéis de cartilagem. Os segmentos foram suspensos em cubas de banho para órgão isolado contendo solução de Krebs a 37 °C, gaseificado com mistura carbogênica, pH 7,4 e período de estabilização de 1 h, sendo a solução trocada a cada 15 min. As contrações isométricas foram registradas por um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição digital (ANCAD, AVS Projetos, São Paulo, SP, Brasil). Após o período de estabilização (Figura 8), uma primeira contração foi induzida pela adição de  $10^{-6}$  M de carbacol (CCh) à cuba. As preparações foram obtidas na ausência e na presença de epitélio, afim de verificar a integridade do tecido. Sendo o mesmo removido através do atrito do lúmen do órgão com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs.

A integridade do epitélio da traqueia foi analisada pela adição de  $10^{-4}$  M de ácido araquidônico (AA) à cuba durante a fase tônica da resposta induzida por CCh, sendo os anéis que obtiveram relaxamento igual ou superior a 50% (em relação à força de contração inicial) considerados com epitélio e os que obtiveram relaxamento igual ou inferior a 10% considerados sem epitélio (TSCHIRHART et al., 1987).

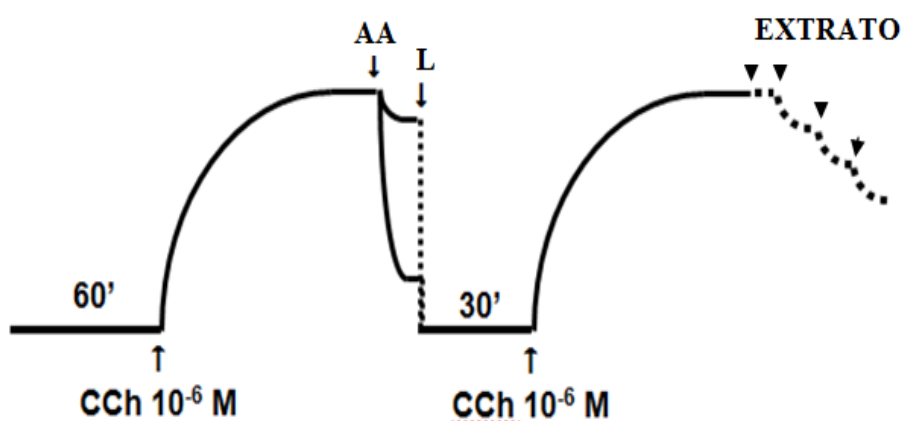
Após a verificação do epitélio, as preparações eram lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs durante um período de 30 minutos. Em seguida, uma nova contração com  $10^{-6}$  M de CCh era induzida e as soluções preparadas a partir dos extratos das folhas de *C.*



*sympodialis* (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> e CsF<sub>210</sub>) eram adicionadas de maneira cumulativa à cuba (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 e 1000 µg/mL).

O relaxamento produzido pelos extratos foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh. Os valores de CE<sub>50</sub> foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais da CE<sub>50</sub>, calculados pelo uso de regressão não linear (NEUBIG et al., 2003). Os valores de efeito máximo (E<sub>max</sub>) foram obtidos pela média das porcentagens máximas de relaxamento.

**Figura 8** - Protocolo experimental para avaliação da atividade relaxante.



AA = ácido araquidônico, CCh = carbacol, L = lavagem.

#### 4.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) ou média  $\pm$  desvio padrão e analisados estatisticamente empregando-se o teste t, para comparação entre dois grupos, ou a análise de variância (ANOVA) one-way seguido do pós-teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados de quantificação, da atividade farmacológica e correlação foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, U.S.A.).

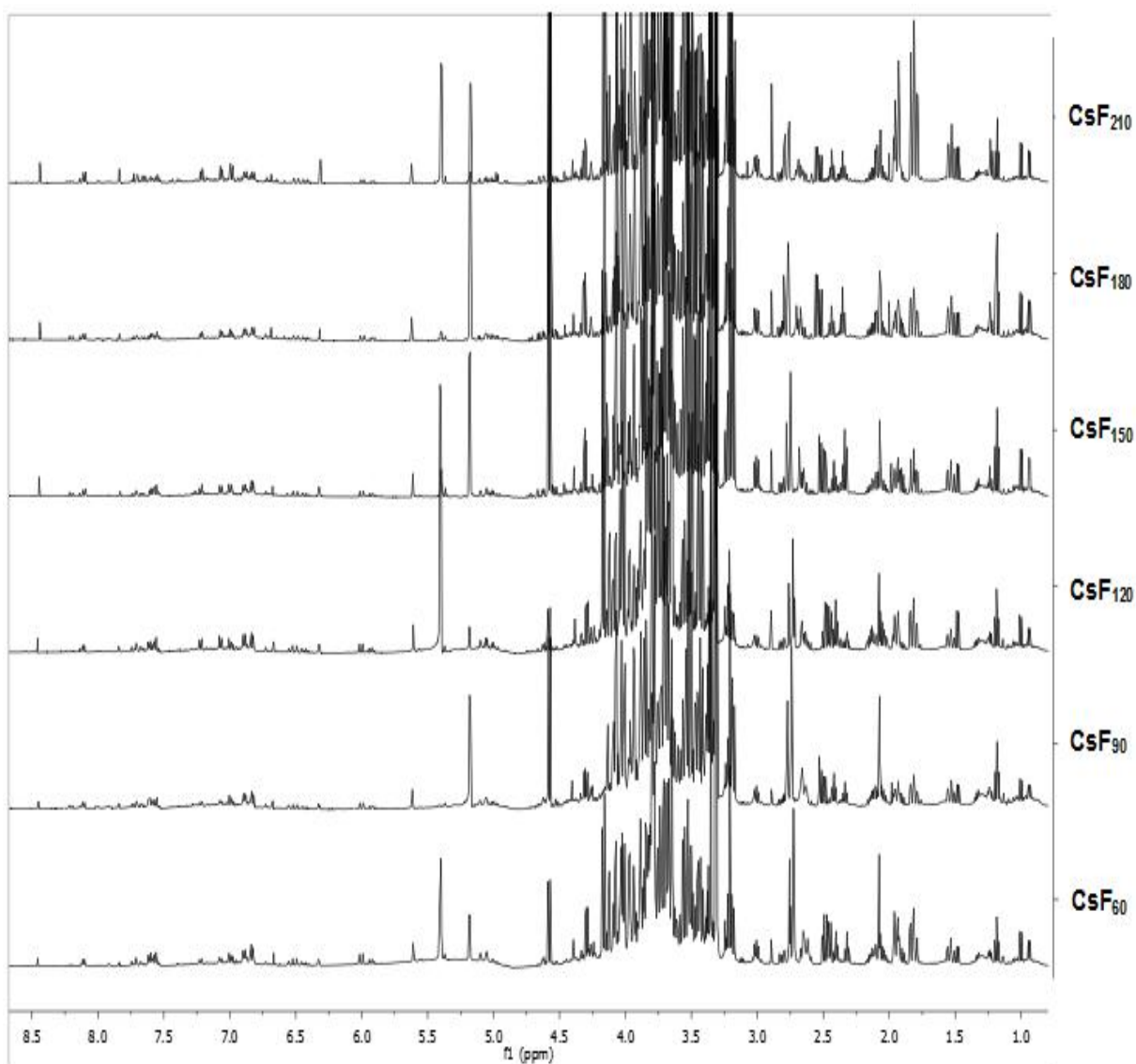
# **Resultados**

## 5 Resultados

### 5.1 Perfil Metabólico de *Cissampelos sympodialis*

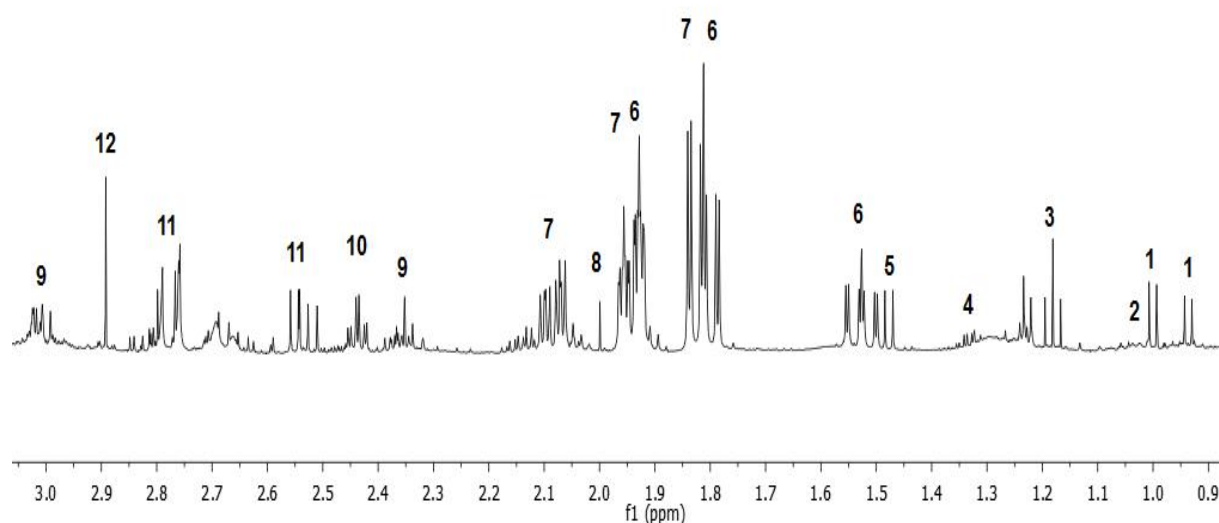
O perfil metabólico dos extratos hidroalcoólicos de *C. sympodialis* oriundos das seis colheitas de folhas que representam o ciclo vegetativo da planta, foram obtidos em quintuplicatas por meio de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 9).

**Figura 9** - Sobreposição de espectros de RMN- $^1\text{H}$  das amostras de folhas que representam o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>) de *C. sympodialis*.



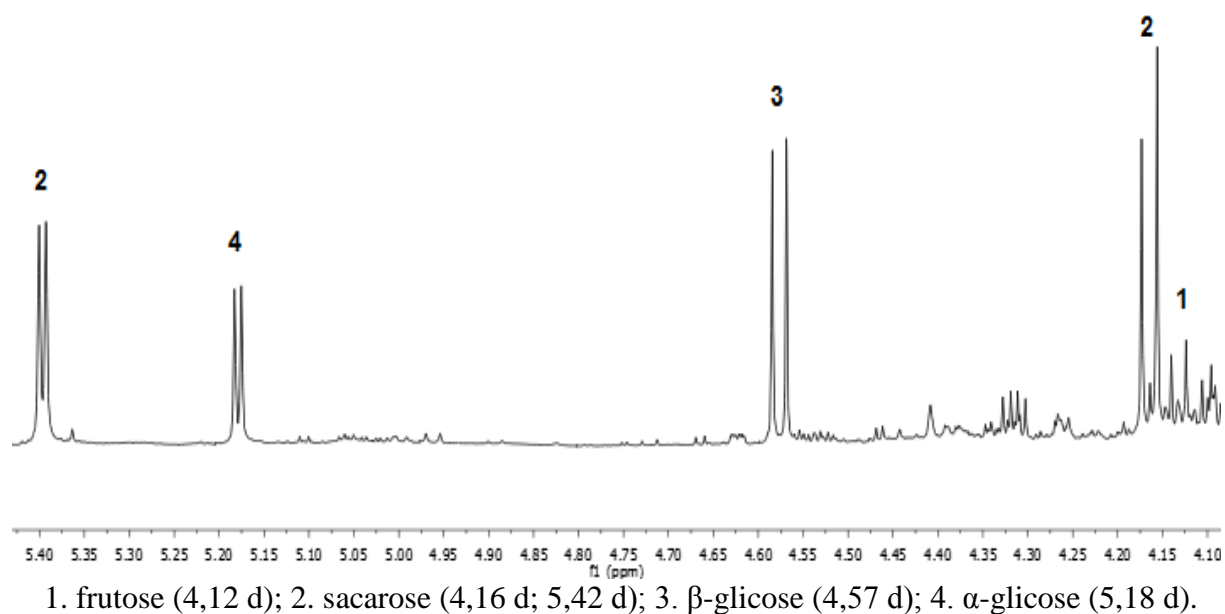
A análise visual dos espectros permitiu a identificação simultânea de diversos metabólitos presentes em todas as amostras, assinalados nas expansões dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H (Figuras 10 a 12). Sinais de vários aminoácidos, álcoois, aminas e ácidos orgânicos podem ser observados entre 0,9 e 3,0 ppm. Sinais entre  $\delta_H$  2,00 e 1,50 ppm que sugerem a presença de unidades derivadas do ácido quínico, também foram identificados nas folhas da espécie (Figura 10). Sinais característicos de açúcares são observados entre 4,1 e 5,4 ppm, revelando a presença de sacarose, glicose e frutose (Figura 11). Na região de aromáticos entre  $\delta_H$  6,00 e 8,5 ppm, destaca-se a presença dos derivados dos flavonóis quercetina e caempferol; além da tirosina, um aminoácido com cadeia lateral aromática e do ácido fórmico (Figura 12).

**Figura 10** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  0,9 a 3,00 ppm) das amostras de folhas de *C. sympodialis*.

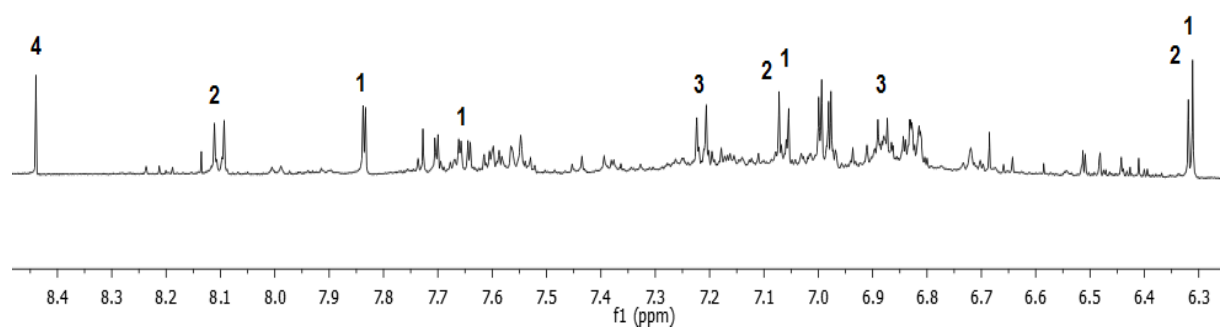


1. leucina (0,94 d; 1,0 d), 2. valina (1,05 d), 3. etanol (1,18 t); 4. treonina (1,34 d); 5. alanina (1,48 d), 6. derivado ácido quínico (1,53 m; 1,82 dd; 1,94 dddd), 7. ácido quínico (1,82 dd; 1,94 dddd; 2,10 m); 8. ácido acético (1,98 s); 9. ácido  $\gamma$ -aminobutírico (2,35 dd, 3,01m); 10. glutamina (2,42 m); 11. ácido málico (2,55 dd; 2,75 dd), 12. dietilamina (2,89 s).

**Figura 11** - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$  4,1 a 5,41 ppm) das amostras de folhas de *C. sympodialis*.



**Figura 12** - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$  6,3 a 8,5 ppm) das amostras de folhas de *C. sympodialis*.

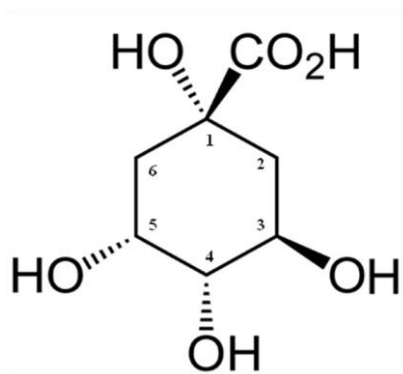


As atribuições dos diversos compostos (Tabela 4) foram confirmadas através da aquisição de espectros de correlação homonuclear e heteronuclear de RMN e da comparação com banco de dados.

A presença do esqueleto básico do ácido quínico (Figura 13) foi atribuída aos sinais de hidrogênios metilênicos  $\delta_H$  1,82 (dd), 1,94 (dddd) e 2,10 (m). O espectro homonuclear COSY mostrou a correlação dos hidrogênios metilênicos com os hidrogênios dos carbonos hidroxilados em  $\delta_H$  3,78 e 4,0. O espectro heteronuclear HMBC indica a correlação a três ligações entre os sinais  $\delta_H$  1,94 e 2,10 com o sinal em 180 ppm, característico de carbonila de ácido carboxílico, além da correlação dos hidrogênios metilênicos a duas e três ligações com os carbonos ligados a hidroxila entre 69 e 75 ppm.

Os sinais em  $\delta_H$  1,82 e 1,94 apresentaram integral com proporção 2:1 quando comparado ao sinal em  $\delta_H$  2,10, o que fez sugerir a existência de um derivado do ácido quínico. Esta suposição foi confirmada, devido a correlação COSY entre o sinal  $\delta_H$  1,53 (m) e os hidrogênios dos carbonos hidroxilados  $\delta_H$  3,78 e 4,0, indicando que existe uma substituição próxima aos C-2 e C-6. No espectro HMBC, foi observada uma correlação entre  $\delta_H$  1,53 com o sinal em 175 ppm, o que permitiu propor que a substituição ocorreu na hidroxila ligada a carbonila de ácido.

**Figura 13** - Estrutura do ácido quínico.



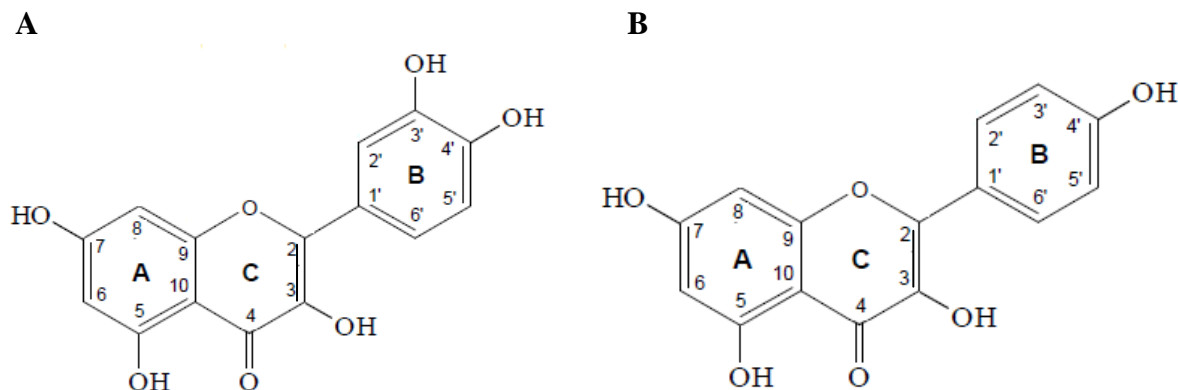
Os carboidratos foram identificados devido à presença dos hidrogênios anoméricos (Figura 11) da molécula da frutose  $\delta_H$  4,12 (d),  $\beta$ -Glicose  $\delta_H$  4,57 (d),  $\alpha$ -Glicose  $\delta_H$  5,18 (d) e sacarose  $\delta_H$  5,41 (d), onde o espectro HMBC confirmou as correlações com os carbonos anoméricos em  $\delta_C$  99, 97, 93 e 102 respectivamente (Figura 16).

O espectro de RMN  $^1H$  mostrou sinais correspondentes ao sistema ABX de anel B de flavonoide, indicados pelo duplo duplete em  $\delta_H$  7,66 ( $J = 8,5, 2,5$  Hz) acoplando *orto* em  $\delta_H$  7,06 (d,  $J = 8,5$  Hz) e *meta* em  $\delta_H$  7,84 (d,  $J = 2,5$  Hz) e dois singletos largos em  $\delta_H$  6,31 e 6,32 atribuídos ao anel A de flavonoide com padrão de substituição 5 e 7. O espectro de COSY confirmou a relação do  $H6' = 7,66$  ppm com  $H5' = 7,06$  e  $H2' = 7,84$  ppm, além da correlação HMBC a três ligações, referente ao  $H6' = 7,66$  ppm com  $C4' = 148$ . Os assinalamentos são sugestivos da presença de um derivado do flavonol quercetina (Figura 14).

Também foi observado no espectro de RMN  $^1H$  deslocamentos químicos compatíveis com estruturas que apresentam um núcleo flavonoídico: dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando *orto* em  $\delta_H$  8,10 ( $J = 8,5$  Hz) e 7,06 ( $J = 8,5$  Hz), evidenciando a presença de um sistema AA'BB' do anel B de flavonoide. Ao anel A atribui-se os sinais em  $\delta_H$  6,31 (sl) e 6,32 (sl) com padrão de substituição 5 e 7. A correlação entre os dupletos do anel B foi observada através do espectro COSY, permitindo sugerir que se trata de um derivado do caempferol (Figura 14).

Para os demais compostos podem ser observadas os assinalamentos na Tabela 4 e suas correlações nos espectros bidimensionais (Figuras 15 e 16).

**Figura 14** - Estrutura dos flavonóis: **A.** quercetina; **B.** caempferol

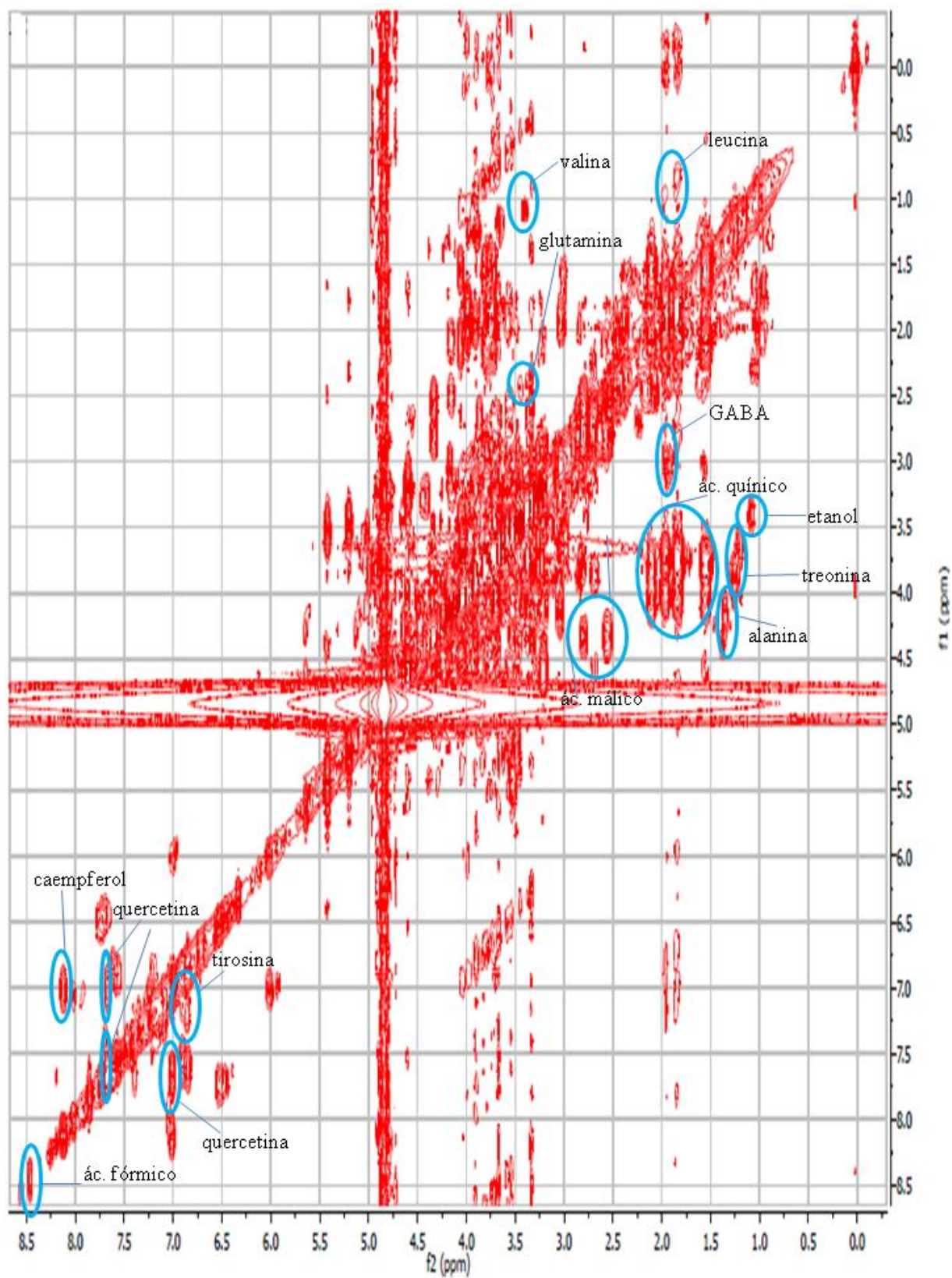


**Tabela 4** - Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ ) e as constantes de acoplamento (Hz) detectadas a partir de espectros de RMN 1D e 2D em 50% de MeOH-d<sub>4</sub> em D<sub>2</sub>O (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampão pH 6,0).

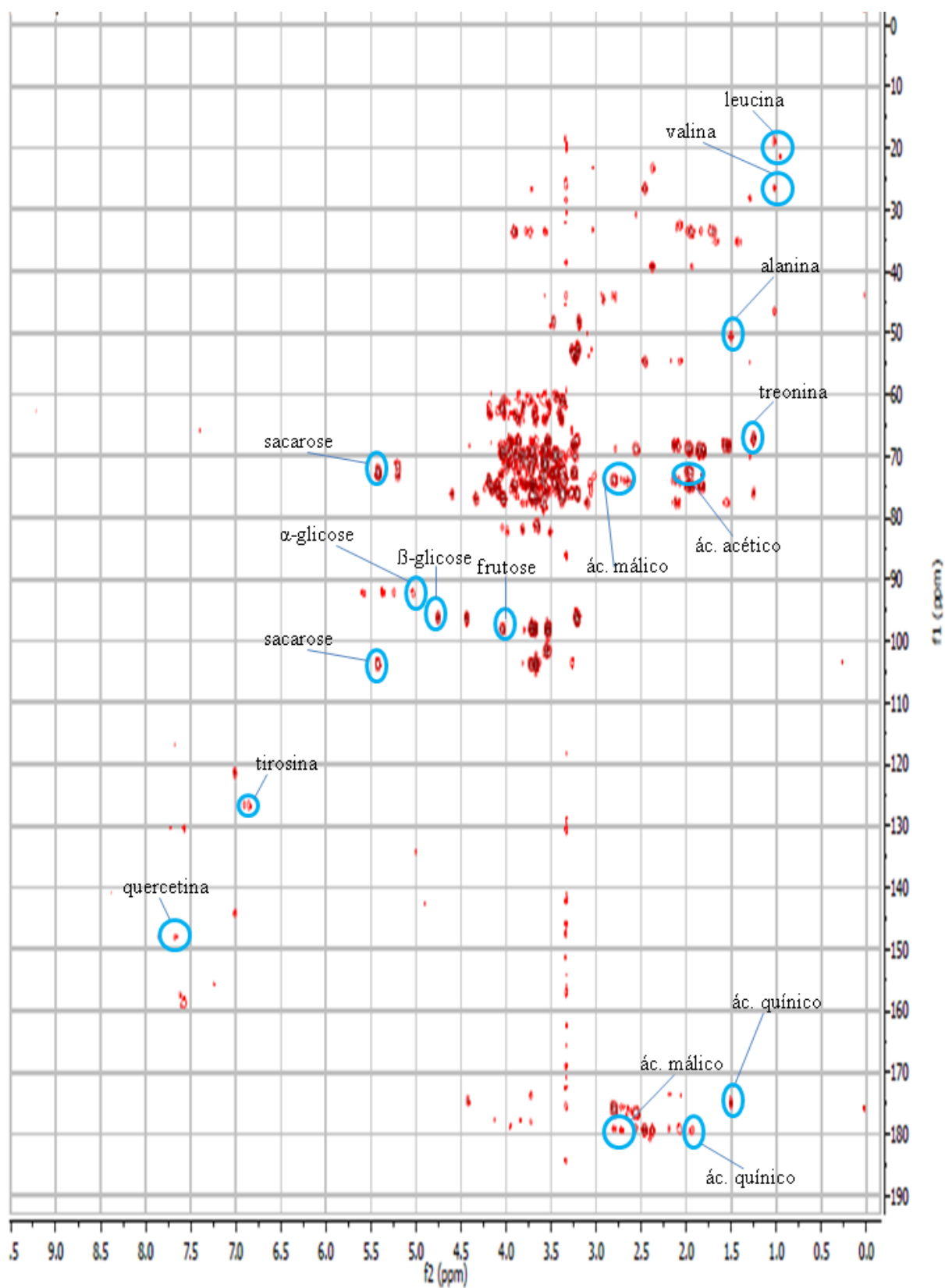
Metabólitos	Deslocamentos químicos (ppm) e Constantes de acoplamento (Hz)
alanina	1,48 (d)
valina	1,01 (d); 1,06 (d)
leucina	0,94 (d, $J = 5$ Hz), 1,0 (d, $J = 5$ Hz)
treonina	1,34 (d)
glutamina	2,09 (m); 2,42 (m)
tirosina	6,88 (d, $J = 8,5$ Hz); 7,22 (d, $J = 8,5$ Hz)
GABA	1,93 (m); 2,35 (dd); 3,01(m)
dimetilamina	2,89 (s)
ácido quínico	1,82 (dd, $J = 3,0; 11,5$ ); 1,94 (dddd) e 2,10 (m).
ácido quínico derivado	1,53 (m); 1,82 (dd, $J = 3,0; 11,5$ ); 1,94 (dddd)
$\alpha$ -glicose	5,18 (d)
$\beta$ -glicose	4,57 (d)
frutose	4,12 (d)
sacarose	4,16 (d); 5,42 (d);
ácido acético	1,98 (s)
ácido fórmico	8,45 (s)
ácido málico	2,55 (dd); 2,75 (dd); 4,31 (dd)
etanol	1.18 (t)
Derivado caempferol	6,31 (sl); 6,32 (sl); 7,06 (d, $J = 8,5$ Hz); 8,10 (d, $J = 8,5$ Hz)
Derivado quercetina	6,31 (sl); 6,32 (sl); 7,66 (dd, $J = 8,5, 2,5$ Hz) 7,06 (d, $J = 8,5$ Hz); 7,84 (d, $J = 2,5$ Hz)



**Figura 15** - Espectro COSY (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) obtido da amostra CsF<sub>210</sub>.



**Figura 16** - Espectro HMBC (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) obtido da amostra CsF<sub>210</sub>.



## 5.2 Quantificação dos Compostos Identificados

A concentração absoluta das substâncias foram determinadas utilizando RMNq-<sup>1</sup>H pela comparação do padrão TSP com concentração conhecida e a intensidade integrada das ressonâncias da amostra (Tabela 5).

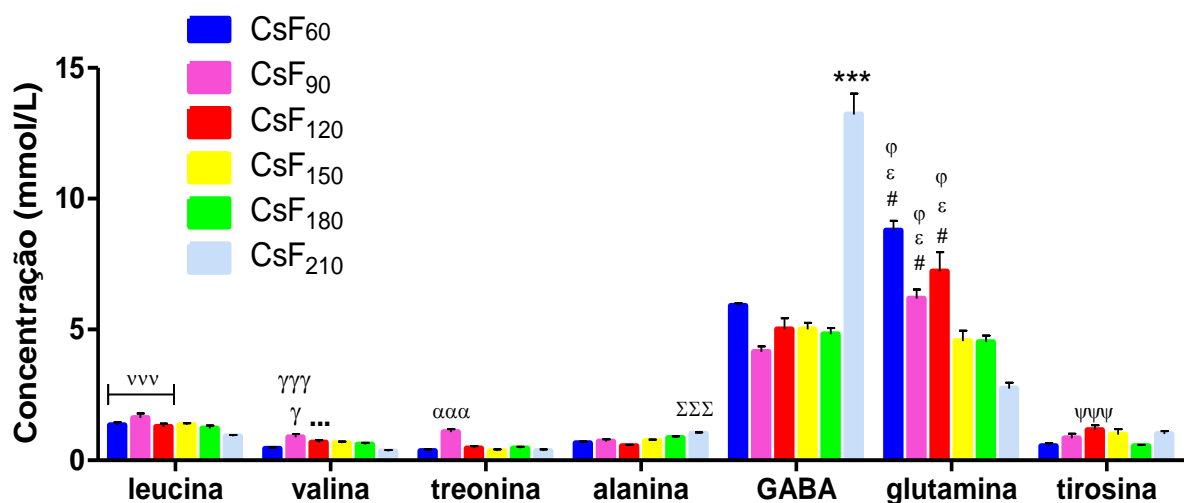
**Tabela 5** - Concentração (mmol/L) média  $\pm$  desvio padrão (n=5) dos metabólitos identificados nas folhas de *Cissampelos sympodialis*.

Metabólitos	Extratos das Folhas					
	CsF <sub>60</sub>	CsF <sub>90</sub>	CsF <sub>120</sub>	CsF <sub>150</sub>	CsF <sub>180</sub>	CsF <sub>210</sub>
alanina	0,7 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,04	1,0 $\pm$ 0,05
valina	0,4 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0,06	0,6 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,02
leucina	1,3 $\pm$ 0,11	1,6 $\pm$ 0,16	1,3 $\pm$ 0,10	1,4 $\pm$ 0,08	1,2 $\pm$ 0,10	0,9 $\pm$ 0,04
tirosina	0,6 $\pm$ 0,09	0,9 $\pm$ 0,06	1,2 $\pm$ 0,17	0,9 $\pm$ 0,11	0,5 $\pm$ 0,05	1,0 $\pm$ 0,10
GABA	5,9 $\pm$ 0,10	4,2 $\pm$ 0,23	5,1 $\pm$ 0,43	5,1 $\pm$ 0,25	4,8 $\pm$ 0,22	13,2 $\pm$ 0,79
treonina	0,4 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,09	0,5 $\pm$ 0,08	0,4 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,05
glutamina	8,8 $\pm$ 0,34	6,2 $\pm$ 0,34	7,3 $\pm$ 0,74	4,6 $\pm$ 0,37	4,5 $\pm$ 0,24	2,7 $\pm$ 0,22
$\alpha$ -glicose	7,3 $\pm$ 0,35	11,5 $\pm$ 0,61	2,6 $\pm$ 0,34	11,4 $\pm$ 0,74	15,9 $\pm$ 0,59	9,0 $\pm$ 0,74
$\beta$ -glicose	8,5 $\pm$ 0,20	20,9 $\pm$ 0,33	3,2 $\pm$ 0,24	20,6 $\pm$ 0,29	23,0 $\pm$ 0,73	12,7 $\pm$ 0,63
frutose	9,7 $\pm$ 0,52	10,7 $\pm$ 0,70	9,5 $\pm$ 0,86	6,3 $\pm$ 0,70	1,0 $\pm$ 0,10	7,5 $\pm$ 0,93
sacarose	17,7 $\pm$ 0,77	0,3 $\pm$ 0,16	36,5 $\pm$ 1,2	4,4 $\pm$ 0,59	0,6 $\pm$ 0,04	13,9 $\pm$ 0,91
ácido acético	0,1 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,07	0,1 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,05	0,2 $\pm$ 0,17	0,2 $\pm$ 0,03
ácido fórmico	0,2 $\pm$ 0,06	0,3 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,03
ácido málico	22,0 $\pm$ 0,82	18,1 $\pm$ 1,05	10,2 $\pm$ 0,78	11,1 $\pm$ 0,97	11,3 $\pm$ 1,40	4,9 $\pm$ 0,64
quercetina	0,1 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,08	0,2 $\pm$ 0,09	1,0 $\pm$ 0,12
caempferol	0,4 $\pm$ 0,12	1,0 $\pm$ 0,30	0,7 $\pm$ 0,24	0,8 $\pm$ 0,20	0,3 $\pm$ 0,05	1,0 $\pm$ 0,16
etanol	1,5 $\pm$ 0,13	3,3 $\pm$ 0,21	2,2 $\pm$ 0,10	2,1 $\pm$ 0,17	1,5 $\pm$ 0,15	1,4 $\pm$ 0,05
dimetilamina	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,05
ác. quínico	15,7 $\pm$ 0,05	10,2 $\pm$ 0,09	13,9 $\pm$ 0,07	11,3 $\pm$ 0,08	11,9 $\pm$ 0,09	35,2 $\pm$ 0,28
ác. quínico deriv.	8,3 $\pm$ 0,08	9,5 $\pm$ 0,07	7,7 $\pm$ 0,09	9,6 $\pm$ 0,06	10,5 $\pm$ 0,07	12,5 $\pm$ 0,12

Os metabólitos foram agrupados por classe e seus teores calculados a cada 30 dias, representados em gráficos de barra, expressos como a média e comparados estatisticamente.

Os teores de aminoácidos (Gráfico 1) são maiores nas folhas jovens, ou seja, até 120 dias após o plantio. Se comportam desta forma os aminoácidos leucina, valina, treonina, glutamina e tirosina. Os teores de tirosina sofreram flutuações durante o ciclo, apresentando elevação dos seus níveis até 150 dias após o plantio, seguido de redução e recuperação dos teores no período da frutificação (CsF<sub>210</sub>). Por outro lado, a alanina exibiu maiores teores entre 150 e 210 dias após o plantio, com níveis significativamente maiores para CsF<sub>210</sub> ( $C = 1,0 \text{ mmol/L} \pm 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). O Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) demonstrou de forma significativa, maior concentração na amostra CsF<sub>210</sub> ( $C = 13,2 \text{ mmol/L} \pm 0,79$ ,  $p < 0,001$ ) e parece ser de forma geral, o aminoácido mais abundante nas folhas da espécie.

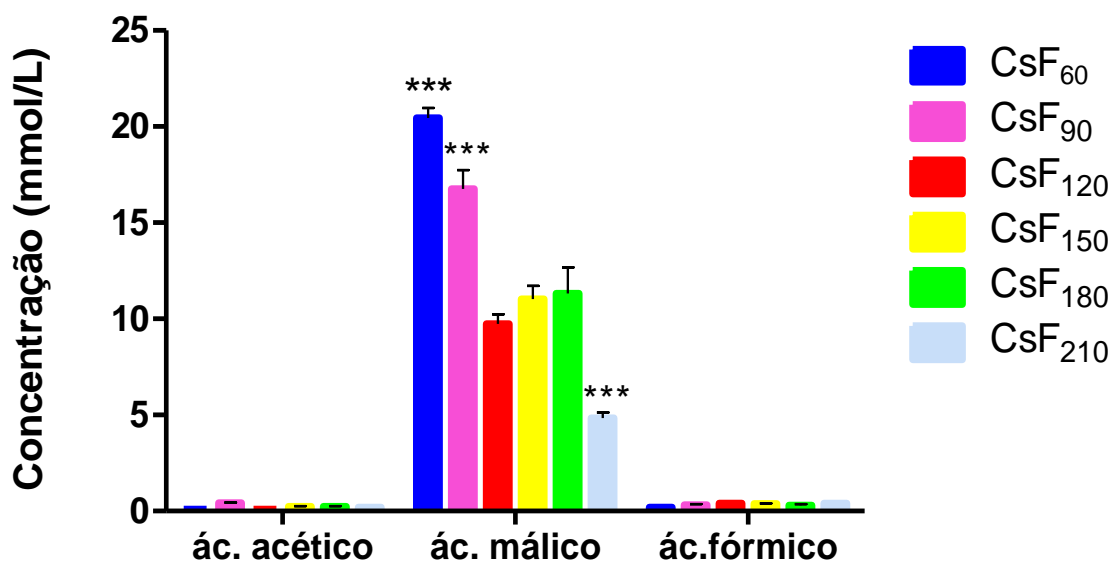
**Gráfico 1** -Teor de aminoácidos identificados nos extratos das folhas de *C. sympodialis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente ( $n = 5$ ). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni.  $vvv$   $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>210</sub>);  $\gamma$   $p < 0,05$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>150</sub>);  $\gamma\gamma\gamma$   $p < 0,001$  (CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub>);  $\gamma\gamma\gamma$   $p < 0,001$  (CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>210</sub>);  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0,001$  (CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub>),  $\Sigma\Sigma\Sigma$   $p < 0,001$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>);  $***$   $p < 0,001$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>);  $\phi$   $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>150</sub> ou CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>150</sub>);  $\epsilon$   $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub> ou CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>180</sub>);  $\phi$   $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub> ou CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>210</sub>);  $\psi\psi\psi$   $p < 0,001$  (CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>180</sub>).

Em relação aos ácidos orgânicos (Gráfico 2), não houve diferenças significantes entre as amostras para o ácido acético e ácido fórmico, ou seja, estas substâncias se mantiveram constantes e em baixa concentração nas amostras de folhas durante o ciclo de desenvolvimento da planta. Em contrapartida, os teores de ácido málico se mostraram significativamente elevados no início do estágio vegetativo, para CsF<sub>60</sub> (C = 22,0 mmol/L,  $\pm 0,82$   $p < 0,001$ ) e CsF<sub>90</sub> (C = 18,1 mmol/L  $\pm 1,05$ ,  $p < 0,001$ ), seguido de um declínio também significativo de sua concentração na amostra CsF<sub>210</sub> (C = 4,9 mmol/L  $\pm 0,64$ ,  $p < 0,001$ ).

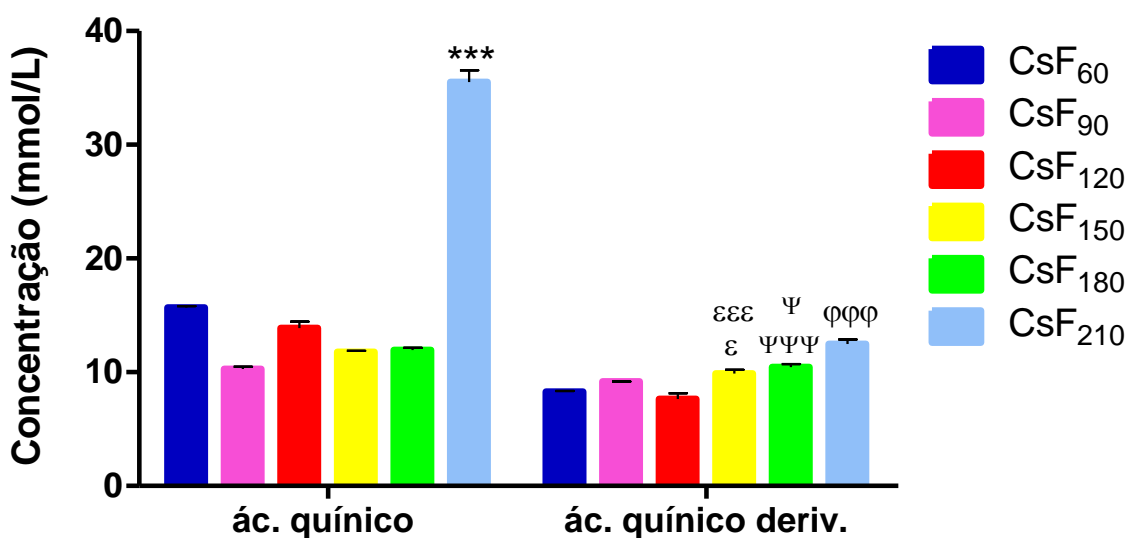
**Gráfico 2** - Teor de ácidos orgânicos identificados nos extratos das folhas de *C. sympodialis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente (n = 5). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub> ou CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub> ou CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>).

De acordo com o Gráfico 3, maiores teores do ácido quínico foram detectados na amostra CsF<sub>210</sub> ( $C = 35,2 \pm 0,28$  mmol/L,  $p < 0,001$ ), que apresenta significativamente maior concentração quando comparado as demais amostras. Para o derivado do ácido quínico são encontrados maiores níveis no segundo trimestre de desenvolvimento do vegetal, ou seja, nas amostras CsF<sub>150</sub> ( $C = 9,6 \pm 0,06$  mmol/L), CsF<sub>180</sub> ( $C = 10,5 \pm 0,07$  mmol/L) e CsF<sub>210</sub> ( $C = 12,5 \pm 0,12$  mmol/L).

**Gráfico 3** - Teor de compostos derivados do ácido quínico identificados nos extratos das folhas de *C. spodioidalis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



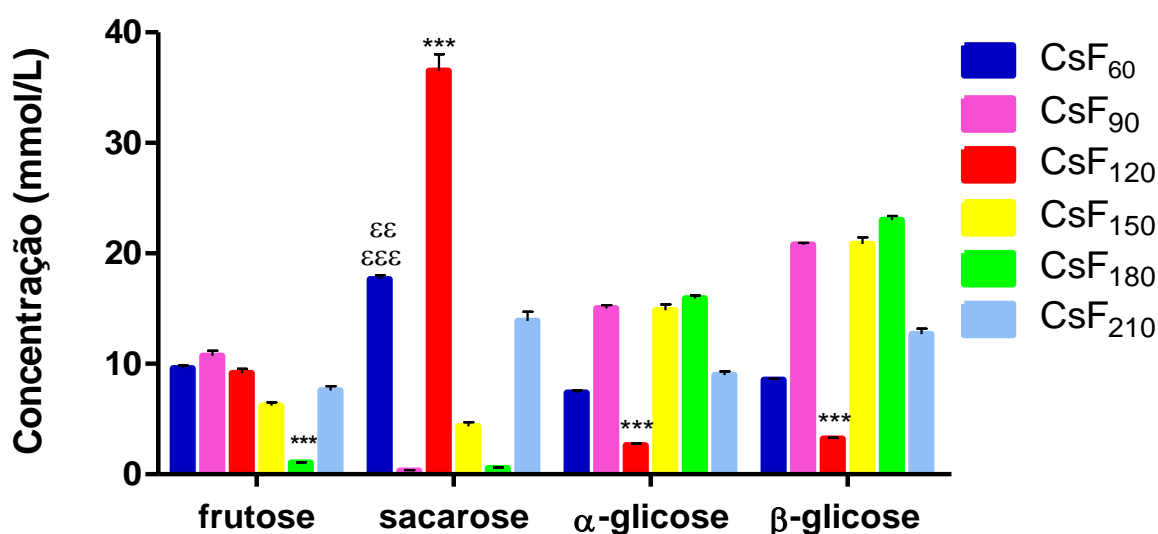
As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente ( $n = 5$ ). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>);  $^{\epsilon}p < 0,05$  (CsF<sub>150</sub> vs CsF<sub>60</sub>);  $^{\epsilon\epsilon\epsilon}p < 0,001$  (CsF<sub>150</sub> vs CsF<sub>120</sub>);  $^{\Psi\P\P}p < 0,001$  (CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>120</sub>);  $^{\Psi}p < 0,05$  (CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>90</sub>);  $^{\phi\phi\phi}p < 0,001$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>).

Os carboidratos são a classe de compostos de maior concentração nos extratos, sendo possível observar diferenças entre as amostras (Gráfico 4) como por exemplo, os níveis de frutose permaneceram constantes nos três primeiros meses (CsF<sub>60</sub>,  $C = 9,7 \pm 0,52$  mmol/L; CsF<sub>90</sub>,  $C = 10,7 \pm 0,70$  mmol/L; CsF<sub>120</sub>,  $C = 9,5 \pm 0,86$  mmol/L), seguido de um declínio significativo (CsF<sub>180</sub>,  $C = 1,0 \pm 0,10$  mol/L, \*\*\* $p < 0,001$ ), recuperando seus níveis no período

da frutificação (CsF<sub>210</sub>, C = 7,5 ± 0,93 mol/L). A sacarose, apresentou flutuações em sua intensidade durante todo o ciclo, porém com maior concentração na amostra CsF<sub>120</sub> (C = 36,5 ± 1,2 mmol/L, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Os níveis de  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose também apresentaram flutuações, porém com perfis semelhantes entre si, aumentando suas concentrações nas amostras CsF<sub>90</sub> (C = 11,5 ± 0,61 e 20,9 ± 0,33 mmol/L), CsF<sub>150</sub> (C = 11,4 ± 0,74 e 20,6 ± 0,29 mmol/L) e CsF<sub>180</sub> (C = 15,9 ± 0,59 e 23,0 ± 0,73 mmol/L) respectivamente, e reduzindo significativamente na amostra CsF<sub>120</sub> (C = 2,6 ± 0,74 e 3,2 ± 0,63 mmol/L).

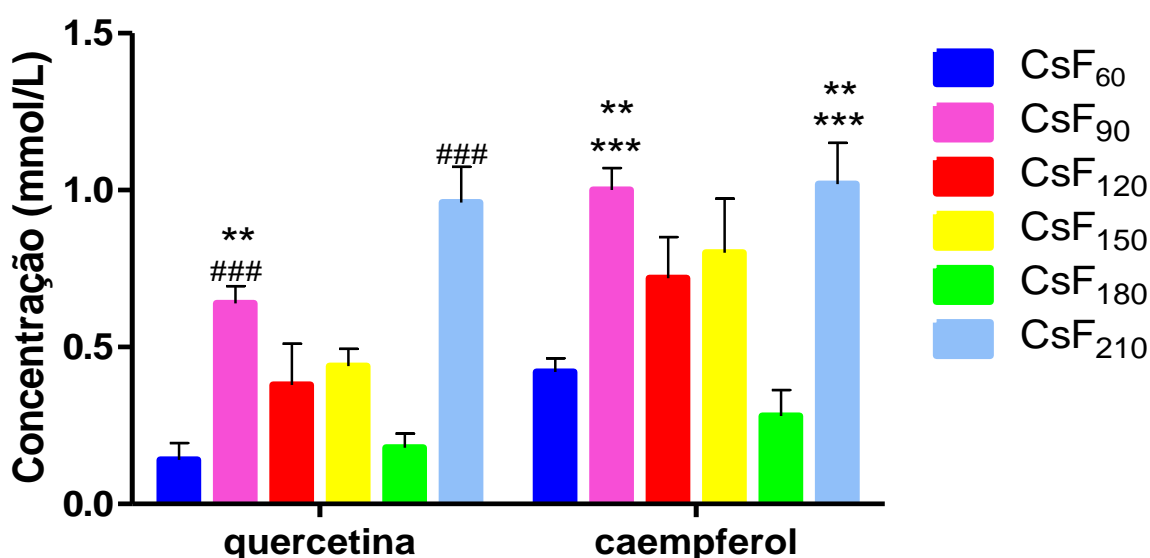
**Gráfico 4** - Teor de carboidratos identificados nos extratos das folhas de *C. sympodialis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente (n = 5). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  (CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>210</sub> ou CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>120</sub> vs CsF<sub>210</sub>); εεε  $p < 0,001$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>); εε  $p < 0,01$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>).

Os teores de derivados de quercetina e caempferol foram determinados em todas as amostras (Gráfico 5), sendo possível observar de forma significativa, uma maior concentração de quercetina ( $C = 1,0 \pm 0,12$  mmol/L,  $p < 0,001$ ) e caempferol ( $C = 1,0 \pm 0,16$  mmol/L,  $p < 0,001$ ) nas amostras CsF<sub>210</sub> e na amostra CsF<sub>90</sub> ( $C = 0,6 \pm 0,09$  mol/L,  $p < 0,001$  e  $C = 1,0$  mol/L  $\pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ), respectivamente. Dessa forma, o maior teor destes flavonóis no extrato das folhas se encontra na amostra CsF<sub>210</sub>, que coincide com o período de frutificação.

**Gráfico 5** - Teor de flavonóis identificados nos extratos das folhas de *C. sympodialis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente (n = 5). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. ###  $p < 0,001$  (CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>210</sub> ou CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>); \*\*  $p < 0,01$  (CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>150</sub> ou CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>150</sub>); \*\*\*  $p < 0,001$  (CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>90</sub> vs CsF<sub>180</sub> ou CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>).



### 5.3 Teor de Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais (Tabela 6, Gráfico 6) revelou uma concentração significativamente maior para o extrato CsF<sub>210</sub> (0,98 mg de EAG/100 mg de planta), quando comparados aos extratos CsF<sub>60</sub> (0,73 mg de EAG/100 mg de planta) e CsF<sub>180</sub> (0,63 mg de EAG/100 mg de planta), para as demais amostras não houve diferença significativa.

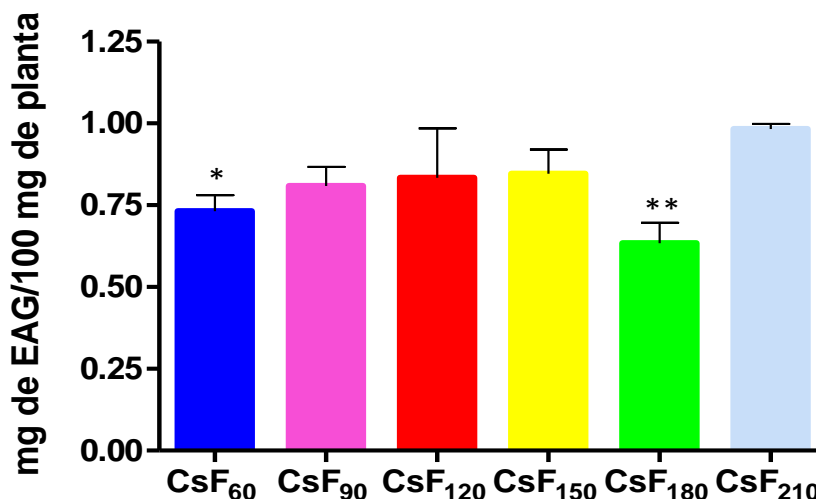
**Tabela 6** - Concentração média  $\pm$  desvio padrão de fenólicos totais encontradas nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. sympodialis*.

Extratos	mg de EAG/100 mg de planta
CsF <sub>60</sub>	0,73 $\pm$ 0,03 *
CsF <sub>90</sub>	0,81 $\pm$ 0,03
CsF <sub>120</sub>	0,83 $\pm$ 0,08
CsF <sub>150</sub>	0,85 $\pm$ 0,04
CsF <sub>180</sub>	0,63 $\pm$ 0,03**
CsF <sub>210</sub>	0,98 $\pm$ 0,01

Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>);

\*\* $p < 0,01$  (CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>210</sub>).

**Gráfico 6** - Teor de fenólicos totais nos extratos das folhas de *C. sympodialis* durante o ciclo vegetativo (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).

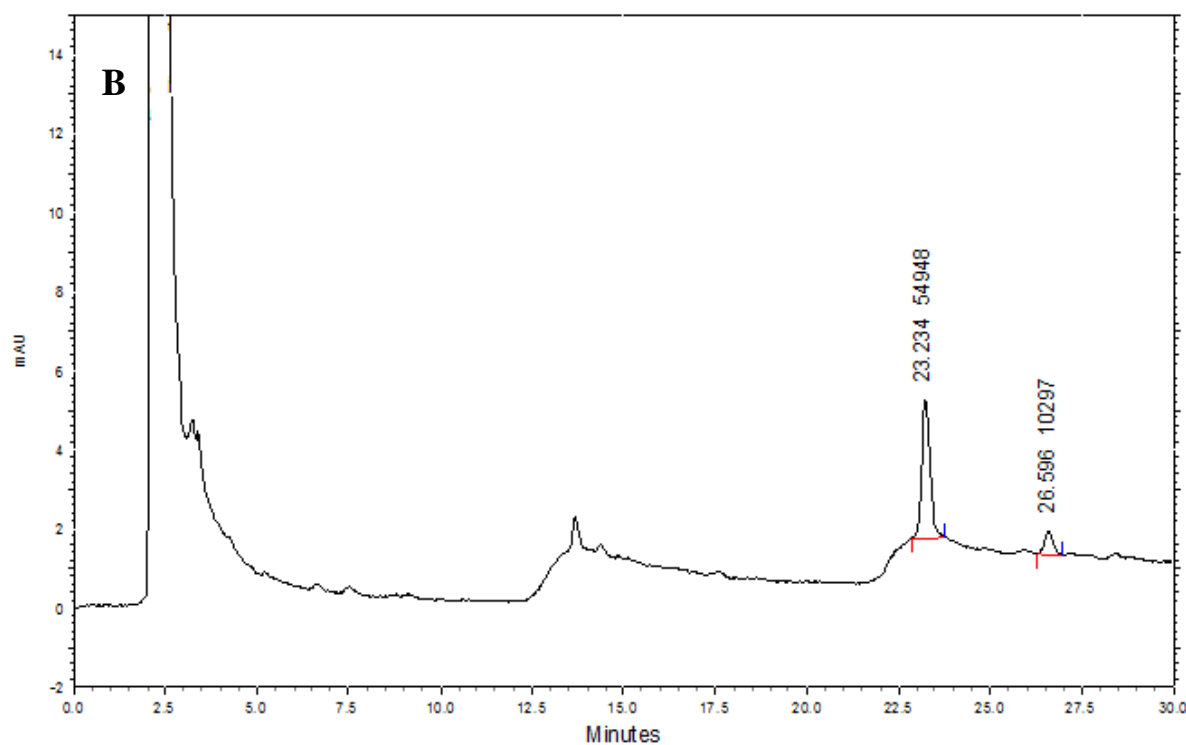
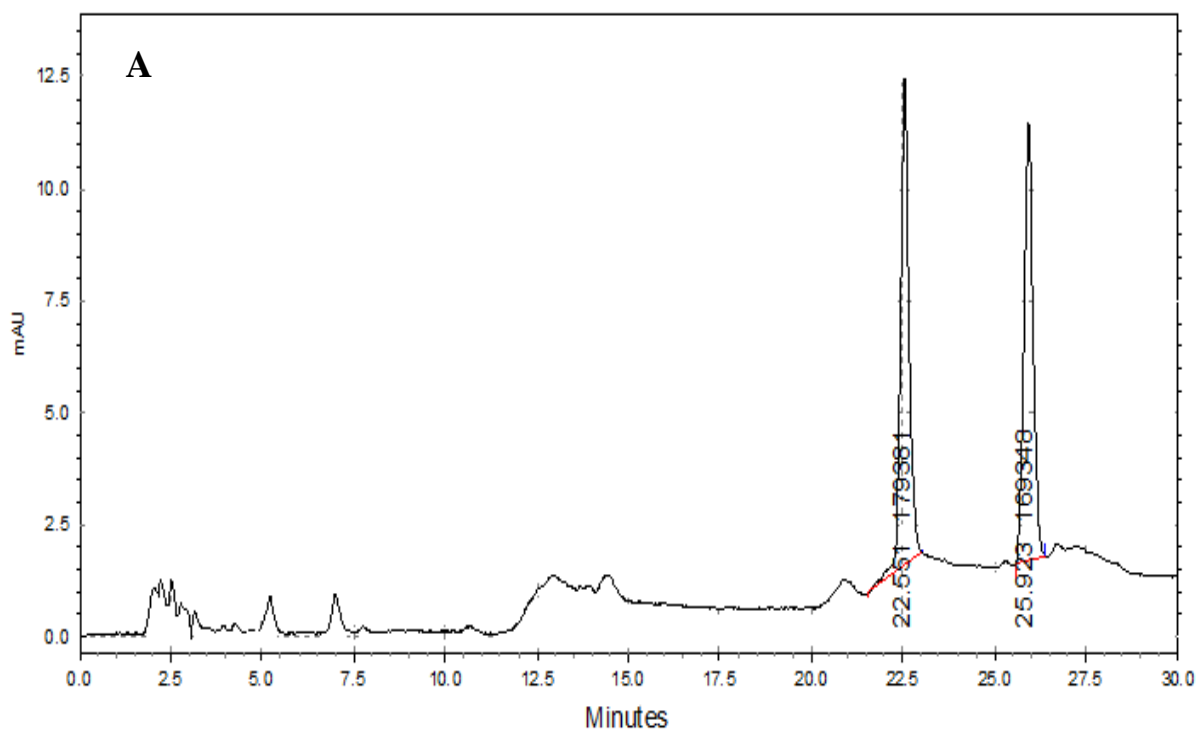


As colunas e as barras verticais representam a média e o desvio padrão da média, respectivamente (n = 3). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni. \*p < 0,05 (CsF<sub>60</sub> vs CsF<sub>210</sub>); \*\*p < 0,01 (CsF<sub>180</sub> vs CsF<sub>210</sub>).

#### 5.4 Teor de Alcaloides

O teor dos alcaloides warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de *C. sympodialis* foi determinado por método analítico padronizado utilizando CLAE-UV e comprimento de onda de 278 nm. Na figura 17, pode-se observar os cromatogramas dos padrões de warifteína com tempo de retenção (tr) de 22,55 minutos e da metilwarifteína tr = 25,9 minutos, bem como o cromatograma da amostra CsF<sub>60</sub>, referente ao extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sympodialis* 60 dias após o plantio.

**Figura 17** - Cromatograma obtido por CLAE para determinação do teor de alcaloides. **A.** Solução padrão de warifiteína (10 µg/mL) e metilwarifiteína (10 µg/mL); **B.** Amostra CsF<sub>60</sub> (1mg/mL).



Os resultados (Tabela 7) revelam que os teores dos alcaloides decaem de 2 µg/mL a níveis não detectáveis em 90 dias após o plantio para a warifteína e de 1 µg/mL a níveis não detectáveis em 120 dias para a metilwarifteína.

**Tabela 7** - Teor de warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*.

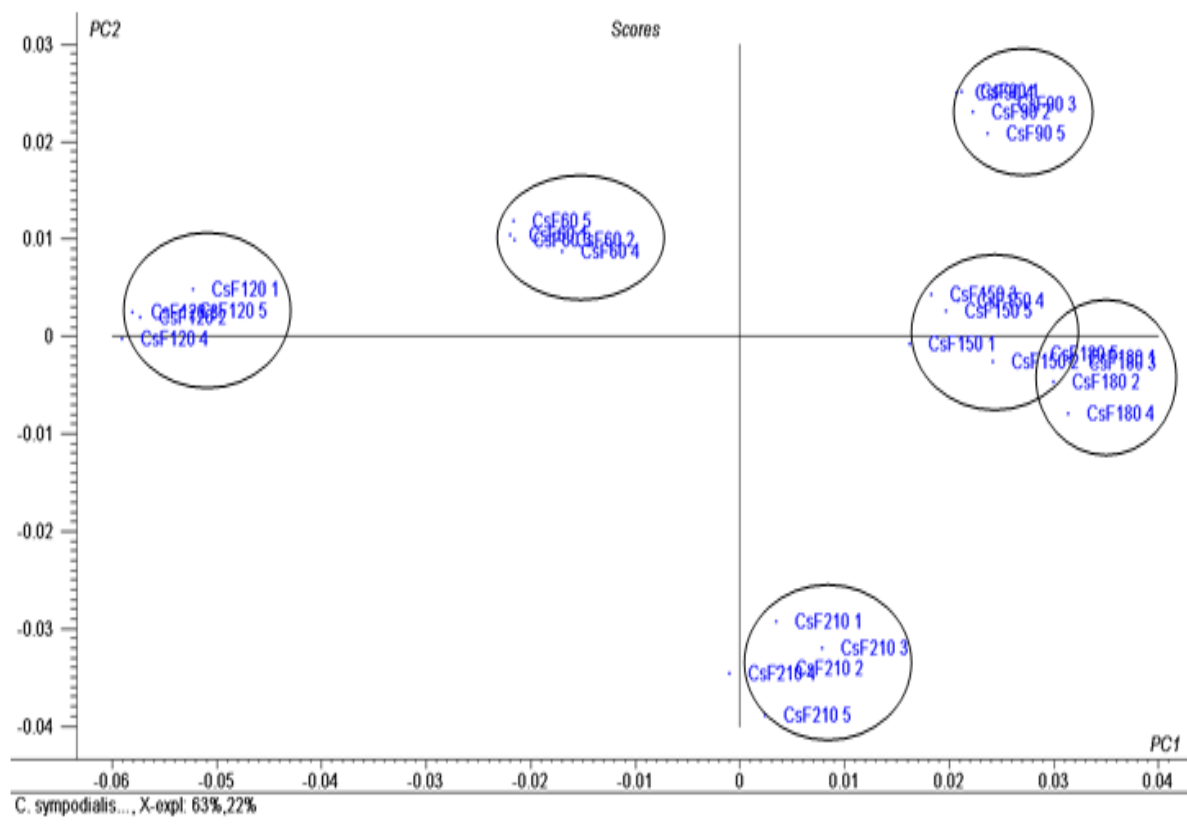
<b>Extrato</b>	<b>warifteína µg/mL</b>	<b>Metilwarifteína µg/mL</b>
CsF <sub>60</sub>	2 ± 0,32	1 ± 0,05
CsF <sub>90</sub>	2 ± 0,24	1 ± 0,14
CsF <sub>120</sub>	<b>ND</b>	1 ± 0,03
CsF <sub>150</sub>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
CsF <sub>180</sub>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
CsF <sub>210</sub>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
Expresso em média ± desvio padrão.		ND = Não detectado.

### 5.5 Análise Multivariada dos Dados de RMN-<sup>1</sup>H

A análise dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H dos seis extratos das folhas de *C. sympodialis* em combinação com PCA (Gráfico 7), permitiu a discriminação entre as amostras utilizando toda a região espectral, com exceção da região dos sinais dos hidrogênios da referência TSP (0 ppm) e do solvente metanol (3,29 a 3,31 ppm).

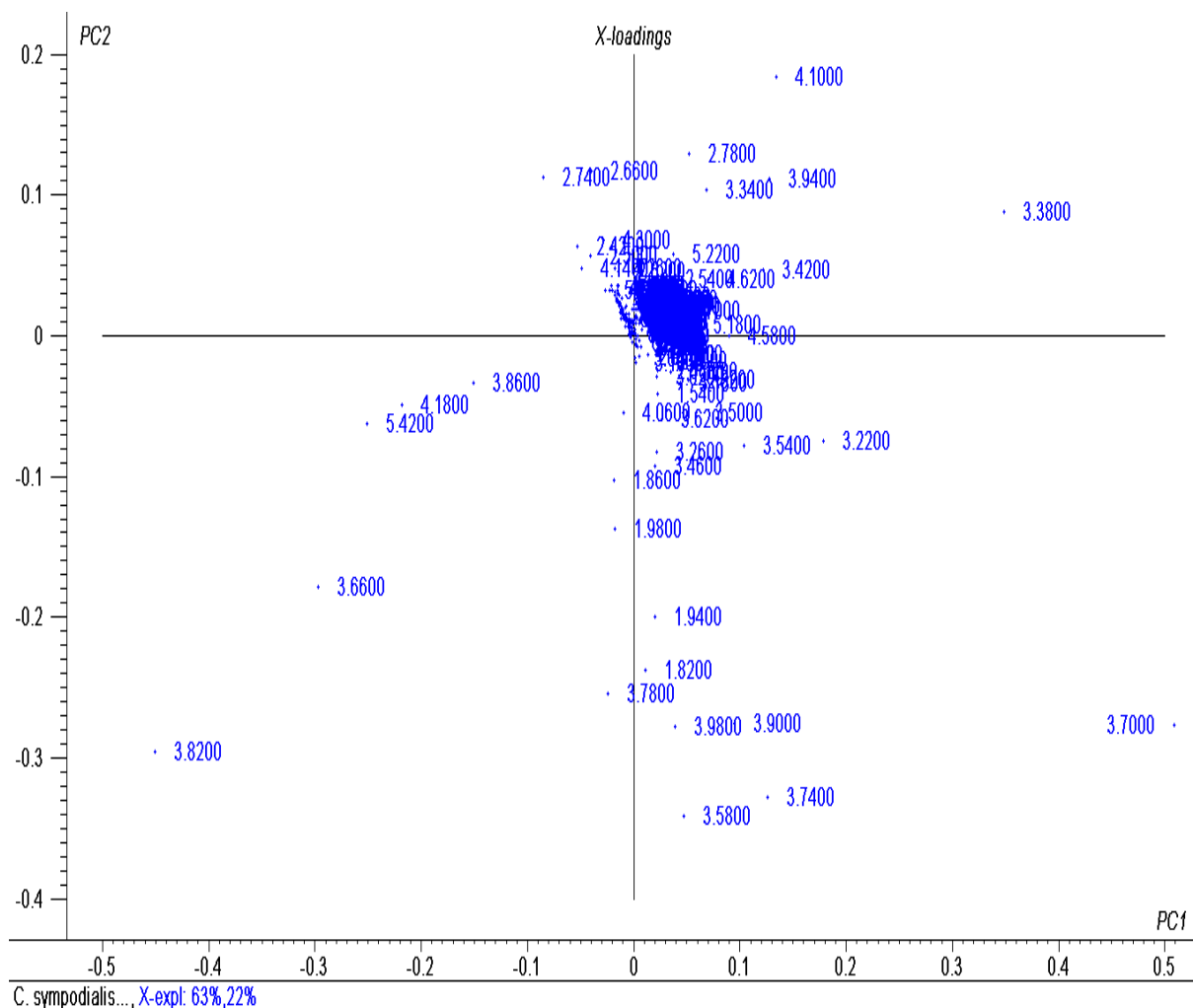
As componentes principais representaram 85% da variância total dos dados, sendo que a primeira componente principal (PC1) descreveu 63% da variação total e a segunda (PC2) 22%. A formação de seis grupos, representa a diferenciação das amostras a cada trinta dias de colheita, porém revela a similaridade entre as amostras CsF<sub>150</sub> e CsF<sub>180</sub> e destaca a amostra CsF<sub>210</sub> entre as demais.

**Gráfico 7** - "Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  -0,06 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de *C. sympodialis* referentes ao ciclo de coletas (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



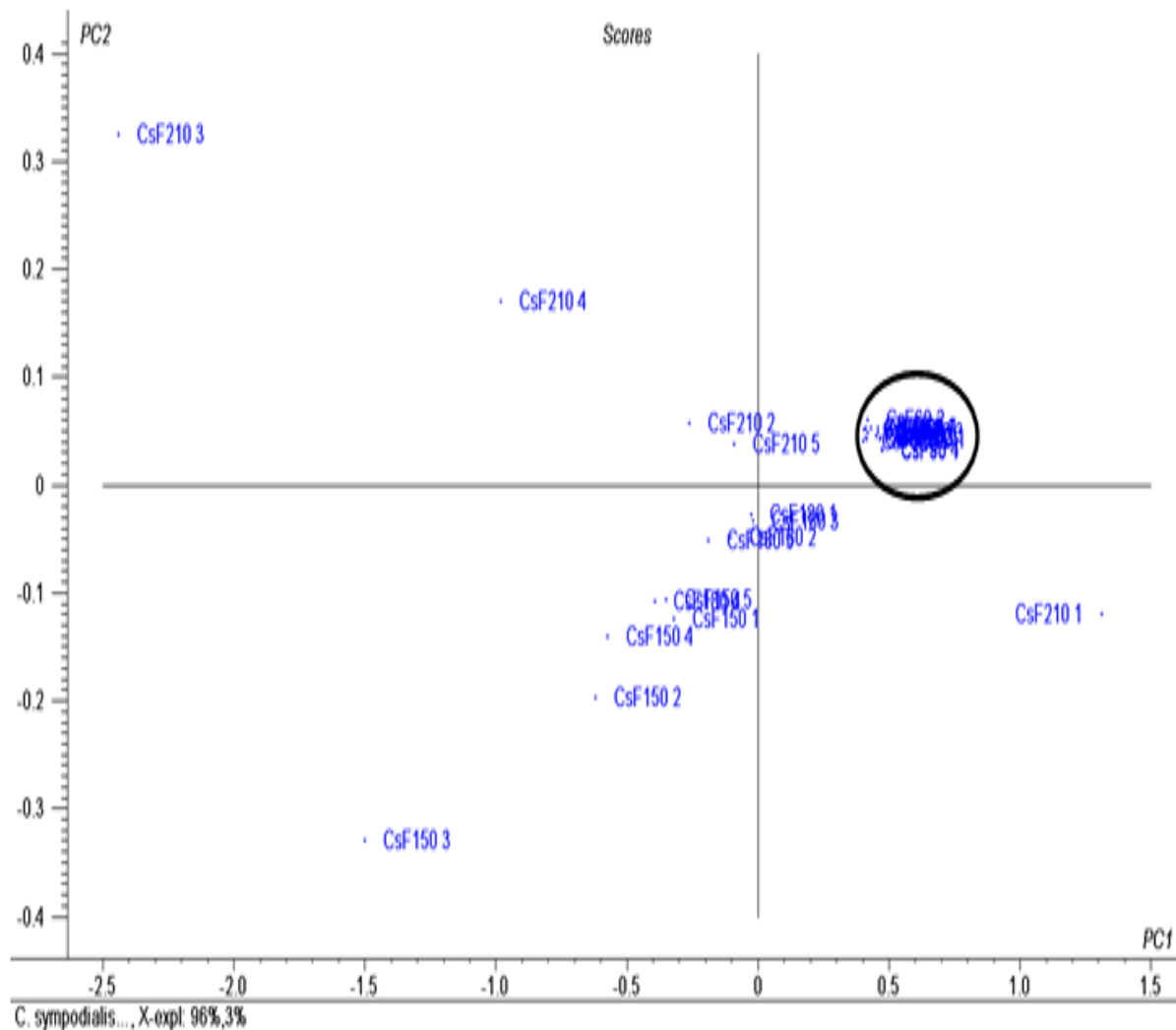
De acordo com o gráfico de "loadings" (Gráfico 8), as amostras CsF<sub>60</sub> e CsF<sub>120</sub> estão fortemente influenciadas por sinais típicos da sacarose (4,18 e 5,42 ppm), assim como a amostra CsF<sub>90</sub> sofre influência do sinal para frutose (4,10 ppm), colaborando para sua discriminação. A proximidade das amostras CsF<sub>150</sub> e CsF<sub>180</sub> pode ser referida a presença do sinal em 3,38 e 3,7 ppm característico de metoxila alifática e aromática respectivamente. As variáveis que influenciam a amostra CsF<sub>210</sub>, são os sinais atribuídos aos derivados do ácido quínico com deslocamentos químicos em 1,82, 1,94, 3,58, 3,98 ppm.

**Gráfico 8** - "Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros de RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  -0,06 a 8,7 ppm) das amostras de folhas de *C. sympodialis*, referentes ao ciclo de coletas (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>).



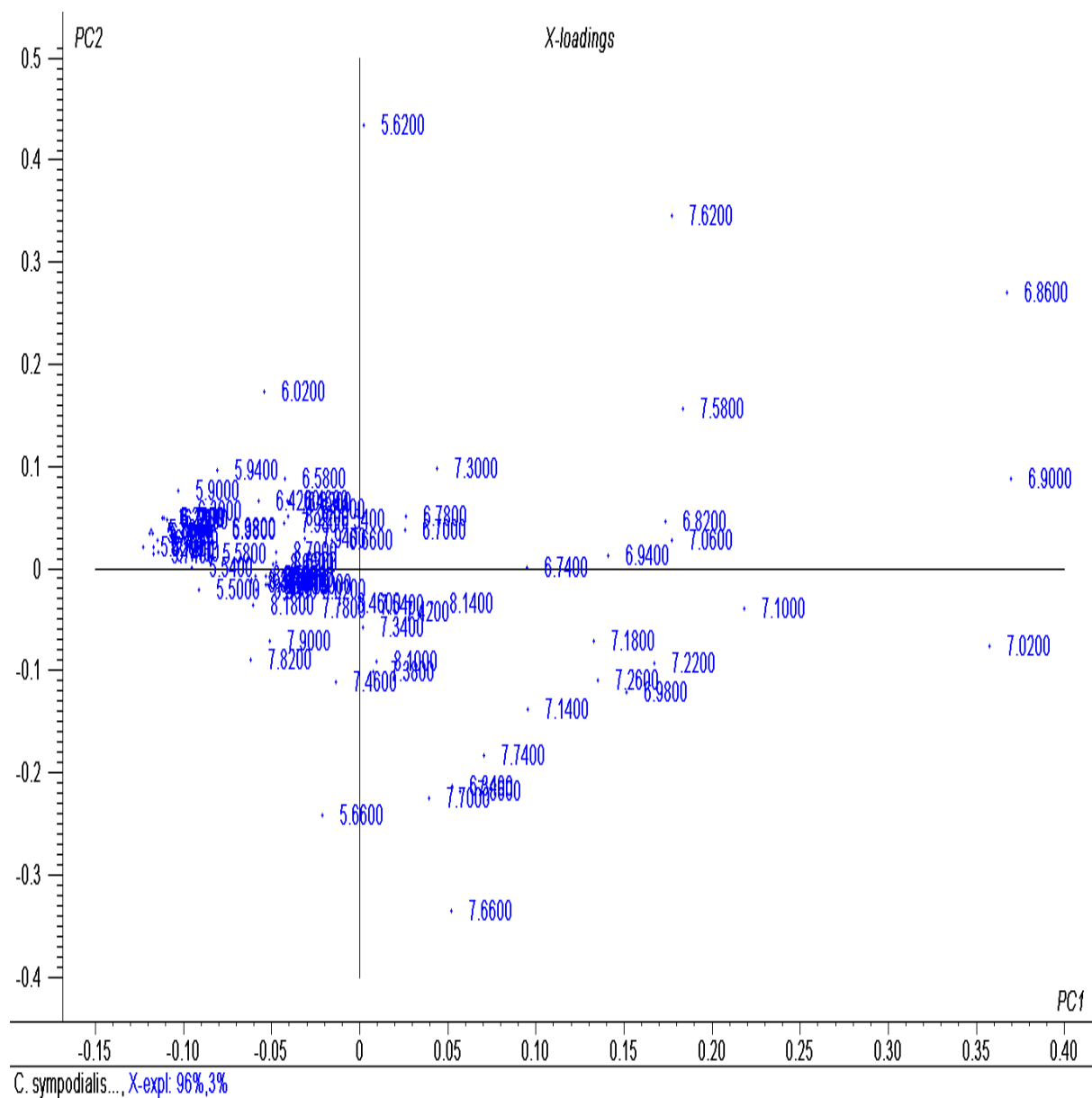
Empregando-se apenas a região de aromáticos ( $\delta$  5,5 - 8,7 ppm), as componentes principais representam 99% da variância dos dados totais, sendo que a primeira componente principal (PC1) descreve 96% da variação total e a segunda (PC2) 3% (Gráfico 9). Observou-se a formação de dois grupos distintos, um grupo representado pelo início do ciclo de desenvolvimento desta espécie, com amostras coletadas até 120 dias após o plantio (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>), demonstrando uma forte similaridade entre estas amostras. O segundo grupo representa o final deste ciclo que culmina com a frutificação (CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> e CsF<sub>210</sub>), apresentando amostras mais dispersas, porém com a amostra CsF<sub>210</sub> se destacando entre as demais.

**Gráfico 9** - "Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  5,5 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de *C. sympodialis* referentes ao ciclo de coletas. A elipse representa as amostras CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>120</sub>.



Analisando-se as variáveis (Gráfico 10) de maior peso na discriminação desses grupos, percebe-se a presença dos sinais atribuídos a quercetina (7,06; 7,66 ppm), ao caempferol (7,06; 8,10 ppm) e a tirosina (6,88; 7,22) (Tabela 4), que contribuem para a distinção da amostra CsF<sub>210</sub>. As variáveis 6,74 e 6,94, conferem influência na distinção das amostras CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>, porém não existem sinais identificados nesta região.

**Gráfico 10** - "Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PCA de espectros de RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  5,5 - 8,7 ppm) de amostras de folhas de *C. sympodialis* referentes ao ciclo de coletas.





## 5.6 Efeito dos Extratos das Folhas sobre as Contrações Tônicas Induzidas por Carbacol em Traqueia de Cobaia

O extrato CsF<sub>60</sub> (0,1-1000 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração os anéis de traqueia pré-contraídos com 10<sup>-6</sup> M de CCh na presença (CE<sub>50</sub> = 207,0 ± 22,4 µg/mL) e na ausência (CE<sub>50</sub> = 114,0 ± 18,7 µg/mL) de epitélio funcional, sendo cerca de 1,8 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência do epitélio (Figura 18, Gráfico 11 e Tabela 8).

O extrato CsF<sub>90</sub> (0,1-1000 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh na presença (CE<sub>50</sub> = 231,6 ± 38,9 µg/mL) e na ausência (CE<sub>50</sub> = 70,3 ± 15,0 µg/mL) de epitélio funcional. Com base nos valores de CE<sub>50</sub>, pode-se observar que esse extrato foi 3,3 vezes mais potente em relaxar o órgão sem epitélio íntegro (Figura 19, Gráfico 11 e Tabela 8).

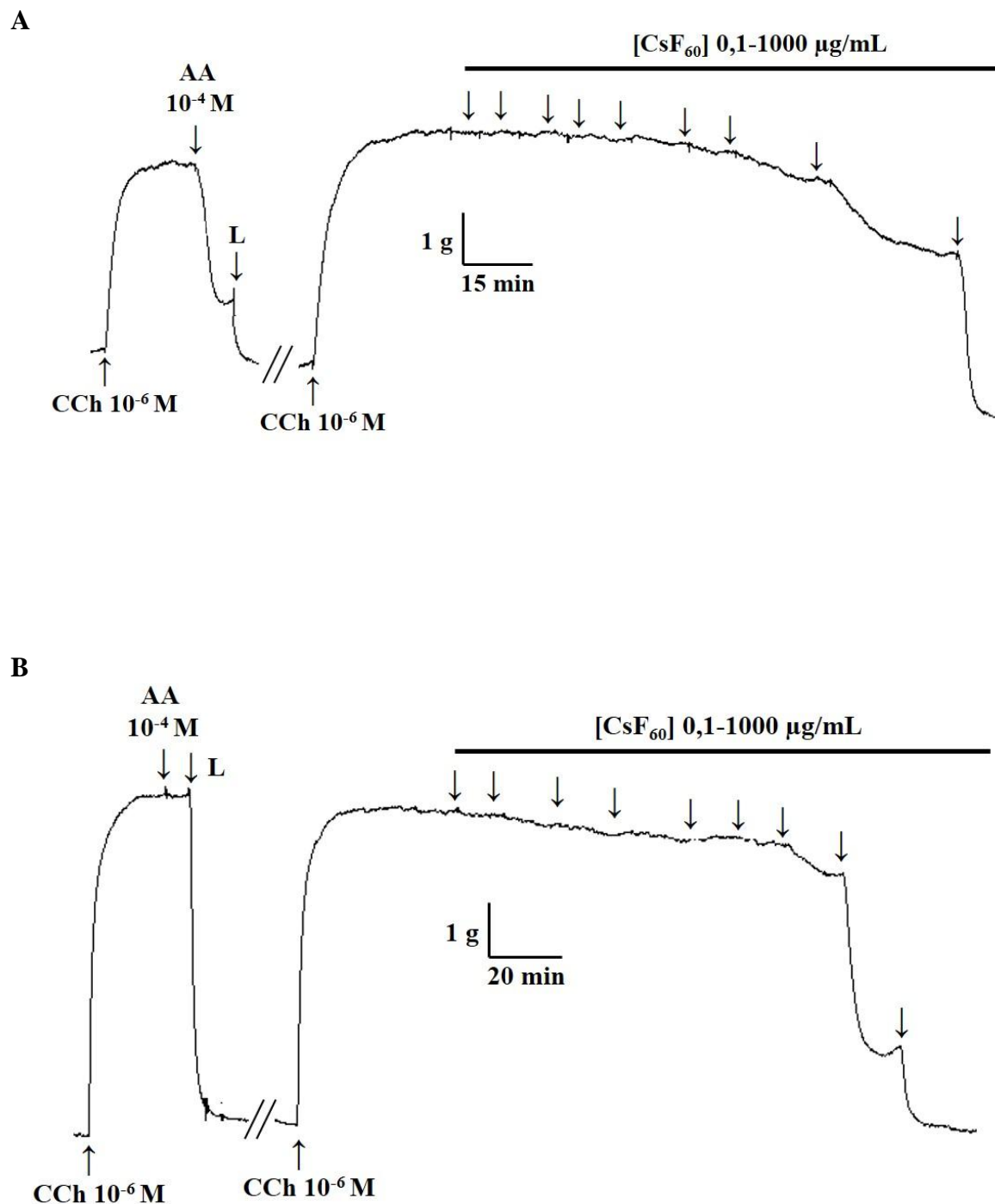
Os extratos CsF<sub>120</sub> e CsF<sub>150</sub> (0,1-1000 µg/mL, n = 5) relaxaram de maneira equipotente e dependente de concentração os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh tanto na presença (CE<sub>50</sub> = 154,3 ± 29,0 e 141,0 ± 13,0 µg/mL, respectivamente) como na ausência (CE<sub>50</sub> = 114,9 ± 21,2 e 167, 4 ± 56,8 µg/mL, respectivamente) de epitélio funcional (Figuras 20 e 21, Gráfico 11 e Tabela 8).

O extrato CsF<sub>180</sub> (0,1-1000 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh na presença (CE<sub>50</sub> = 239,7 ± 15,1 µg/mL) e na ausência (CE<sub>50</sub> = 87,8 ± 16,9 µg/mL) de epitélio funcional, sendo cerca de 2,7 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência do epitélio (Figura 22, Gráfico 11 e Tabela 8).

O extrato CsF<sub>210</sub> (0,1-1000 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh na presença (CE<sub>50</sub> = 74,6 ± 7,9 µg/mL) e na ausência (CE<sub>50</sub> = 173,3 ± 33,9 µg/mL) de epitélio funcional, sendo cerca de 2,3 vezes mais potente em relaxar o órgão com epitélio íntegro (Figura 23, Gráfico 11 e Tabela 8).

Os extratos CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub>, CsF<sub>120</sub>, CsF<sub>150</sub>, CsF<sub>180</sub> e CsF<sub>210</sub> foram equiefficientes e atingiram o E<sub>max</sub> de 100% na concentração de 1000 µg/mL (Gráfico 11). O tempo médio para os seis extratos atingirem os seus E<sub>max</sub> foram semelhantes, em média 140,2 ± 8,4 minutos (Figuras 18 a 23). O efeito relaxante dos seis extratos foi completamente revertido após o período de 45 minutos (dados não mostrados).

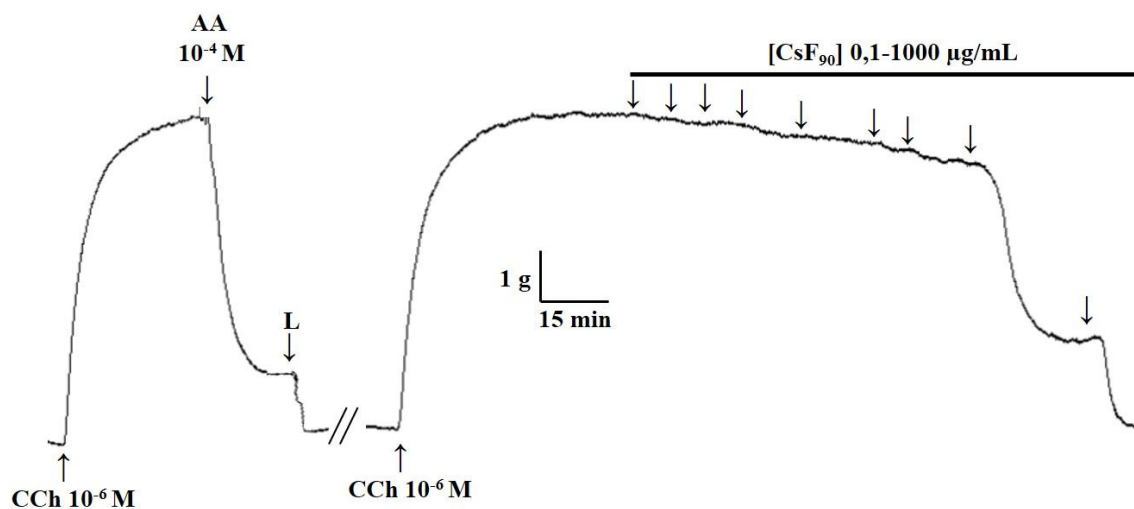
**Figura 18** - Registros representativos do efeito relaxante do  $\text{CsF}_{60}$  em traqueia de cobaia pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).



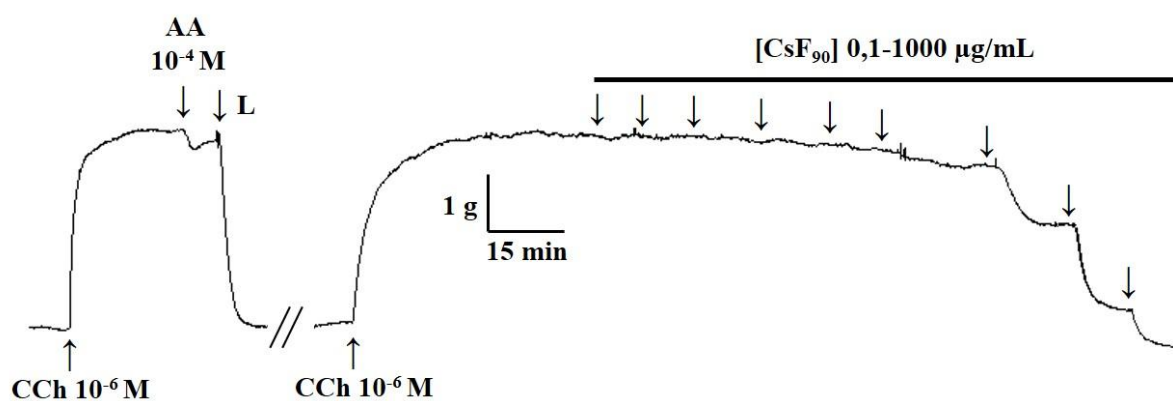
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do  $\text{CsF}_{60}$  adicionadas às cubas.

**Figura 19** - Registros representativos do efeito relaxante do CsF<sub>90</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10<sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).

**A**

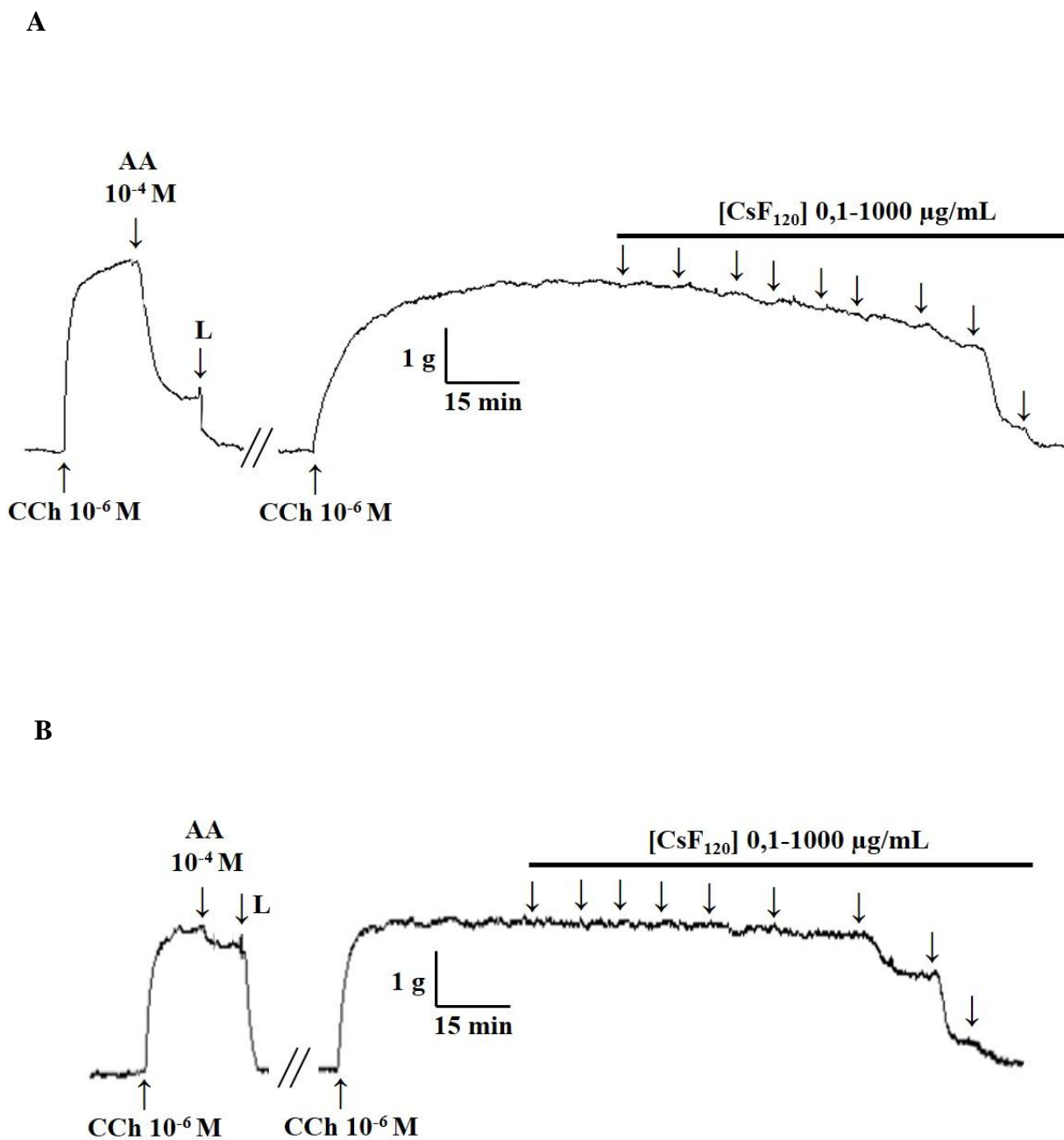


**B**



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do CsF<sub>90</sub> adicionadas às cubas.

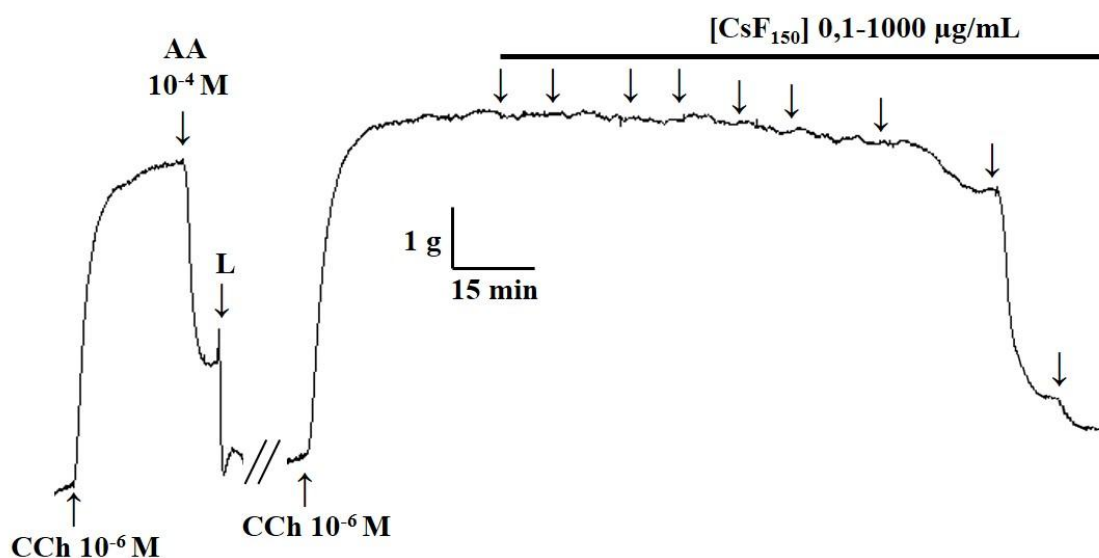
**Figura 20** - Registros representativos do efeito relaxante do  $\text{CsF}_{120}$  em traqueia de cobaia pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).



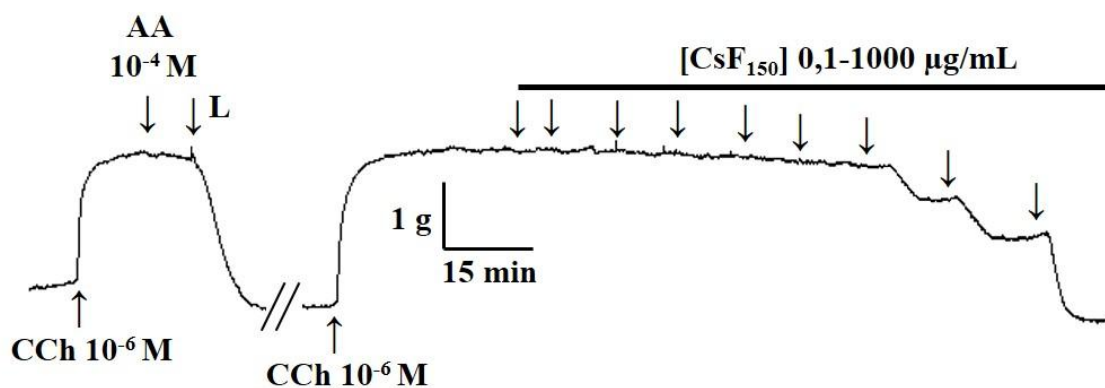
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do  $\text{CsF}_{120}$  adicionadas às cubas.

**Figura 21** - Registros representativos do efeito relaxante do CsF<sub>150</sub> em traqueia de cobaia pré-contraída com 10<sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).

**A**

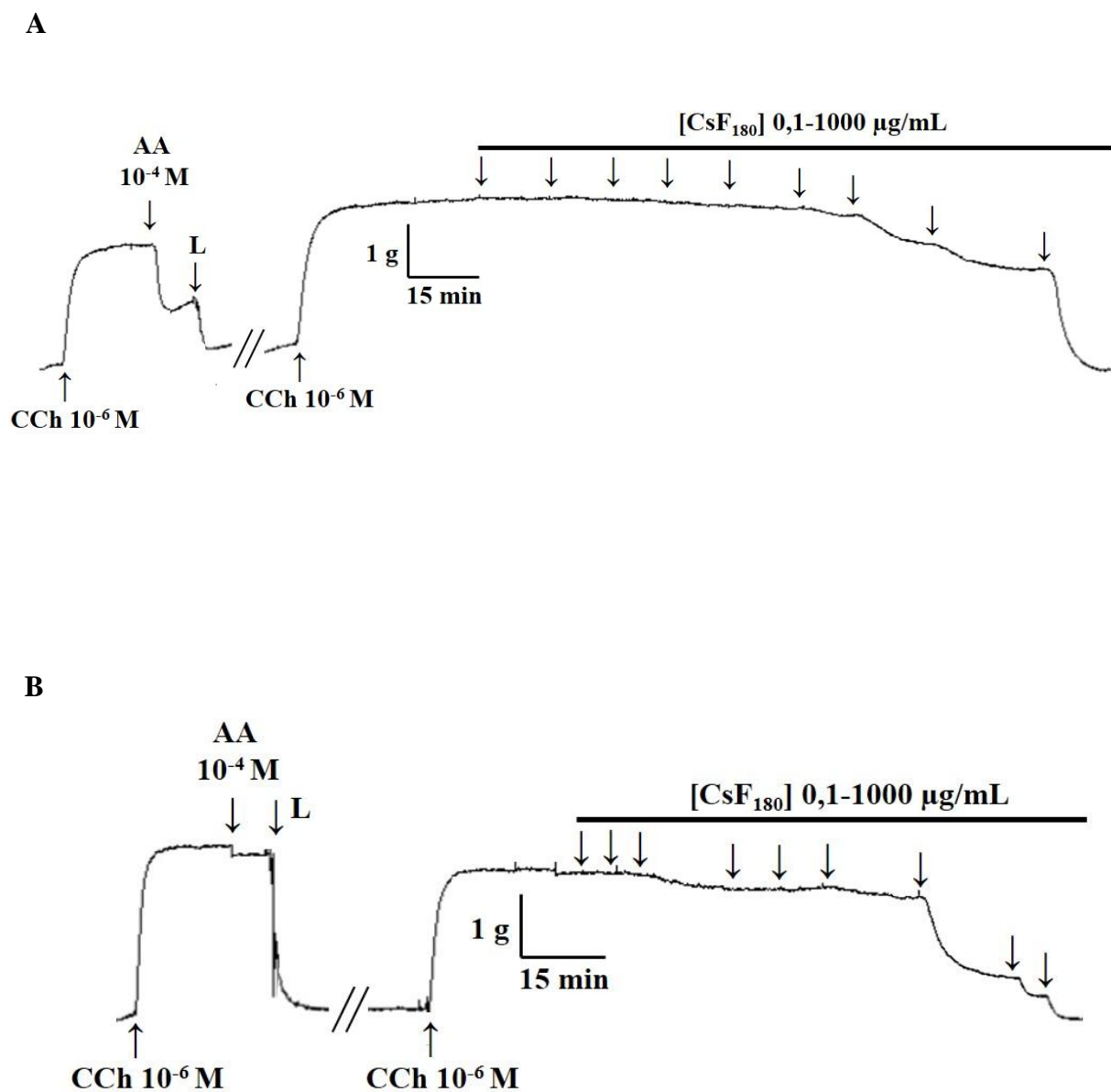


**B**



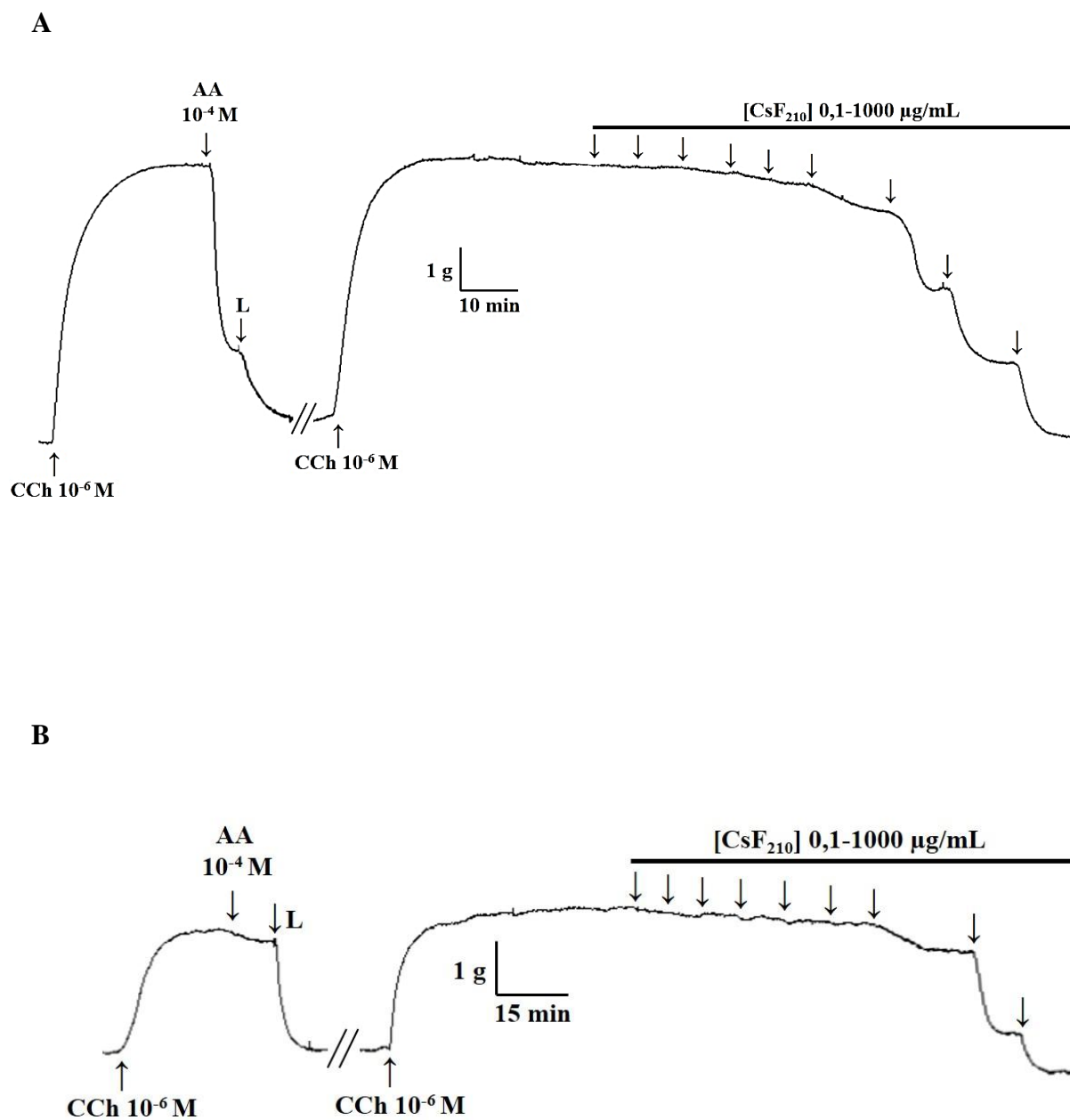
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do CsF<sub>150</sub> adicionadas às cubas.

**Figura 22** - Registros representativos do efeito relaxante do CsF<sub>180</sub> em traqueia de cobaia pré-contráida com 10<sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).



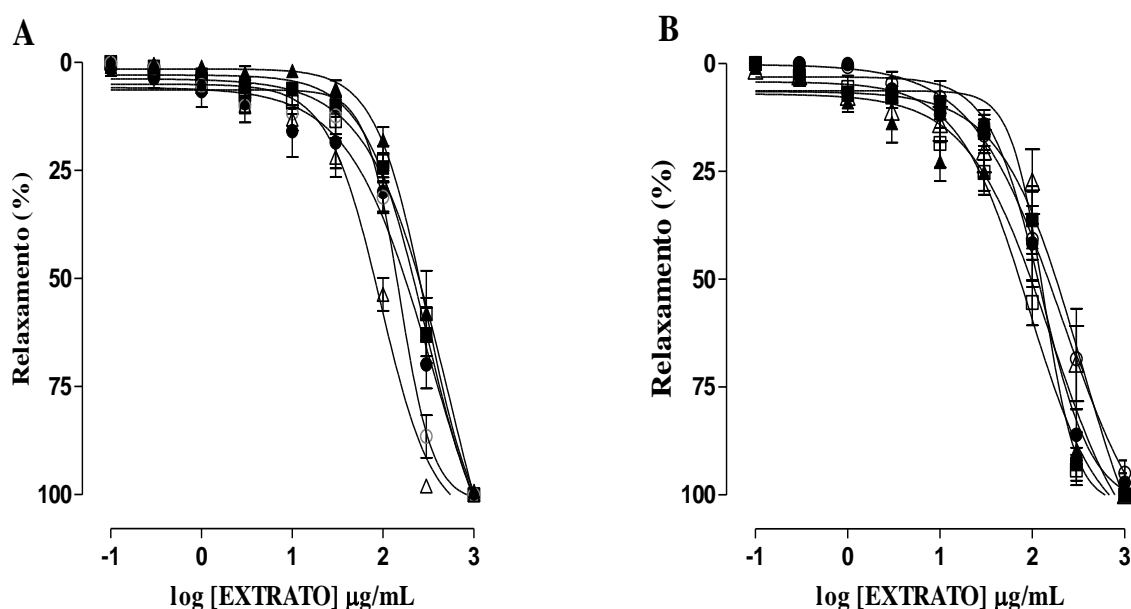
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do CsF<sub>180</sub> adicionadas às cubas.

**Figura 23** - Registros representativos do efeito relaxante do  $\text{CsF}_{210}$  em traqueia de cobaia pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (A) e na ausência do epitélio funcional (B).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do  $\text{CsF}_{210}$  adicionadas às cubas.

**Gráfico 11** - Efeito relaxante de CsF<sub>60</sub> (■), CsF<sub>90</sub> (□), CsF<sub>120</sub> (●), CsF<sub>150</sub> (○), CsF<sub>180</sub> (▲) e CsF<sub>210</sub> (△) sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional em traqueia de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m, respectivamente (n = 5).

**Tabela 8** - Valores de CE<sub>50</sub> dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis* sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de CCh em anéis de traqueia de cobaia.

Extrato	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
	E+	E-
CsF <sub>60</sub>	207,0 ± 22,4*	114,0 ± 18,7
CsF <sub>90</sub>	231,6 ± 38,9** <sup>δ</sup>	70,3 ± 15,0
CsF <sub>120</sub>	154,3 ± 29,0	114,9 ± 21,2
CsF <sub>150</sub>	141,0 ± 13,0	167,4 ± 56,8
CsF <sub>180</sub>	239,7 ± 15,1*** <sup>δδ</sup>	87,8 ± 16,9
CsF <sub>210</sub>	74,6 ± 7,9*	173,3 ± 33,9

Teste t, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (E+ vs. E-). Anova "one-way" seguido de pós teste de Bonferroni, <sup>δ</sup> $p < 0,05$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>90</sub>); <sup>δδ</sup> $p < 0,01$  (CsF<sub>210</sub> vs CsF<sub>180</sub>). E+ = presença de epitélio; E- = ausência de epitélio.

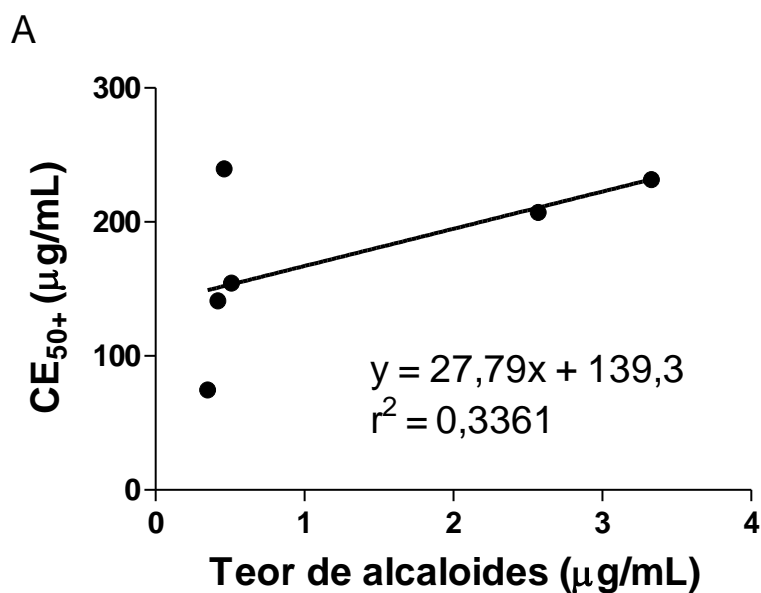


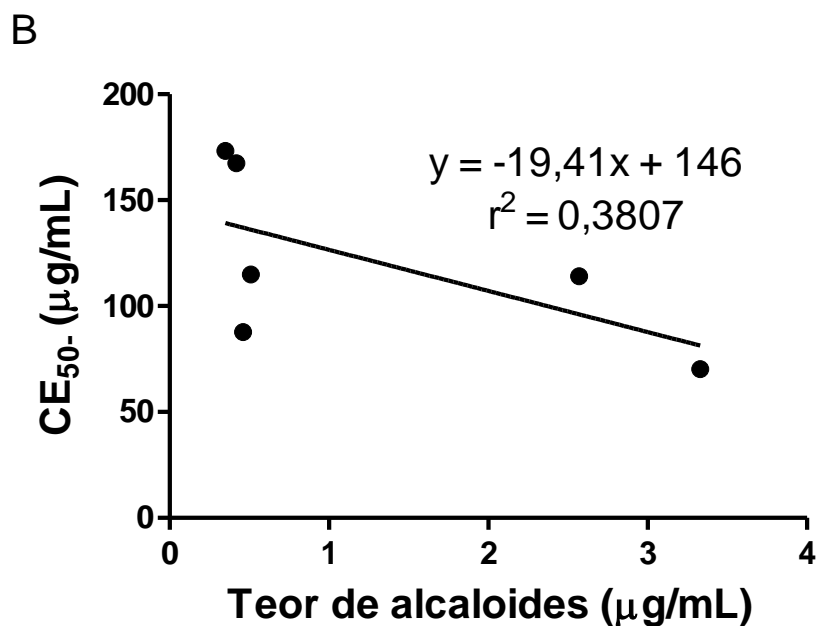
## 5.7 Estudo de Correlações

### 5.7.1 Correlação Potência *versus* Teor de Alcaloides

O gráfico 12 mostra a curva de regressão linear entre o teor de alcaloides em função dos valores de  $CE_{50}$  da atividade relaxante do músculo liso em traqueia de cobaia na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional. O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido de todos os seis extratos das folhas de *C. sympodialis* analisados foi de 0,3361 e 0,3807, respectivamente, o que significa uma correlação muito fraca.

**Gráfico 12** - Correlação linear entre o teor de alcaloides e a atividade relaxante em traqueia de cobaia dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*. **A.** Na presença de epitélio funcional. **B.** Na ausência de epitélio funcional.

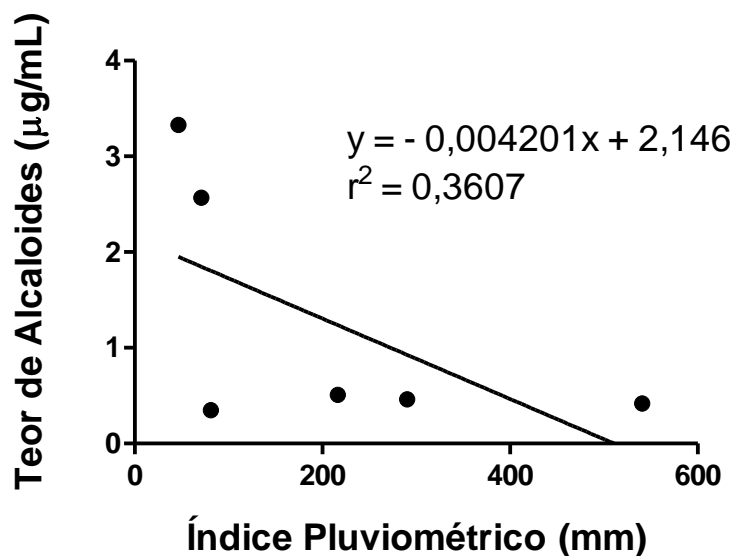




### 5.7.2 Correlação Alcaloides *versus* Índice Pluviométrico

Com o intuito de verificar a interferência do índice de chuvas na cidade de João Pessoa (AESAs, 2012) durante os meses de coleta das folhas de *C. sympodialis* em função da produção dos alcaloides warifteína e metilwarifteína pela planta, foi determinada a curva de regressão linear (Gráfico 13). O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido do teor dos alcaloides presente nos extratos analisados foi de 0,3607, o que significa uma correlação muito fraca.

**Gráfico 13** - Correlação linear entre o índice pluviométrico e o teor de alcaloides dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*.

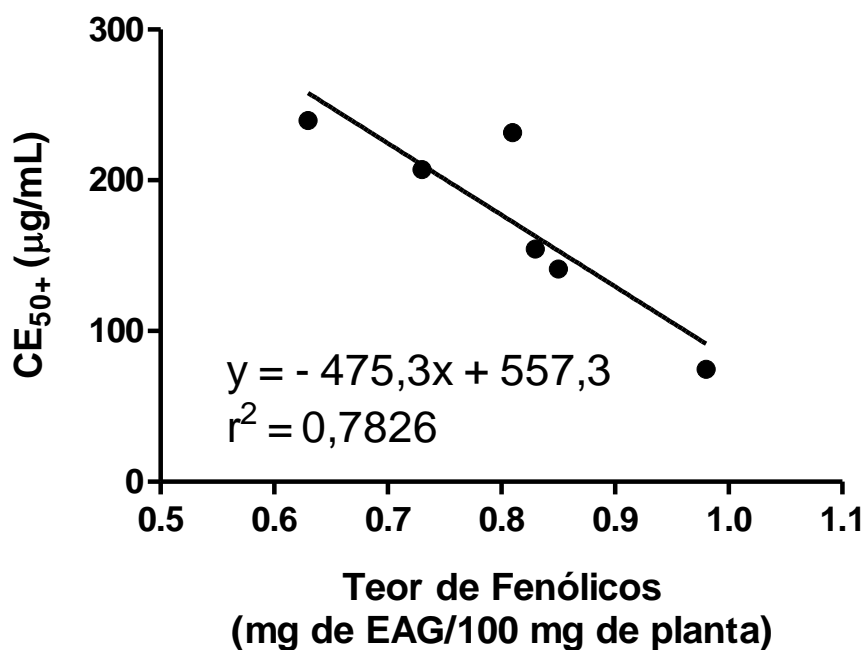


### 5.7.3 Correlação Potência *versus* Teor de FenólicosTotais

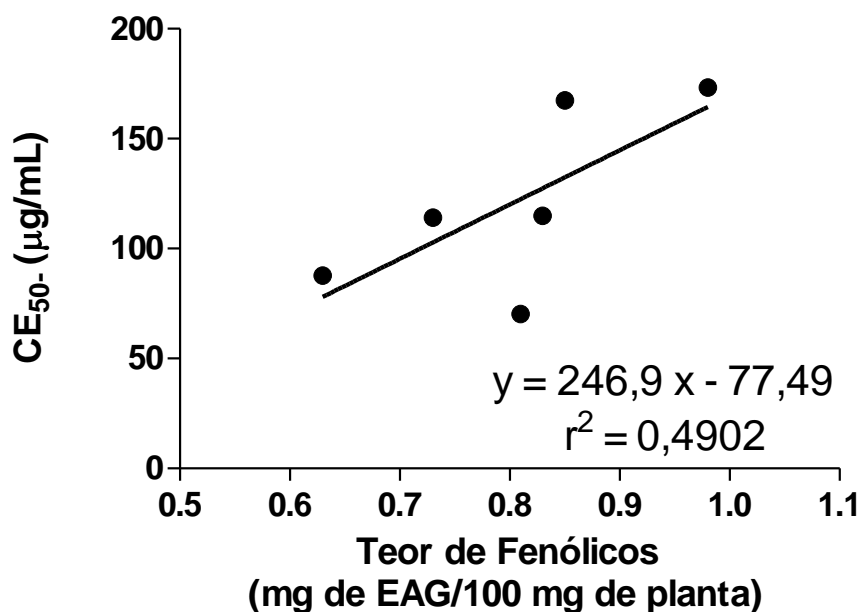
O gráfico 14 mostra a curva de regressão linear entre o teor de fenólicos totais em função dos valores de  $CE_{50}$  da atividade relaxante do músculo liso em traqueia de cobaia na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional. O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido de todos os seis extratos das folhas de *C. sympodialis* analisados foi de 0,7826 e 0,4902 respectivamente. Este resultado sugere que 78% do efeito relaxante dos extratos na presença de epitélio pode ser previsto com base no teor de fenólicos totais, o que significa uma correlação significativa.

**Gráfico 14** - Correlação linear entre o teor de fenólicos totais e a atividade relaxante em traqueia de cobaia dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*. **A.** Na presença de epitélio funcional. **B.** Na ausência de epitélio funcional.

**A**



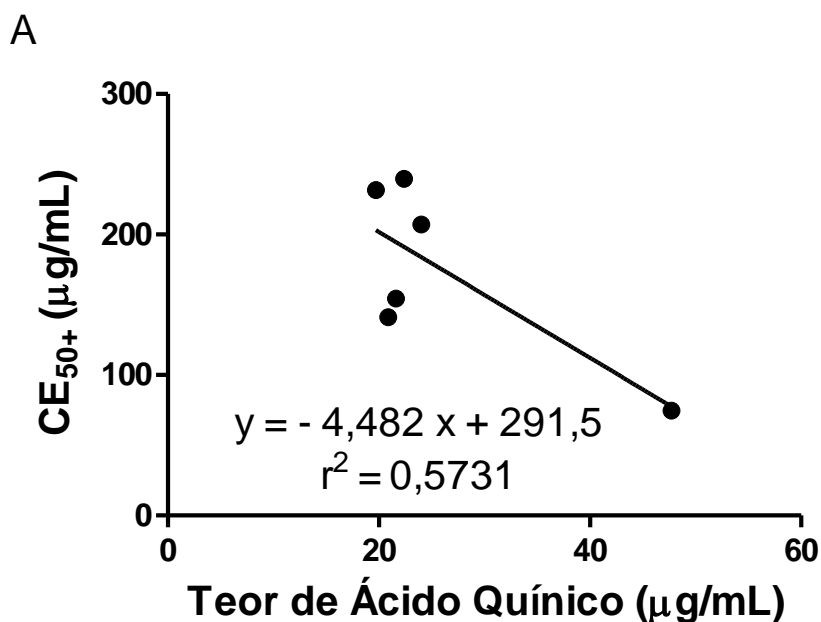
**B**

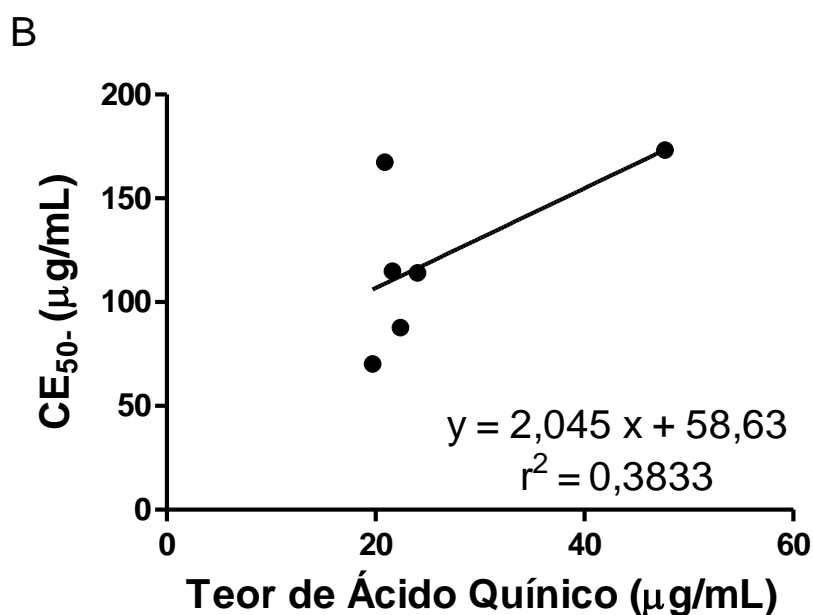


#### 5.7.4 Correlação Potência *versus* Teor de Ácido Quínico

O gráfico 15 representa a curva de regressão linear entre o teor de ácido quínico em função dos valores de  $CE_{50}$  da atividade relaxante do músculo liso em traqueia de cobaia na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional. O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido de todos os seis extratos das folhas de *C. sympodialis* analisados foi de 0,5731 e 0,3833 respectivamente. Este resultado sugere que 57% do efeito relaxante dos extratos na presença de epitélio pode ser previsto com base no teor de ácido quínico, o que significa uma correlação moderada.

**Gráfico 15** - Correlação linear entre o teor de ácido quínico e a atividade relaxante em traqueia de cobaia dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*. **A.** Na presença de epitélio funcional. **B.** Na ausência de epitélio funcional.

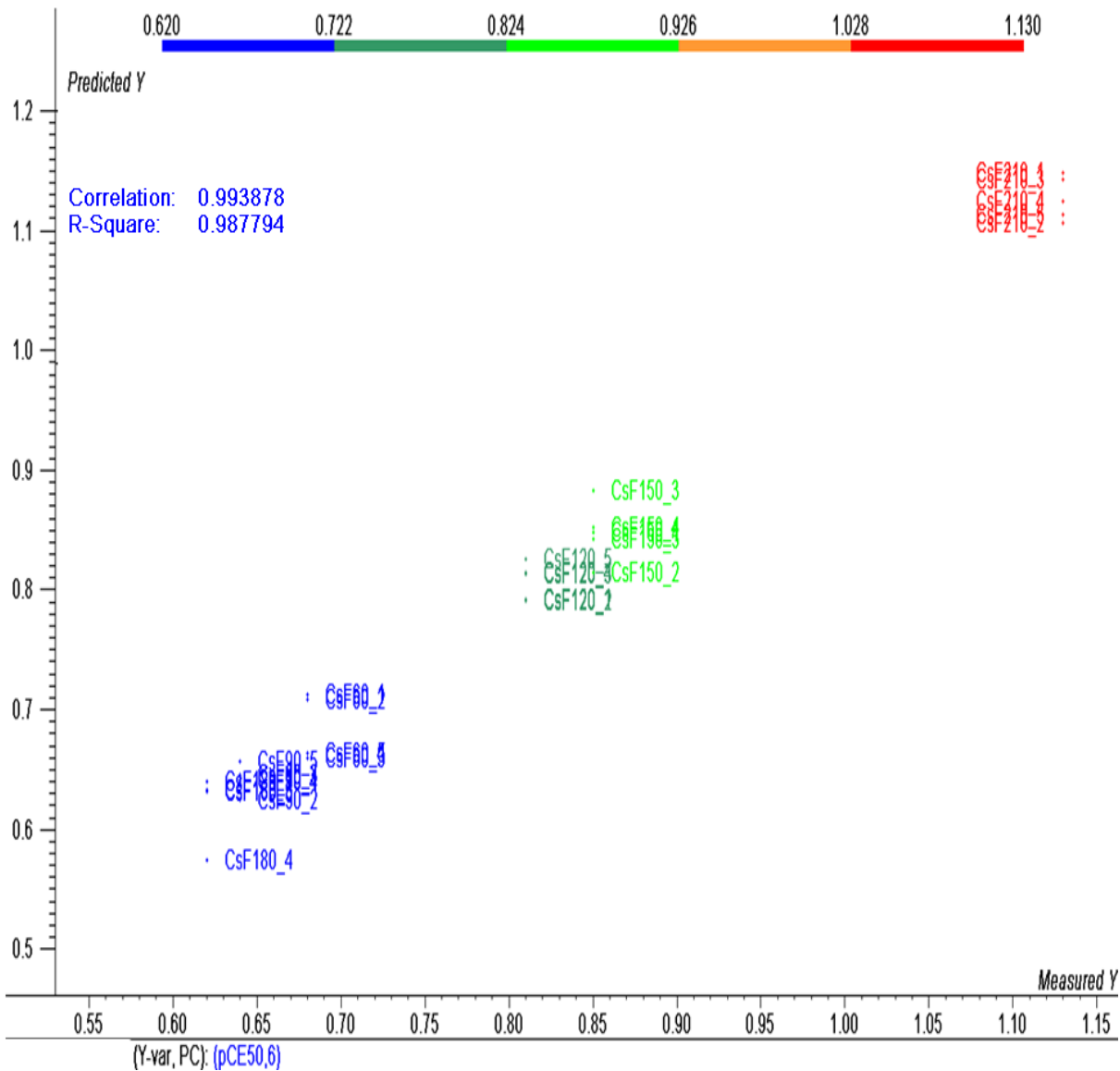




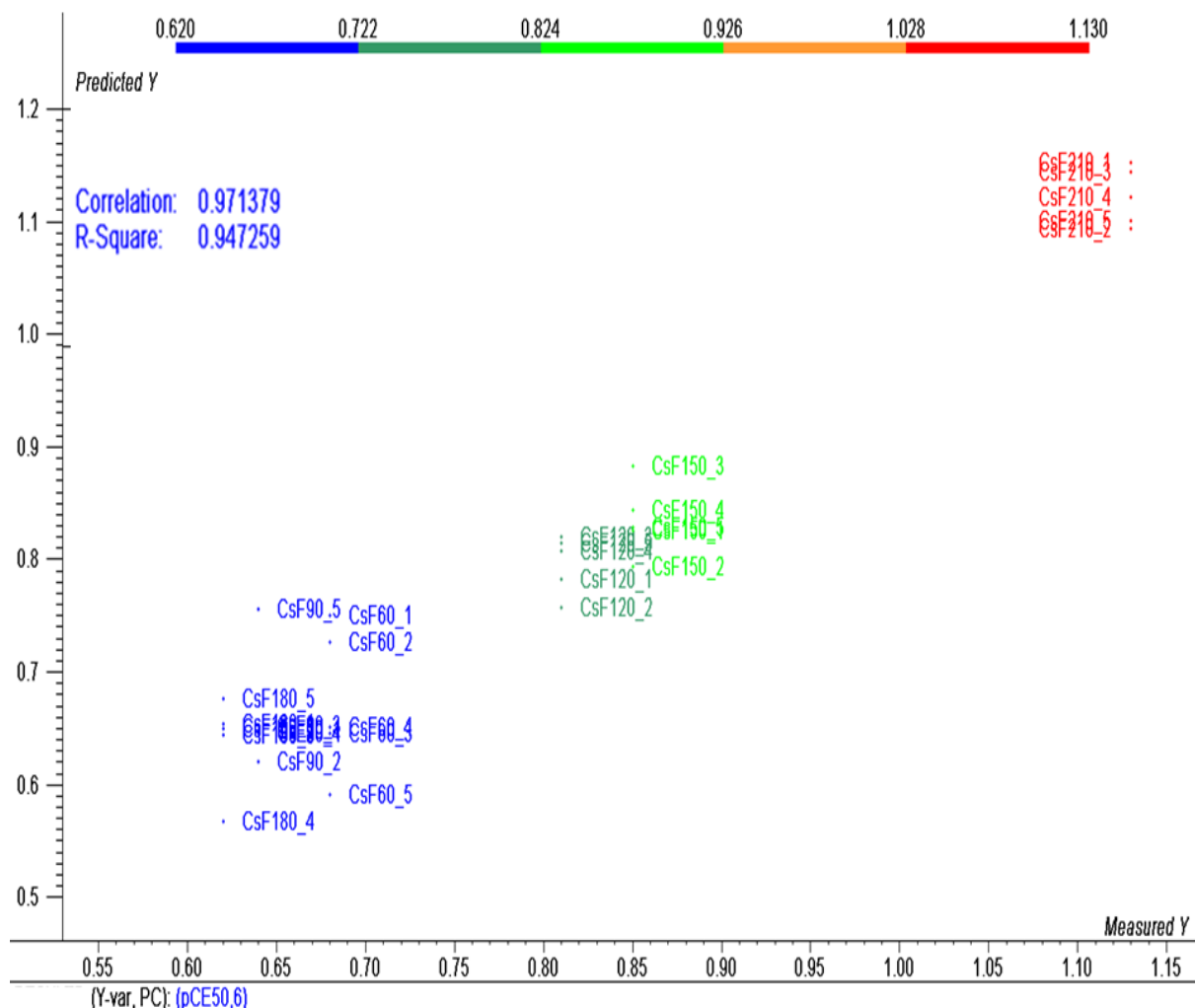
### 5.7.5 Correlação da Informação Química *versus* Atividade Farmacológica

A relação entre a potência dos extratos hidroalcoólicos das folhas da espécie representada por pCE<sub>50</sub> na presença de epitélio e os dados de RMN-<sup>1</sup>H da região de aromáticos foram avaliados aplicando PLS. O modelo foi construído sem retirada de amostra e com o procedimento de validação cruzada do tipo "deixe uma fora" ("leave one out"). Foi obtida uma correlação satisfatória entre os valores previstos pelo modelo e os valores do método de referência, tanto para as amostras do conjunto de calibração com  $R^2 = 0,99$  (Gráfico 16), como para as do conjunto de validação com  $Q^2 = 0,95$  (Gráfico 17). Essa correlação é dada pelos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$  e  $Q^2$ ) próximos a 1,0, demonstrando o bom ajuste do modelo.

**Gráfico 16** - Predição dos valores de PC1 vs PC2 na calibração do modelo PLS.



**Gráfico 17** - Predição dos valores de PC1 vs PC2 na validação cruzada do modelo PLS.

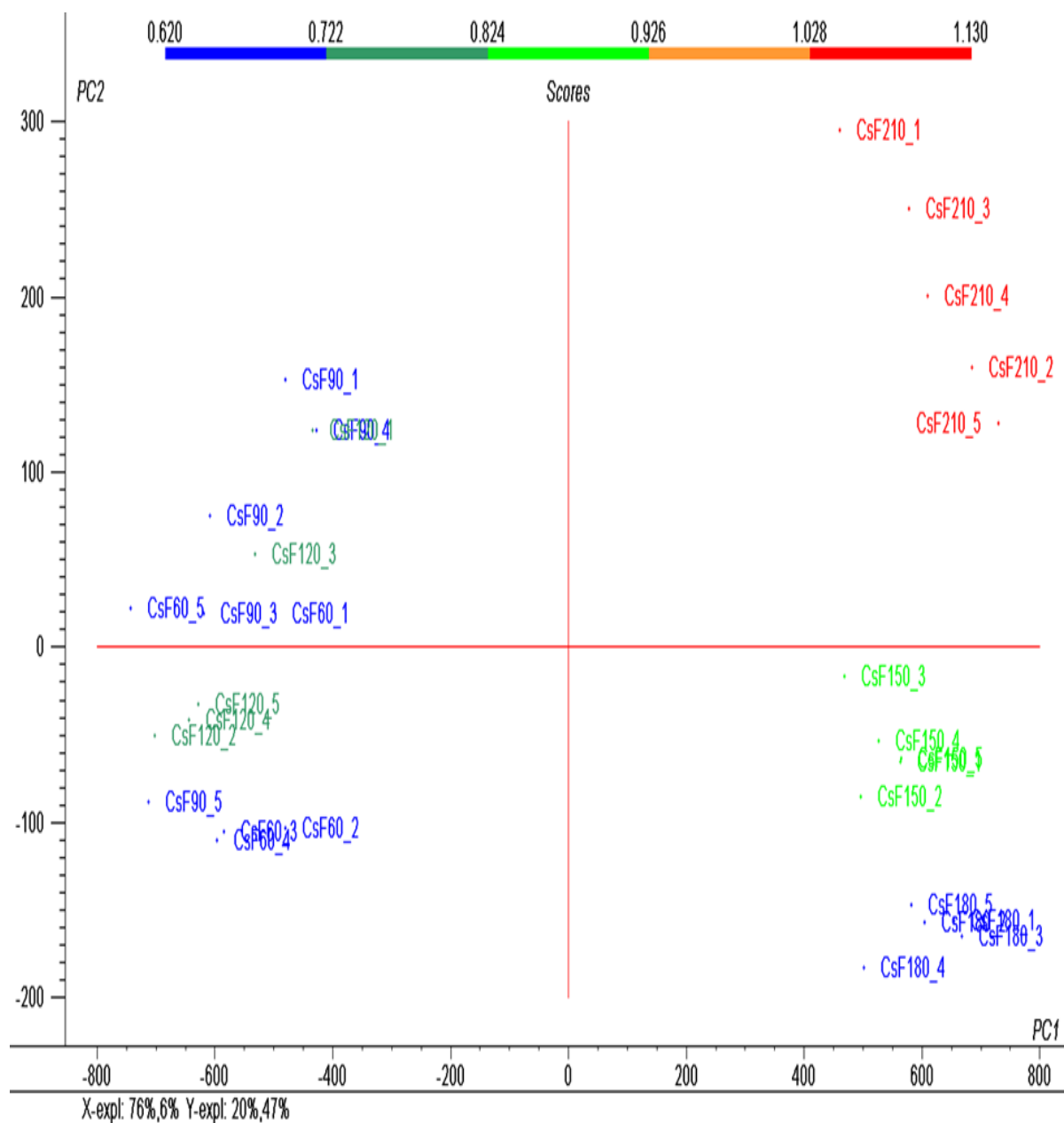


O gráfico de "score" representado por PC1 e PC2 (Gráfico 18) explicam 82% e 67% da variância de X e Y respectivamente, com duas variáveis latentes. A análise permitiu a segregação das amostras de acordo com a potência do efeito farmacológico obtido, ou seja, amostra mais potente (CsF<sub>210</sub>), intermediárias (CsF<sub>120</sub> e CsF<sub>150</sub>) e menos potentes (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>180</sub>).

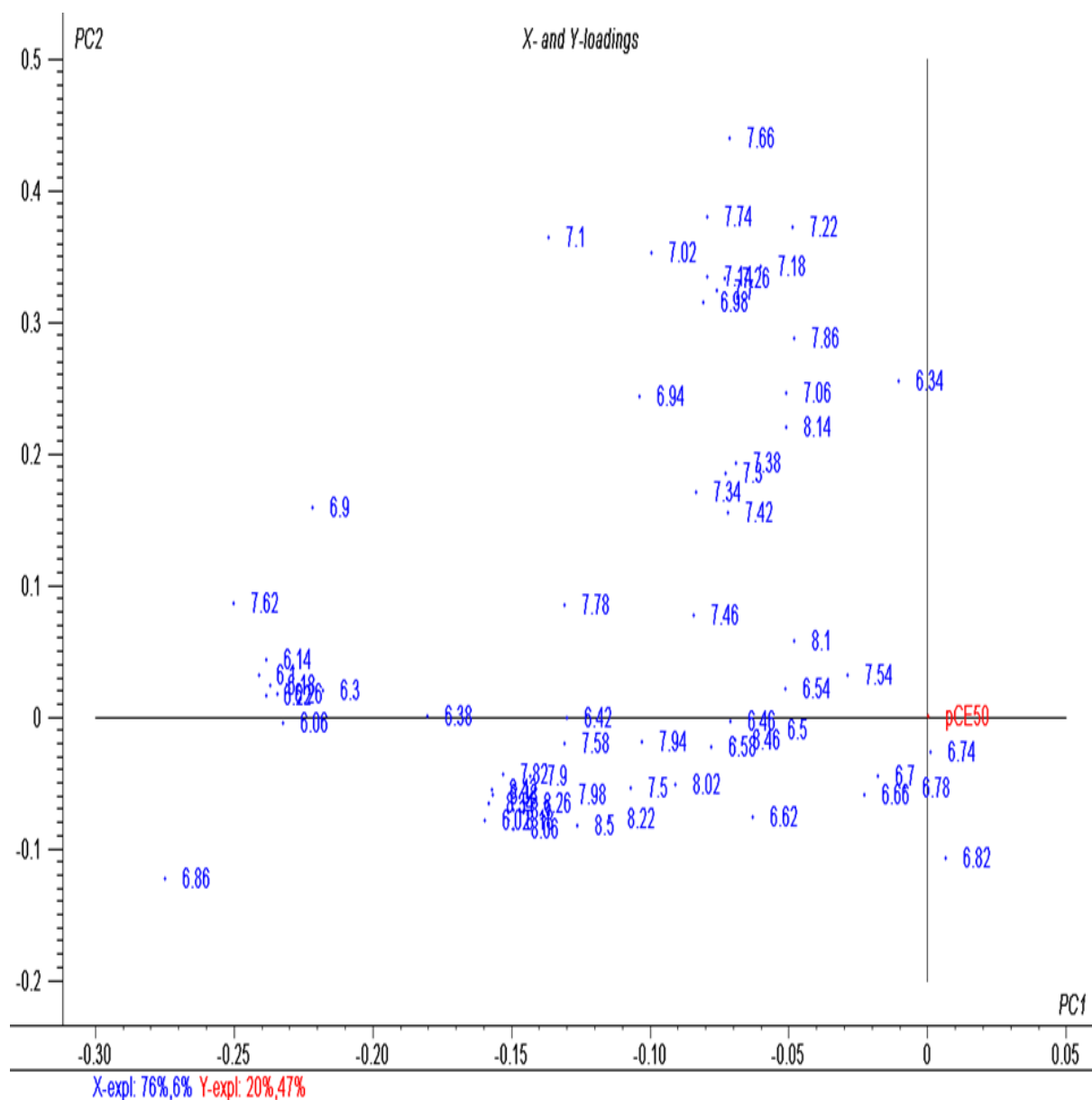
A distribuição das amostras pode ser explicada pelo efeito das variáveis X e Y no gráfico de "loadings" (Gráfico 19), onde os sinais mais próximos da variável dependente Y que representa os valores de pCE<sub>50</sub>, contribuem para o aumento da potência dos extratos.



**Gráfico 18** - "Score" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PLS de espectros RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  6,02 - 8,5 ppm) de amostras de folhas de *C. sympodialis* referentes ao ciclo de coletas (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>) em função dos valores de pCE<sub>50</sub> dos extratos na presença de epitélio funcional.

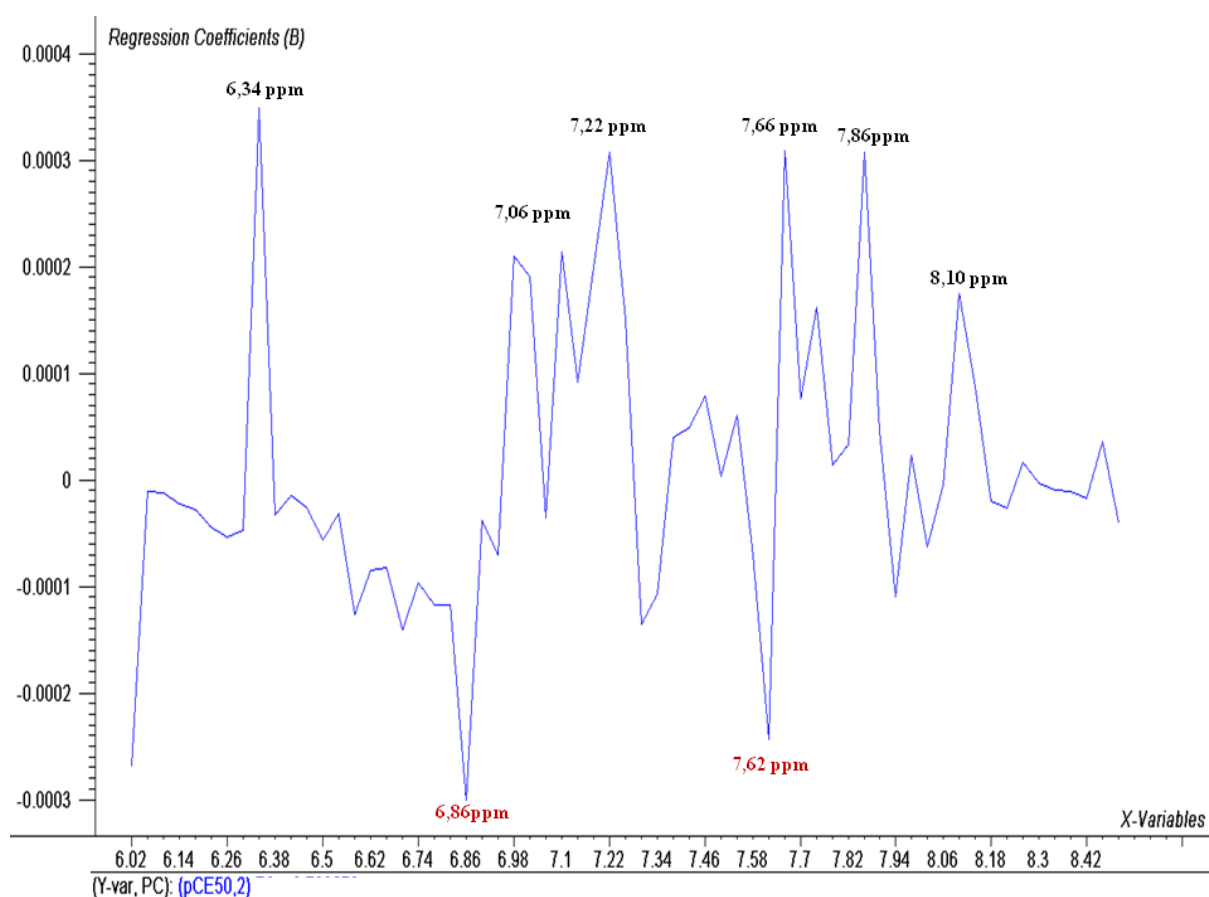


**Gráfico 19** - "Loadings" (PC1 vs PC2) dos resultados obtidos a partir de PLS de espectros RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  6,02 - 8,5 ppm) de amostras de folhas de *C. sympodialis* referentes ao ciclo de coletas (CsF<sub>60</sub> a CsF<sub>210</sub>) em função dos valores de pCE<sub>50</sub> dos extratos na presença de epitélio funcional.



O gráfico do coeficiente de regressão (Gráfico 20) mostra as principais variáveis que se relacionam com o efeito farmacológico. Os sinais representados em preto se comportam de forma positiva em relação a potência dos extratos, ou seja, contribuem para o aumento da potência. De forma contrária, os sinais em vermelho, contribuem de forma negativa, promovendo a diminuição da potência dos extratos.

**Gráfico 20** - Coeficiente de regressão entre os dados de RMN- $^1\text{H}$  ( $\delta$  6,02 - 8,5 ppm) dos extratos das folhas de *C. sympodialis* e os respectivos valores de  $\text{pCE}_{50}$  na presença de epitélio funcional.



# **Discussão**

## 6 Discussão

Os estudos com *Cissampelos sympodialis* destacam o potencial farmacológico do extrato hidroalcoólico das folhas, no que diz respeito às ações broncodilatadora, anti-inflamatória, anti-alérgica e imunomoduladora, essenciais no tratamento da asma. Quanto ao conteúdo químico, os estudos são voltados para o isolamento dos alcaloides, considerados biomarcadores da espécie e aos quais têm sido atribuída a atividade farmacológica. Entretanto, não há maiores informações sobre a composição química desta espécie tão promissora, especialmente de suas frações mais polares, como a aquosa.

Pesquisas apontam melhores resultados para a fração aquosa do extrato etanólico das folhas quando comparados com a fração total de alcaloides ou com os alcaloides isolados (CERQUEIRA-LIMA et al., 2010; VIEIRA et al., 2013). Este fato pode ser explicado pelo efeito aditivo ou sinérgico dos diferentes compostos presentes no extrato e demonstra a necessidade em se conhecer o perfil metabólico da espécie em questão.

Em estudos metabolômicos é importante que a reprodutibilidade do procedimento seja a melhor possível (SCHRIPSEMA, 2010). A análise dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. sympodialis* com o auxílio de técnicas bidimensionais, permitiu a identificação de vinte compostos sem a necessidade de fracionamento e/ou isolamento dos extratos. E demonstrou uma boa reprodutibilidade, que reflete não só na análise utilizada neste trabalho, mas se estende ao preparo da amostra e ao método de extração. Esta condição pode ser observada através da análise visual dos espectros das amostras em quintuplicatas e confirmada pelo agrupamento dessas amostras na análise de PCA, permitindo a formação de seis grupos (Gráfico 7).

O experimento utilizando RMNq- $^1\text{H}$  provou ser altamente adequado para o reconhecimento simultâneo e determinação quantitativa de metabólitos presentes nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. sympodialis*, mesmo sendo considerada uma matriz biológica complexa. Diversos trabalhos vem comprovando a eficiência, a praticidade deste método aplicado a identificação de metabólitos e a importância para o controle de qualidade de plantas medicinais (ROY et al., 2015; KUCHTA et al., 2014; SIMMLER et al., 2014). Dessa forma, o presente estudo investigou a partir de dados de RMNq- $^1\text{H}$ , as mudanças quantitativas nos metabólitos identificados nos extratos das folhas a cada 30 dias de colheita.

Dentre os aminoácidos quantificados por RMNq-<sup>1</sup>H (Gráfico 1, Tabela 5), o mais abundante é o GABA, apresentando maior teor no mês da frutificação, ou seja, na amostra CsF<sub>210</sub>. De forma contrária, o aumento da expressão de genes de GABA-Transaminase (GABA-T) em folhas na fase reprodutiva foi descrito em *Brassica napus* L., (colza ou couve-nabiça), planta cujas sementes se extrai o azeite de colza, utilizado também na produção de biodiesel. O GABA-T catalisa a reação que converte o GABA a semialdeído succínico e sua expressão parece estar envolvida também em resposta ao estresse hídrico (FAES et al., 2015). O GABA é considerado um aminoácido não protéico, encontrado em organismos procariontes e eucariontes. O seu papel em plantas ainda não está bem definido, podendo estar envolvido tanto no desenvolvimento vegetal, como no metabolismo do nitrogênio, na sinalização de processos fisiológicos, quanto na defesa e em resposta ao estresse (LANCIEN; ROBERTS, 2007; BOOZ; PESCADOR, 2007).

Os compostos voláteis, tais como o etanol, ácido fórmico e o ácido acético foram detectados em todas as amostras em baixa concentração, porém durante todo o período de colheita (Tabela 5, Gráfico 2), não sendo observado perdas nos respectivos teores. A presença constante destas substâncias nas amostras dos extratos da espécie pode refletir a boa reprodutibilidade do método, pois os componentes voláteis podem ser completamente ou parcialmente perdidos durante o processo de extração, devido ao número de passos envolvidos e as variações nos parâmetros de extração (TIZIANI et al., 2008).

Dentre os ácidos orgânicos identificados, destaca-se o ácido málico por sua elevada concentração nos extratos, quando comparado aos demais compostos desta classe. Os seus níveis se mantiveram elevados até 90 dias após o plantio, ou seja, no início do estágio vegetativo, seguido de um significativo declínio no período da frutificação (Gráfico 2). Este comportamento é compatível com o verificado em grãos do gênero *Vitis spp.* (uva) em formação, onde o ácido málico é sintetizado até o momento do início da fase de maturação, representando grande importância na determinação da qualidade da uva e na definição do sistema de vinificação (RIZZON; SGANZERLA, 2007). Por outro lado, um estudo semelhante utilizando folhas de *Vanilla planifolia*, uma espécie de orquídea cujos os frutos são largamente empregados na produção de baunilha, detectou uma maior concentração de ácido málico nas folhas maduras (PALAMA et al., 2010). De maneira geral, o ácido málico é conhecido por estar presente em grandes quantidades em sementes e folhas de diversas

espécies vegetais, sendo considerado para algumas espécies o principal ácido orgânico (VALE et al., 2015).

O ácido quínico é considerado um dos metabólitos mais importante encontrado exclusivamente nas plantas através da via chiquimato, sendo responsável pela biossíntese de todos os aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina (BHATIA et al., 2015). Está presente em valores consideráveis na maioria dos vegetais e frutas e têm sido relatadas diversas propriedades biológicas (PERO; LUND, 2011), tais como a atividade anti-inflamatória, propriedade imunológica (BEARA et al., 2015), anti-oxidante e efeitos neurogênicos (LEE et al., 2013). No presente trabalho (Gráfico 3), os compostos derivados do ácido quínico foram detectados em concentrações consideráveis, variando de 8,3 a 35,2 mmol/L, atingindo concentrações significativamente maiores na amostra CsF<sub>210</sub>.

Os carboidratos são gerados pela fotossíntese e constituem a principal fonte de energia para os processos vitais na planta. A glicose é necessária para a síntese de grande número de compostos químicos fundamentais para o metabolismo, dentre eles a sacarose, formada por uma molécula de glicose e uma de frutose (VANDOORME et al., 2012).

A sacarose é o mais abundante e universal dissacarídeo das plantas, sendo considerada uma molécula de transporte, estando envolvida nos processos de crescimento, desenvolvimento, armazenamento, transdução de sinais e aclimação a estresses ambientais (SALERNO; CURATTI, 2003). A variação no seu teor se dá, provavelmente, devido ao movimento natural de conversão da glicose em sacarose e seu transporte do mesófilo para os elementos de tubo crivado, e posterior condução para os tecidos de consumo e armazenamento (NII, 1997; LE HIR et al., 2005).

Este fato pode ser confirmado quando se observa que as flutuações nos níveis da sacarose apresentam uma relação indireta com os níveis de  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose (Gráfico 4), ou seja, no meses em que foram detectados um aumento na concentração da  $\alpha$ -glicose (CsF<sub>90</sub>, C = 11,5 mmol/L; CsF<sub>150</sub>, C = 11,4 mmol/L e CsF<sub>180</sub>, C = 15,9 mmol/L) e  $\beta$ -glicose (CsF<sub>90</sub>, C = 20,9 mmol/L; CsF<sub>150</sub>, C = 20,6 mmol/L e CsF<sub>180</sub>, C = 23,0 mmol/L), os teores de sacarose foram reduzidos (CsF<sub>90</sub>, C = 0,3 mmol/L; CsF<sub>150</sub>, C = 4,4 mmol/L e CsF<sub>180</sub>, C = 0,6 mmol/L).

Os compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados, hidrolisáveis e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados de origem vegetal e podem ser encontrados geralmente em

folhas, flores, raízes e frutos das plantas. O mesmo composto pode ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra. Estas concentrações podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais como radiação solar, raios UV, estações do ano e ainda outros fatores como poluentes que podem alterar o metabolismo da planta (NIJVELDT et al., 2001).

Os flavonoides têm merecido destaque em virtude da sua ampla gama de ações biológicas e terapêuticas demonstradas tanto em condições experimentais como em seres humanos, tais como: atividade antioxidante (YIN et al., 2015), efeito imunomodulador e anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2015), atividade antimicrobiana (SERPA et al., 2012), efeito vascular e cardioprotetor (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008). Os flavonóis, uma das principais classes de flavonoides, são considerados protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que àqueles visíveis ao olho humano, preservando as células vegetais dos danos causados pela foto-oxidação (FERREIRA; OLIVEIRA; SANTOS, 2008).

Apesar da ocorrência frequente dos flavonóis quercetina e caempferol em plantas, este é o primeiro registro da presença de derivados destes compostos na espécie *Cissampelos sympodialis*. Foi encontrado apenas um relato na literatura, da presença de derivado de quercetina no extrato hidroalcoólico das raízes de *Cissampelos pareira* (SEMWAL et al., 2014).

Os perfis dos derivados de quercetina e caempferol nos extratos testados são semelhantes e esta tendência corrobora com a literatura (KUMAR et al., 2015). Apresentam maiores concentrações nas amostras CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>210</sub> (Gráfico 5) e este perfil coincide com os teores de fenólicos totais determinado para os extratos (Gráfico 6, Tabela 6), onde se observa um aumento significativo no período da frutificação (CsF<sub>210</sub>,  $0,98 \pm 0,01$  mg de EAG/100 mg de planta) em relação as amostras CsF<sub>60</sub> ( $0,73 \pm 0,03$  mg de EAG/100 mg de planta) e CsF<sub>180</sub> ( $0,63 \pm 0,03$  mg de EAG/100 mg de planta), onde os níveis de ambos os flavonóis também decaem significativamente.

O teor dos alcaloides warifteína e metilwarifteína nos extratos das folhas de *C. sympodialis* foi determinado por método analítico padronizado utilizando CLAE-UV. Os resultados revelam que seus teores decaem a níveis não detectáveis, a partir de 90 dias após o plantio para a warifteína e a partir de 120 dias para metilwarifteína (Tabela 7). Dado semelhante foi observado em um estudo sazonal da concentração destes biomarcadores no



extrato etanólico, obtido a partir de 100 g de folhas desta espécie, demonstrando que estes alcaloides variam significativamente ao longo do ciclo vegetativo, diminuindo no período de frutificação (MARINHO; BARBOSA-FILHO; OLIVEIRA, 2011). Não foi possível confirmar os sinais dos alcaloides nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, nem mesmo nas amostras com níveis detectáveis destes compostos por CLAE (Figura 17), uma vez que, os sinais destes compostos, provavelmente foram suprimidos quando comparados com os níveis elevados de metabólitos primários. Esta baixa concentração de warifteína e metilwarifteína nos extratos demonstra que eles não devem responder pela atividade espasmolítica dos mesmos.

Para compreender melhor o conjunto de dados gerados pela análise de RMN-<sup>1</sup>H, empregou-se a análise de PCA, uma ferramenta exploratória utilizada na análise metabolômica que permite reduzir um grande número de dados e selecionar os sinais mais abundantes, chamados de componentes principais, proporcionando a visualização das diferenças dentro da amostra (CORREIA; FERREIRA 2007). Os dados foram normalizados pela área com o intuito de analisar diferenças apenas na forma dos perfis gerados por RMN-<sup>1</sup>H, desconsiderando as concentrações destes, dessa forma todos os picos ficam com a mesma área, sabendo que a área dos picos está diretamente relacionada à concentração.

A análise de PCA empregando toda a região espectral aponta uma mudança no perfil metabólico das folhas de *C. sympodialis* a cada trinta dias de colheita, evidenciada pela formação de seis grupos distintos (Gráfico 7). Esta variação é provavelmente, influenciada pelo envelhecimento natural da planta, direcionadas ao crescimento, reprodução e proteção das flores e frutos. Demonstrada pela similaridade entre as amostras de folhas jovens (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>120</sub>), a proximidade entre as amostras CsF<sub>150</sub> e CsF<sub>180</sub> e a maior distinção de CsF<sub>210</sub>, amostra que representa o período de frutificação.

Tal aspecto pode ser explicado através do gráfico de "loadings" (Gráfico 8), ou seja, a influência das variáveis na discriminação das amostras, no qual indica que as folhas jovens são influenciadas pela presença dos carboidratos sacarose e frutose, este perfil corrobora com o resultado encontrado para a quantificação destes açúcares nos extratos (Gráfico 4), onde foi verificado maiores teores de sacarose (CsF<sub>60</sub> e CsF<sub>120</sub>) e de frutose (CsF<sub>90</sub>). A similaridade entre CsF<sub>150</sub> e CsF<sub>180</sub>, se dá a provável abundância de compostos que contenham em sua estrutura metoxilas alifáticas e/ou aromáticas, devido presença dos sinais em 3,38 e 3,7 ppm. Verificou-se ainda que CsF<sub>210</sub> é discriminada pelos sinais atribuídos aos derivados do ácido

quínico, este resultado coincide com o observado no experimento de quantificação, onde estes compostos apresentam maiores teores na amostra em questão (Gráfico 3).

Como o intuito de investigar apenas a influência dos sinais na região de aromáticos na discriminação das amostras (Gráfico 9), a PCA foi novamente aplicada obtendo uma melhor representação da variância dos dados (99%). Evidenciou-se o aumento da similaridade entre as folhas jovens (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>120</sub>), podendo-se sugerir que há uma maior constância no perfil metabólico durante o início do estágio de desenvolvimento da espécie. O gráfico de "loadings" (Gráfico 10) mostra a presença dos sinais atribuídos a quercetina (7,02; 7,62; 7,82 ppm) e ao caempferol (7,02; 8,10 ppm) (Tabela 4). Este dado é compatível com o experimento de quantificação, que confere maior concentração destes compostos e dos teores de fenólicos totais na amostra CsF<sub>210</sub> (Ver Gráfico 5).

Observada uma importante variabilidade química dos metabólitos secundários durante o ciclo vegetativo de *C. sympodialis*, revelada pela redução dos níveis dos alcaloides warifteína e metilwarifteína e o aumento dos teores de flavonoides à medida que a planta se desenvolve em direção ao período de frutificação, buscou-se correlacionar o perfil metabólico com a atividade relaxante sobre o músculo liso de traqueia de cobaia, efeito este já comprovado para a espécie (THOMAS et al., 1997a; THOMAS et al., 1997b).

A cobaia é um animal amplamente utilizado como modelo experimental em pesquisas utilizando o músculo liso, empregando comumente a traqueia e o fêto como órgãos alvo de estudos sobre atividade espasmolítica. A traqueia é considerada um órgão conveniente e clássico para o estudo dos elementos contráteis do músculo liso, por simular de forma satisfatória os fenômenos de constrição das vias aéreas (AMRANI; PANETTIERI, 2003).

O epitélio traqueal tem um importante papel na modulação das respostas a vários agonistas no músculo liso das vias aéreas pulmonares. As células epiteliais modulam o tônus basal e a reatividade do músculo liso pela liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio, tais como o óxido nítrico e PGI<sub>2</sub> (HASHIBA et al., 1999). As células epiteliais também são capazes de sintetizar fatores contráteis, tais como a endotelina e o tromboxano A<sub>2</sub> (ZAGO; ZANESCO, 2006).

O presente estudo demonstrou que todos os seis extratos obtidos das folhas de *Cissampelos sympodialis* relaxaram a traqueia de cobaia pré-contraída com CCh, tanto na ausência como na presença de epitélio funcional. No entanto, na presença de epitélio o extrato CsF<sub>210</sub> demonstrou maior potência relaxante quando comparado aos extratos CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>180</sub>.

(Gráfico 11 e Tabela 8). Este resultado associado às informações químicas apresentadas, indicam que os alcaloides warifteína e metilwarifteína, provavelmente não são os principais responsáveis pelo efeito relaxante observado neste estudo embora tenham sido implicados neste efeito relaxante anteriormente (THOMAS et al., 1997a; CAVALCANTE et al., 2010).

Ademais, observa-se que os extratos CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>180</sub> apresentaram maior potência relaxante na traqueia sem epitélio funcional, enquanto os extratos CsF<sub>120</sub> e CsF<sub>150</sub> apresentaram potência relaxante semelhante em traqueias na ausência e na presença do epitélio e que, o extrato CsF<sub>210</sub> apresentou maior potência relaxante na traqueia com epitélio íntegro (Gráfico 11 e Tabela 8). Dessa forma, pode-se sugerir o efeito relaxante promovido pelos extratos CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>180</sub> pode ocorrer diretamente no músculo liso traqueal e que esses extratos devem conter substâncias que induzem a liberação de fatores contráteis do epitélio das vias aéreas, uma vez que na sua presença a potência relaxante desses extratos foi prejudicada. Contrariamente, é possível que no extrato CsF<sub>210</sub> existam constituintes que induzem a liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio, uma vez que sua potência relaxante foi maior na presença de epitélio.

Procurando-se ratificar as informações apresentadas até aqui, foi investigada a correlação entre os teores de alcaloides e a potência relaxante dos extratos em traqueia de cobaia (Gráfico 12). O resultado mostra que apenas 33% e 38% da atividade relaxante dos extratos na presença e na ausência de epitélio funcional respectivamente, pode ser prevista com base no teor de alcaloides. Um dado interessante, é que a concentração de alcaloides parece contribuir para a atividade relaxante apenas na ausência de epitélio, através de uma fraca relação inversamente proporcional aos valores de CE<sub>50</sub>.

Considerando que a concentração de alcaloides pode ser afetada por condições ambientais, o gráfico de correlação linear (Gráfico 13) mostra que estes compostos não sofreram influência do índice pluviométrico registrado na cidade de João Pessoa durante o período de colheita das folhas.

Um estudo semelhante, relacionando o perfil químico dos óleos essenciais de *Lippia thymoides* obtidos de coletas realizadas nas quatro estações do ano e o efeito farmacológico testado em diferentes ensaios *in vitro*, evidenciou uma variabilidade química, não influenciada pelos fatores climáticos e demonstrou que estes óleos são capazes de relaxar a aorta e útero isolados de rato e, em menor eficácia, a traqueia isolada de cobaia (SILVA et al., 2015).

No entanto, foi possível estabelecer uma relação entre o teor de fenólicos totais e a potência relaxante dos extratos (Gráfico 14) na presença de epitélio, onde foi verificada uma forte relação inversamente proporcional, atingindo uma correlação de 78%, ou seja, quanto maior a concentração de fenólicos, menor o valor da  $CE_{50}$ , o que significa que esses compostos de fato estão envolvidos com a atividade relaxante em traqueia de cobaia. Por outro lado, quando se avalia a potência dos extratos na ausência de epitélio funcional, observa-se uma relação moderada diretamente proporcional (49 %), no qual o aumento do teor de fenólicos promove a diminuição da potência relaxante dos extratos.

Um relação moderada inversamente proporcional, foi observada entre o teor de ácido quínico e a potência relaxante dos extratos (Gráfico 15) na presença de epitélio, dessa forma quanto maior a concentração de ácido quínico, menor o valor da  $CE_{50}$ , o que significa que esses compostos também podem contribuir com o efeito relaxante em traqueia de cobaia.

O método multivariado PLS foi aplicado neste estudo para identificar os sinais significativos responsáveis pela correlação entre o perfil químico e os dados de bioatividade. O modelo apresentou alta correlação entre os dados preditos e de referência, com valores de coeficientes de determinação para os conjuntos de amostras de calibração (Gráfico 16) e validação (Gráfico 17) muito próximos.

Assim, a análise foi realizada entre os dados de RMN- $^1H$  na região de aromáticos (6,02 a 8,5 ppm) e a  $pCE_{50}$  dos extratos na presença de epitélio, uma vez que é nesta região que se encontram os sinais norteadores de compostos secundários de interesse, tais como flavonoides e alcaloides; permitindo avaliar o comportamento destes sinais, sem a interferência dos metabólitos primários presentes em abundância nos extratos. Dessa forma, o gráfico de "score" da PLS (Gráfico 18) revelou a discriminação das amostras de forma compatível com a potência dos extratos, indicando que a região selecionada do espectro é realmente importante na relação entre os dados, principalmente para a amostra  $CsF_{210}$ .

O gráfico do coeficiente de regressão (Gráfico 20) permitiu identificar os sinais que contribuem de forma positiva para o aumento da potência dos extratos, e apontam a contribuição dos derivados dos flavonóis quercetina (6,34; 7,06; 7,66 e 7,86 ppm) e caempferol (6,34; 7,06 e 8,10 ppm). A variável em 7,22 que oferece uma forte correlação positiva, foi atribuída ao aminoácido tirosina, no entanto, a variável em 6,86 que representa a região em que se encontra o outro sinal norteador de sua molécula, também oferece uma forte

relação negativa, o que nos leva a pensar que este composto provavelmente não contribui para o aumento da potência do extrato.

Não foi possível relacionar nenhuma substância até o momento, para a variável em 7,62 ppm que se relaciona de forma negativa a potência dos extratos, porém foi possível identificar um duplo dubleto nesta região.

Um estudo do fracionamento químico biomonitorado realizado com a fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *C. sympodialis*, mostrou que as frações eluídas com 25 % e 50% de metanol apresentaram uma maior quantidade de compostos fenólicos, além de uma maior atividade antioxidante. A pesquisa permitiu o isolamento de três flavonoides glicosilados da fração eluída com 50% de metanol: Quercetina 3-O-[ $\beta$ -D-Galactopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo], kaempferol 3-O-[ $\beta$ -D-Galactopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo] e vicenina 2 (isovitexina 8-C-glicosídeo), dados não publicados. E destaca o papel de substâncias polares, possivelmente fenólicos e flavonoides como responsáveis pela ação anti-inflamatória observada para a fração aquosa do extrato etanólico das folhas (GOMES, 2015).

Pesquisas sugerem que o kaempferol (CHUNG et al., 2015) e a quercetina (OLIVEIRA et al., 2015) são candidatos promissores como agentes terapêuticos, podendo prevenir ou tratar a asma alérgica, através de suas propriedades imunomoduladoras e broncodilatadoras. Em nosso estudo os compostos fenólicos parecem contribuir para a atividade relaxante da espécie, em especial derivados da quercetina e do kaempferol. Entretanto, são necessários estudos complementares, a fim de explicar a participação destes compostos na atividade farmacológica dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*.

A análise metabolômica baseada em RMN e em conjunto com modelos de análise multivariada, forneceu informações mais detalhadas à respeito do conteúdo químico de *Cissampelos sympodialis*, demonstrando através de um método reprodutível que existe uma importante variabilidade a nível de metabólitos secundários que interfere com a atividade farmacológica testada neste estudo.

# **Conclusões**

## 7 Conclusões

Diante dos resultados apresentados no presente estudo, conclui-se que:

- O estudo dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H obtidos dos seis extratos hidroalcoólicos das folhas de *Cissampelos sympodialis*, baseado em metodologia metabolômica, permitiu a identificação simultânea de diversos compostos, dentre metabólitos primários e secundários, presentes em todas as amostras;
- Por meio de RMNq-<sup>1</sup>H foi possível quantificar os compostos identificados e apontar os carboidratos como os compostos de maior concentração nos extratos, seguido do ácido málico e derivados do ácido quínico;
- Os teores dos alcaloides majoritários decaem no sentido da frutificação, enquanto os compostos fenólicos e os flavonóis quercetina e caempferol, se comportam de forma contrária, aumentando os seus níveis;
- A análise de PCA mostrou que os carboidratos são os maiores responsáveis pela discriminação das folhas jovens (CsF<sub>60</sub>, CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>120</sub>) e os derivados do ácido quínico, quercetina e caempferol contribuem para a distinção da amostra CsF<sub>210</sub>.
- Os resultados obtidos *in vitro* indicam que todos os seis extratos apresentaram atividade relaxante sobre o músculo liso de traqueia de cobaia, sendo o extrato CsF<sub>210</sub> mais potente em relação aos extratos CsF<sub>90</sub> e CsF<sub>180</sub> na presença de epitélio íntegro. E que a diferença de potência nos extratos testados em anéis com e sem epitélio, indica a participação de fatores relaxantes ou contráteis dependentes do epitélio das vias aéreas;
- O efeito relaxante observado neste estudo não depende diretamente da presença dos alcaloides warifteína e metilwarifteína, uma vez que não foram detectados no extrato mais

potente e não foi observada correlação entre os teores de alcaloides e a potência relaxante dos extratos em traqueia de cobaia;

- Verificou-se uma forte relação entre a concentração de fenólicos e o aumento da potência dos extratos na presença de epitélio, o que significa que esses compostos de fato estão envolvidos com a atividade relaxante em traqueia de cobaia;
- A análise PLS permitiu estabelecer a correlação entre o o perfil químico e a atividade farmacológica, destacando os derivados dos flavonóis quercetina e caempferol como os principais responsáveis pelo aumento da potência relaxante dos extratos das folhas de *Cissampelos sympodialis*.



# **Referências**

## 9 Referências

- AESA: **Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba**. Governo da Paraíba, 2012. Disponível em: <<http://www.aesa.pb.gov.br/>>. Acesso em 30.09.2012.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* EICHLER**. 1994. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1994.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. Modulation of B lymphocyte function by the aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, n. 11, p. 1511-1522, 2003.
- ALLWOOD, J.W.; GOODACRE, R. An Introduction to Liquid Chromatography- Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. **Phytochemical Analysis**. v. 21, p. 33-47, 2009.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; ASSIS, T. S.; MEDEIROS, I. A.; THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 63, n. 3, p. 247-252, 1998.
- ALMEIDA, R. N.; MELO-DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; NAVARRO, D. S.; FALCÃO, A. C. G. M.; DUARTE, J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Anorectic and behavioural effects of chronic *Cissampelos sympodialis* treatment in female and male rats. **Phytotherapy Research**. v. 19, p. 121-124, 2005.
- AMRANI, Y.; PANETTIERI, R. A. Airway smooth muscle: contraction and beyond. **The International Journal of Biochemistry & Biology**. v. 35, n. 3, p. 272-276, 2003.
- ARAGÃO, C. F. S. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Padronização de Extratos de *Cissampelos Sympodialis* EICHL (Milona)**. 2002. Tese (Doutorado em Produtos Naturais) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.
- ARCHER, S. L. Potassium channels and erectile dysfunction. **Vascular Pharmacology**. v. 39, n. 1, p. 61-71, 2002.
- ASSIS, A. C. L.; ARAÚJO, I. G. A.; LIMA, R. P. C.; ALMEIDA, M. M.; MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CRUZ, J. S.; SILVA, D. F.; MEDEIROS, I. A. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, induces relaxation by activating potassium channels in vascular myocytes. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 40, p. 37-44, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Journal of the Brazilian Association Advanced Science**. v. 49, n. 5/6, p. 386-394, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Review: Family Menispermaceae. **The Alkaloids**. Chapman and Hall, v. 54, Chapter 1, p. 1-189. 2000.

BARROSO, C. M. **Sistemática de angiosperma do Brasil**. São Paulo: EDUSP, 1978.

BATISTA-LIMA, K. V.; RIBEIRO, R. A.; BALESTIERI, F. M. P.; THOMAS, G.; PIUVEZAM, M. R. Anti-inflammatory Activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Leaf Extract. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 20, n. 4, p. 275-9, 2001.

BEARA, I.; ZIVKOVIĆ, J.; LESJAK, M.; RISTIĆ, J.; SAVIKIN, K.; MAKSIMOVIĆ, Z.; JANKOVIĆ, T. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three *Veronica* species. **Industrial Crops and Products**. v. 63, p. 276-280, 2015.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**. v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; BALESTIERI, F. M. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; PEÇANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, n. 23, p. 191-197, 2004.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; PEÇANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) inhibits anaphylactic shock reaction in murine allergic model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n. 4, p. 287-291, 2005.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**. v. 6, n. 7, p. 1152-1160, 2006.

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

BHATIA, A.; BHARTI, S. K.; TRIPATHI, T.; MISHRA, A.; B, SIDHU, O. P.; ROY, R.; NAUTIYAL, C. S. Metabolic profiling of *Commiphora wightii* (guggul) reveals a potential source for pharmaceuticals and nutraceuticals. *Phytochemistry*. v. 110, p. 29-36, 2015.

BINNECK, E. As ômicas: Integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 32, p. 28-37. 2004.

BINO, R. J.; HALL, R. D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B. J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M. H.; TRETHEWEY, R. N.; LANGE, B. M.; WURTELE, E. S.; SUMNER, L. W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**. v. 9, n. 9, p. 418-425, 2004.

BOOZ, M. R.; PESCADOR, R. Efeito do Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Gaba) na Embriogênese Somática de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. 2, p. 198-200, 2007.

BRAGA, J. M. A. *Menispermaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10028>>. Acesso em: 09 Ago. 2015.

CAPRINI, G. P. Metabolômica de Plantas: Análise Fitoquímica de *Pentas Lanceolata*, Estudos com Culturas Celulares e Experimentos Iniciais de Biossíntese com Precursores Marcados Utilizando uma Espécie de *Mentha* como Sistema Modelo. 2007. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2007.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 11, p. 1-24, 2011.

CAVALCANTE, H. M. M.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, D. F.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14-Dihydromorphinandienone Alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 108, n. 2, p. 122–130, 2010.

CAVALCANTI A. C.; MELO, I. C. A. R.; MEDEIROS, A. F. D.; NEVES, M. V. M.; PEREIRA, A. N.; OLIVEIRA, E. J. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 23, n. 3, p. 1-15, 2013.

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, n. 1, p. 70-78, 2014.

CERQUEIRA-LIMA, A. T.; NEVES, N. M. A.; CARVALHO, L. C. P.; COSTA, R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M.; RUSSO, M.; BARBOZA, R.; OLIVEIRA, E. J.; MARINHO, A.; FIGUEIREDO, C. A. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 1458-1467, 2010.

CHAN, E. C. Y.; PASIKANTI, K. K.; HONG, Y.; HO, P. C.; MAHENDRAN, R.; MANI, L. R. N.; CHIONG, E.; ESUVARANATHAN, K. Metabonomic Profiling of Bladder Cancer. **Journal of Proteome Research**. v. 14, n. 2, p. 587-602, 2015.

CHANG, K. L.; PEE, H. N.; TAN, W. P.; DAWE, G. S.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; HO, P. C. Metabolic profiling of CHO-A $\beta$ PP695 cells revealed mitochondrial dysfunction prior to amyloid- $\beta$  pathology and potential therapeutic effects of both PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  Agonisms for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease**. v. 44, n. 1, p. 215-231, 2015.

CHUNG, M. J.; PANDEY, R. P.; CHOI, J. W.; SOHNG, J. K.; CHOI, D. J.; PARK, Y. I. Inhibitory effects of kaempferol-3-O-rhamnoside on ovalbumin-induced lung inflammation in

a mouse model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**. v. 25, p. 302 - 310, 2015.

CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. Fisiologia Humana de Houssay. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CORREIA, A. C. C. Estudo Comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

CÔRTEZ, S. F.; ALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**. v. 9, n. 8, p. 579-583, 1995.

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

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

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**. v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DEFREITAS, M. R.; ALENCAR, J. L.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Milonine, a novel 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**. v. 40, n. 5, p. 1553-1555, 1995.

DEFREITAS, M. R.; CORTES, S. F.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. Modification of  $Ca^{2+}$  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.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W.  $Ca^{2+}$  entry through plasma membrane  $IP_3$  receptors. **Science**. v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.

DESSÌ, A.; MARINCOLA, F. C.; MASILI, A.; GAZZOLO, D.; FANOS, V. Clinical Metabolomics and Nutrition: The New Frontier in Neonatology and Pediatrics. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 8, 2014.

DEY, Y. N.; OTA, S.; SRIKANTH, N.; JAMAL, M.; WANJARI, M. A phytopharmacological review on an important medicinal plant - *Amorphophallus paeoniifolius*. v. 33, n. 1, p. 27-32, 2002.

DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; CUNHA, M. A. L.; DUARTE, J. C.; MORAIS, M. A.; MEDEIROS, I. A. Subacute toxicology studies on the aqueous fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in dogs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, p. 87-89, 2002.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

FAËS, P.; NIOGRET, M. F.; MONTES, E.; CAHÉREC, F. L.; BOUCHEREAU, A.; DELEU, C. Transcriptional profiling of genes encoding GABA-transaminases in *Brassica napus* reveals their regulation by water deficit. **Environmental and Experimental Botany**. v. 116, p. 20 - 31, 2015.

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

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On-line**. v. 2, n. 2, p. 57-60, 2008.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**. v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FONSECA, F. V.; FIGUEIRÊDO, C. A. **Aspectos agronômicos da *Cissampelos sympodialis* Eichl**. 1999. Nota Técnica, p. 3. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): **Critical Path Opportunities Report and List**. Department of Health and Human Services. Estados Unidos da América. p. 37, 2006.

FREDERICH, M.; JANSEN, C.; TULLIO, P.; TITS, M.; DEMOULIN, V.; ANGENOT, L. Metabolomic analysis of *Echinacea* spp. by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate data analysis technique. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 1, p. 61-65, 2009.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 22, p. 32-39, 2001.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, n. 4, p. 347-354, 2005.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue

culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**. v. 36, n.10, p. 1605-1609, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GÖDECKE, T.; YAO, P.; NAPOLITANO, J. G.; NIKOLIĆ, D.; DIETZ, B. M.; BOLTON, J. L.; BREEMEN, R. B. V.; FARNSWORTH, N. R.; CHEN, S. N.; LANKIN, D. C.; PAULI, G. F. Integrated standardization concept for *Angelica botanicals* using quantitative NMR. **Fitoterapia**. v. 83, n. 1, p. 18-32, 2012.

GOMES, A. N. P. **Fracionamento químico biomonitorado da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* eichl. (milona)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**. v. 87, n. 3, p. 393-400, 2004.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

HASHIBA, K. M.; SATO, T.; HIROTA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUKI, A. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesthesia & Analgesia**. v. 89, p. 191 - 196, 1999.

HEYMAN, H. M.; MEYER, J. J. M. NMR-based metabolomics as a quality control tool for herbal products. **South African Journal of Botany**. v. 82, n. 1, p. 21–32, 2012.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 27, p. 1-21, 2011.

IBRAHIM, B.; MARSDEN, P.; SMITH, J. A.; CUSTOVIC, A.; NILSSON, M.; FOWLER, S. J. Breath metabolomic profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy in asthma. **Allergy**. v. 68, p. 1050–1056, 2013.

KACHIGAN, S. K. **Multivariate Statistical Analysis**. New york: Radius Press. p. 303, 1991.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**. v. 5, n. 3, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. **Trends in Biotechnology**. v. 29, n. 6, p. 267–275, 2011.

KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample Preparation for Plant Metabolomics. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 1, p. 4-13, 2010.

KUCHTA, k.; ORTWEIN, J. HENNIG, L.; RAUWALD, H. W. <sup>1</sup>H-qNMR for direct quantification of stachydrine in *Leonurus japonicus* and *L. cardiaca*. **Fitoterapia**. v. 96, p. 8 - 17, 2014.

KUMAR, B.; PRAKASH, A.; RUHELA, R. K.; MEDHI, B. Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. **Pharmacological Reports**. v. 66, p. 956-963, 2014.

KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAIA, V.; SINGHA, A.; SRIVASTAVAB, M.; MISHRAD, D. K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial Crops and Products**. v. 69, p.143-152, 2015.

LANCIEN, M.; ROBERTS, M. R. Does GABA Act as a Signal in Plants? **Plant Signaling & Behavior**. v. 2, n. 5, p. 408-409, 2007.

LEE, S. Y.; MOON, E.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Quinic acid derivatives from *Pimpinella brachycarpa* exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, p. 2140-2144, 2013.

LE HIR, R.; LEDUC, N.; JEANNETTE, E.; VIEMONT, J. D.; PELLESCI-TRAVIER, S. Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur*). **Tree Physiology**. v. 26, p. 229-238, 2005.

LI, X. Z.; ZHANGA, S. N.; LUA, F.; LIU, C. F.; WANG, Y.; BAI, Y.; WANG, N.; LIU, S. M. Cerebral metabonomics study on Parkinson's disease mice treated with extract of *Acanthopanax senticosus* harms. **Phytomedicine**. v. 20, n.1, p. 1219-1229, 2013.

LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS, T. S.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BRAZFILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in guinea-pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung B**. v. 60b, p. 1093-1100, 2005.

LIMA, T. F. A.; ROCHA, J. D. B.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DECOTÉ-RICARDO, D.; SARAIVA, E. M.; ARRUDA, L. B., PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. Warifteine, na Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, Inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research**. v. 2014, p. 1-12. 2014.

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

LIRA, G. A.; ANDRADE, L. M.; FLORÊNCIO, K. C.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. **Fitoterapia**. v. 73, n. 4, p. 356-358, 2002.

LIU, W.; LIU, J.; YIN, D.; ZHAO, X. Influence of Ecological Factors on the Production of Active Substances in the Anti- Cancer Plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. **Plos One**. v. 10, n. 4, 2015.



LÓPEZ-GRESA, M. P.; MALTESE, F.; BELLÉS, J. M.; CONEJERO, V.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolic Response of Tomato Leaves Upon Different Plant-Pathogen Interactions. **Phytochemical Analysis**. v. 21, p. 89-94, 2010.

LYRA, W. S.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1594-1597, 2010.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.

MAIOR, F. N. S.; SIQUEIRA, J. S.; BARBOSA, M. D. S.; ALMEIDA, R. N. Desenvolvimento Pós-natal da prole exposta ao extrato hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o período gestacional de ratas. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 22, n. 4, p. 321-5, 2003.

MALONEY, V. Plant Metabolomics. *Bio Teach Journal*. v. 2, p. 92-99, 2004.

MALTESE, F.; KOORY, F. V.; VERPOORTE, ROBERT, V. Solvent Derived Artifacts in Natural Products Chemistry. **Natural Product Communications**. v. 4, n. 3, p. 447-454, 2009.

MANGUEIRA, L. F.; BRAZ, A. S.; MANGUEIRA, D. B.; DINIZ, M. F. F. A Ação do *Cissampelos sympodialis* Eichl.: uma Perspectiva para o Tratamento da Asma. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.14, n. 2, p. 77-86, 2010.

MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. A Validated Method for the Simultaneous Quantitation of Bioactive Alkaloid Markers in the Leaf Ethanolic Extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl.: a Phenological Variation Study. **Phytochemical Analysis**. v. 23, n. 5, p. 426 - 432, 2011.

MARINHO, A. F.; OLIVEIRA, E. J.; TAVARES, J. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C 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.

MATTES, W.; DAVIS, K.; FABIAN, E.; GREENHAW, J.; HEROLD, M.; LOOSER, R.; MELLERT, W.; GROETERS, S.; MARXFELD, H.; MOELLER, N.; MONTROYA-PARRA, G.; PROKOUDINE, A.; RAVENZWAAY, VAN.; STRAUSS, V.; WALK, T.; KAMP, H. Detection of hepatotoxicity potential with metabolite profiling (metabolomics) of rat plasma. **Toxicology Letters**. v. 230, p. 467-478, 2014.

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**. v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.

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. Tese (Doutorado em Produtos Naturais), 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. **Phyromedicine**. v. 5, n. 2, p. 97-102, 1998.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Lettes** v. 142, n.1, p. 143-151, 2003.

MENDONÇA-NETTO, S.; VARELA, R. W. B.; FECHINE, M. F.; QUEIROGA, M. N. G.; SOUTO-MAIOR, F. N.; ALMEIDA, R. N. Antidepressant effects of total tertiary alkaloid fraction of *Cissampelos sympodialis* Eichl in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 2, p. 165-169, 2008.

MUKHERJEE, R.; KEIFER, P. A. Warifteine and methylwarifteine:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 41, p. 213-218, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 95- 111, 2004.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NII, N. Changes of starch and sorbitol in leaves before and after removal of fruits from peach trees. **Annals of Botany**. v. 79, p. 139-144, 1997.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 418- 425, 2001.

OLIVEIRA-JÚNIOR, W. M.; BATISTA BENEDITO, R.; SANTOS, C. C. M. P.; RODRIGUES, L. T. D.; MARINHO, A. F.; MORAIS, L. C. S. L.; MELO-DINIZ, M. F. F.; 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, p. 333 - 337, 2011.

OLIVEIRA, T. T.; CAMPOS, K. M.; CERQUEIRA-LIMA, A. T.; CARNEIRO, T. C. B.; VELOZO, E. S.; MELO, I. C. A. R.; FIGUEIREDO, E. A.; OLIVEIRA, E. J.; VASCONCELOS, D. F. S. A.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; NEUZA MARIA ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; FIGUEIREDO, C. A. Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 23, n. 18, p. 18-30, 2015.

PALAMA, T. L.; FOCK, I.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; KODJA, H. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. **Phytochemistry**. v. 71, p. 567-573, 2010.

PANERO, F. S.; VIEIRA, M. F. P.; CRUZ, A. M. F.; MOURA, M. F. V.; SILVA, H. E. B. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética Química**. v. 34, n. 3, p. 33-40, 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERO, R. W.; LUND, H. Quantitative Analytical Method Development for the Assessment of Bioactive Quinic Acid-type Esters and Free Quinic Acid in Dietary Supplements. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**. v. 7, n. 2, p. 293-304, 2011.

PIMENTA, L. P. S.; KIM, H. K.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. NMR-Based Metabolomics: A Probe to Utilize Biodiversity. In: ROESSNER, U.; DIAS, D. A. **Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Springer Protocols, v. 1055, p. 117-127, 2013.

PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T.; ALESANDER, J.; THOMAS, G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. Leaf extract increases the production of il-10 by concanavalin-A treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 93-101, 1999.

PODGORSKII, V. V.; MIKHALEV, A. S.; KALABIN, G. A. Quantitative NMR Spectroscopy for Quality Control of Drugs and Pharmaceuticals. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 45, n. 3, 2011.

PORTO, N. M., BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 1, p. 102-107, 2008.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. de uva em Bento Gonçalves-RS. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 911-914, 2007.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in Toxicology: A Review. **Toxicological Sciences**. v. 85, p. 809-822, 2005.

ROCHA, J. T. C. **Emprego de espectrometria no infravermelho e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de petróleos a partir de misturas de frações de diesel**. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

ROESSNER, U.; BACIC, A. Metabolomics in plant research. Special Technical Feature. v. 40, n. 3, p. 9-11, 2009.

- ROCHA, J. D. B.; DECOTÉ-RICARDO, D.; REDNER, P.; LOPES, U. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; ARRUDA, L. B.; PEÇANHA, L. M. T. Inhibitory Effect of the Alkaloid Warifteine Purified from *Cissampelos sympodialis* on B Lymphocyte Function *In Vitro* and *In Vivo*. *Planta Medica*. v. 76, p. 325-330, 2010.
- ROY, S. K.; BAIRWA, K.; GROVER, J.; SRIVASTAVA, A.; JACHAK, S. M. Determination of negundoside and agnuside in *vitex negundo* by qnmr and method validation. *Journal of Analytical Chemistry*. v. 70, n. 5, p. 639 - 646, 2015.
- SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? *Trends in Plant Science*. v. 8, p. 63-69, 2003.
- SANTOS, H. A. S.; SILVA, M. V. R.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; RIBEIRO, L. A. A.; LIMA, J. T. Avaliação da atividade relaxante do extrato etanólico bruto obtido de *erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum subrotundum* e *Erythroxylum revolutum* (Erythroxylaceae) em traqueia isolada de cobaia. *Evolvere Scientia*. v. 1, n. 1, p. 119-133, 2013.
- SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de  $^1\text{H}$  para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*. v. 36, n. 2, p. 324-330, 2013.
- SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects. *Phytochemical Analysis*. v. 21, n. 1, p. 14-21, 2010.
- SEGER, C.; STURM, S. Analytical aspects of plant metabolic profiling platforms: Current standings and future aims. *Journal Proteome Research*. v. 6, n. 2, p. 480-497, 2007.
- 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, p. 1011-1028, 2014.
- SERPA, R.; FRANÇA, E.; MAIA, L.; ANDRADE, C.; DINIZ, A.; FURLANETO, M. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*. v. 61, p. 1704-1709, 2012.
- SOININEN, P.; KANGAS, A. J.; WUERTZ, P.; SUNA, T.; ALA, K. M.; WURTZ, P. Quantitative serum nuclear magnetic resonance metabolomics in cardiovascular epidemiology and genetics. *Circulation. Cardiovascular genetics*. v. 8, n. 1, p. 192 -206, 2015.
- SILVA, F. S.; MENEZES, P. M. N.; SÁ, P. G. S.; OLIVEIRA, A. L. S.; SOUZA, E. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, T. R. S.; PERALTA, E. D.; LUCCHESI, A. M. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. *Pharmaceutical Biology*. p. 1-10, 2015.
- SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 25, p. 51-59, 2014.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**. v. 35, n. 1, p. 223 - 229, 2012.

SOUZA, I. L. L. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Xylopia frutescens* Aubl. envolve a redução dos níveis citosólicos de cálcio em íleo de cobaia**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**. v. 132, p. 199-208, 2008.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 7, n. 3, p. 1089 -1099, 2008.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; AGRA, M. F.; DINIZ, M. F. F.; BACHELET, M.; VAGAFTIG, B. Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leukocytes. **Phytotherapy Research**. v. 9, n. 7, p. 473-477, 1995.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; DUARTE, J. C.; SOUZA, D. P. Bronchodilatory activity of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in guinea-pig. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 233-238, 1997a.

THOMAS, G.; BURNS, F.; PYNE, S.; PYNE, N. J. Characterisation on an extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea, cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and intracellular cAMP. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 7, p. 496-499, 1997b.

THOMAS, G.; SELAK, M.; HENSO, P. M. Effects of the aqueous fraction of ethanol extracts of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl in human neutrophils. **Phytotherapy Research**. v. 13, n. 1, p. 9-13, 1999.

TIZIANI, S.; EMWAS, A. H.; LODI, A.; LUDWIG, C.; BUNCE, C. M.; VIANI, M. R.; GUNTHER, U. L. Optimized metabolite extraction from blood serum for <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytical Biochemistry**. v. 377, p. 16 -23, 2008.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

TUGIZIMANA, F.; PIATER, L.; DUBERY, I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. **South African Journal of Science**. v. 109, n. 5/6, p. 1-11, 2013.

TYAGI, S.; RAGHVENDRA; SINGH, U.; KALRA, T.; MUNJAL, K. Applications of metabolomics - a systematic study of the unique chemical fingerprints: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v. 3; n. 1, p. 83-86, 2010.

VALE, A. P.; SANTOS, J.; MELIA, N.; PEIXOTO, V.; BRITO, N. V.; OLIVEIRA, B. P. P. Phytochemical composition and antimicrobial properties of four varieties of *Brassica oleracea* sprouts. **Food Control**. v. 55, p. 248 - 256, 2015.

- VANDOORNE, B.; MATHIEU, A. S.; VAN DER ENDE, W.; VERGAUWEN, R.; PÉRILLEUX, C.; JAVAUX, M.; LUTTS, S. Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**. v. 63, p. 4359–4373, 2012.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; MUSTAFA, N. R.; KIM, H. K. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Reviews**. v. 7, n. 3, p. 525–537, 2008.
- VIANT, M. R. Recent developments in environmental metabolomics. **Molecular BioSystems**. v. 4, n. 10, p. 980–986, 2008.
- VIEIRA, G. C.; DE LIMA, J. F.; DE FIGUEIREDO, R. C.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+T Cells. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 6, p. 916–925, 2013.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 9, n. 36, p. 58–69, 2006.
- VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 8, n. 3, p. 303–313, 2001.
- WATERHOUSE, A. L. **Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine**. 2012. Disponível em: <<http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>>. Acesso em: 28 jan. 2014.
- WISHART, D. S.; TZUR, D.; KNOX, C., et al., **HMDB: the Human Human Metabolome Database**. *Nucleic Acids Res.* v. 35, (Database issue):D521–6. 17202168, 2007.
- WOLD, S.; SJOSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 58, p. 109–130, 2001.
- WU, T.; YANG, M.; LIU, T.; YANG, L.; JI, G. A. Metabolomics Approach to Stratify Patients Diagnosed with Diabetes Mellitus into Excess or Deficiency Syndromes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 350703, 2015.
- XIE, G.; LU, L.; QIU, Y.; NI, Q.; ZHANG, W.; GAO, Y. T.; RISCH, H. A.; YU, H.; JIA, W. Plasma Metabolite Biomarkers for the Detection of Pancreatic Cancer. **Journal of Proteome Research**. v. 14, p. 1195–1202, 2015.
- XU, X.; CHENG, S.; DING, C.; LV, Z.; CHEN, D.; WU, J.; ZHENG, S. Identification of bile biomarkers of biliary tract cancer through a liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomic method. **Molecular Medicine Reports**. v. 11, n. 3, p. 2191–2198, 2015.
- YANG, D. Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism. **Engineering in Life Science**. v. 14, n. 5, p. 456–466, 2014.
- YIN, D. DAN.; YUAN, R. Y.; WUA, Q.; C, LI, S. S.; SHAO, S.; XU, Y. J.; HAO, X. H.; WANG, L. S. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. **Food Chemistry**. v. 187, p. 20–28, 2015.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 87, n. 6, p. 264 - 270, 2006.

ZHANG, A.; SUN, H.; QUI, S.; WANG, X. Metabolomics insights into pathophysiological mechanisms of nephrology. **International Urology and Nephrology**. v. 46, p. 1025-1030, 2014.

ZHANG, J.; ZHANG, YONG.; DU, Y.; CHEN, S.; TANG, H. Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. **Journal of Proteome Research**. v. 10, p. 1904-1914, 2011.

# Anexo

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 25 de julho de 2012.

CEUA Nº 0705/12

Ilmo(a). **Profa Dra Bagnólia Araújo da Silva**  
Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a) : **Ingrid Christie Alexandrino Ribeiro de Melo**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **25/07/12** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **ANÁLISE DA VARIAÇÃO SAZONAL DE MARCADORES QUÍMICOS DE Cissampelos sympodialis Eichl. ATRAVÉS DE ABORDAGEM METABOLÔMICA, E A SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE RELAXANTE EM TRAQUÉIA DE COBAIA.**

Com previsão de empregar **100** animais - **Cobaías (Cavia porcellus)**.  
Para serem utilizados no período de **03/09/2012 a 01/03/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec  
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba  
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – [ceua@cbiotec.ufpb.br](mailto:ceua@cbiotec.ufpb.br)