

NIARA MOURA PORTO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *Cissampelos* L.  
(MENISPERMACEAE) UTILIZADAS COMO MEDICINAIS NO NORDESTE DO  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Fernando M. de Oliveira

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Maria de Fátima Agra

RECIFE

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NIARA MOURA PORTO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *Cissampelos* L.  
(MENISPERMACEAE) UTILIZADAS COMO MEDICINAIS NO NORDESTE DO  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Dissertação avaliada pela banca:

Prof. Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira	(Orientador)
Profa. Dra. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna	(Titular)
Profa. Dra. Laise de Holanda Cavalcanti Andrade	(Titular)

RECIFE

2009

*Santa e Zeca Porto (in memoriam)*  
*Antonia (in memoriam) e Sebastião Moura (in memoriam)*  
*Aos meus avós*

**DEDICO**

*Porque há esperança para a árvore, pois,  
mesmo cortada ainda se renovará, e não  
cessarão os seus rebentos. Se envelhecer na  
terra a sua raiz, e no chão morrer o seu  
tronco, ao cheiro das águas brotará e dará  
ramos como a planta nova.*

*Jó 14: 7-9*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai e amigo de todas as horas. Pelo seu amor incondicional e o seu cuidado contínuo, por abrir portas onde não existiam e por dizer NÃO quando muitas vezes esperei um SIM, os seus caminhos são perfeitos. “Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as cousas. A Ele, pois, toda a glória” (Romanos 11:36).

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – PPGBV por contribuir com o meu desenvolvimento profissional.

À Pró-reitoria para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPE (Propesq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Fernando Morais de Oliveira, pela liberdade de trabalho e horários, pela alegria e descontração diárias no laboratório. Tenho certeza que o senhor colherá os frutos científicos; a organização do laboratório foi apenas o começo.

A Profa. Dra. Fátima Agra (minha co-orientadora e amiga), por toda atenção e disponibilidade em ensinar-me, pelo auxílio durante a permanência em João Pessoa, por todo carinho dado em forma de coisas simples mais que foram essenciais; por exigir o melhor dos nossos trabalhos, nos tornando profissionais que buscam o melhor. Obrigada por contribuir com o meu amadurecimento pessoal e profissional. Amo à senhora.

Aos amigos do Laboratório de Farmacobotânica (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, LTF - UFPB), em especial à Msc. Kiriaki Nurit, minha “irmã paraibana”, uma amiga sem igual, pelo seu amor fraterno e atenção, pelas palavras em momentos tão difíceis durante esta etapa; ao Msc. Ionaldo Basílio pela doação do seu tempo, atenção e companheirismo, o ato de servir é uma qualidade presente em você; à Bióloga Nathália Diniz pelos conselhos cristãos e o ombro amigo constante. Agradeço pelos bons momentos e por tudo que aprendi espero tê-los sempre perto de mim.

A toda equipe do Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica – LEAF, pelo auxílio nos questionamentos e dúvidas, pelo empréstimo de materiais, por aprendermos a dividir a “grande bancada”. Agradeço de forma singular às Biólogas Renata Carvalho e Keylla Miranda (grupo flavônico) e o Biólogo Ricardo Silva “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas” (Antoine de Saint-Exupéri).

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais – LPN, em especial aos professores: Dr. Nicácio Henrique e Dra. Eugênia Cristina pela adoção científica voluntária, Profa. Eugênia realmente és “mãe dos frascos e comprimidos”, ao Dr. Peter Falcão pela

disponibilidade para as análises no CLAE. Agradeço a doação de tempo, equipamentos e reagentes, pela disponibilidade para realização das análises.

Aos professores: Dr. José Maria Barbosa-Filho (LTF – UFPB), pela doação do padrão químico warifteína utilizado nas análises de CLAE; a Dra. Regina Bressan, do Departamento de Biologia Celular e Ultra-estruturas (Aggeu Magalhães), pela disponibilidade e auxílio na confecção do material botânico, utilizado na MEV; a Dra. Katya Maria Oliveira (UFRPE) pelo auxílio na aquisição de equipamento utilizado neste projeto.

Às curadoras Marlene Barbosa, do Herbário Geraldo Mariz – UFP e Dra. Maria Regina Barbosa, do Herbário Lauro Pires Xavier – JPB, pela estrutura disponibilizada a pesquisa científica.

Aos técnicos: Rafael Padilha, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, pelo exame do material ao MEV, a Dulce Oliveira (LTF) pela confecção e organização das exsiccatas, a João Antônio Virgínio (LPN) pelo apoio nas atividades químicas.

Aos meus amigos de apartamento: Mscs. Rafaela Tigre (Rafa), Alexandre Silva (Leleco) e Talitha Lucena (Tatá), pela confiança e carinho indispensáveis em momentos de tantas lutas, um auxílio sem igual, um aprendizado constante.

Aos amigos do mestrado, Marciel Oliveira (“quando ele chega, todo mundo se agita, quando ele fala todo mundo se liga nele, e todo mundo sabe quem é ele”), Tiago Arruda pelo auxílio nas coletas e Maria do Céu pelo apoio e auxílio nas viagens a João Pessoa.

Aos meus pais e a minha avó Santa Porto (minha segunda mãe): “Pai e mãe podem ser maravilhosos quando enxergam nos filhos o que ninguém consegue ver, quando apostam que eles têm ouro no coração apesar de só ser possível perceber o cascalho” (Augusto Cury). Vocês por tantas vezes abriram mãos dos seus sonhos para que nós (Eu, Carlos e Andrei) vivêssemos os nossos. Obrigada pelo apoio e confiança em nos lançar, como flechas cada vez mais altas e longe. A crer no potencial que temos, na capacidade de sermos e termos sempre mais. Amo vocês.

Aos meus irmãos Andrei e Carlos, companheiros e colunas de proteção, pelo cuidado e auxílio neste projeto. A Lúcia e ao meu amor Igor, fonte de alegrias para nossa casa. Aos meus primos, Luhana e Leonardo, verdadeiros irmãos, pelo auxílio e disponibilidade em permanecer em João Pessoa e permitir a persistência deste sonho.

Aos meus tios e familiares que auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, muito obrigada. Este não é o meu sonho, é NOSSO!

A todos que participaram direta e indiretamente neste sonho, muitíssimo obrigada.

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	12
2 Revisão Bibliográfica .....	14
2.1 Utilização de plantas medicinais no Nordeste do Brasil .....	14
2.2 Família Menispermaceae Juss. ....	14
2.2.1 Gênero <i>Cissampelos</i> L. ....	16
2.2.2 Caracterização das espécies .....	19
2.3 Anatomia Vegetal e Quimiotaxonomia: feramentas utilizadas na validação de drogas e taxonômicas .....	22
Referências .....	25
Artigo 1. Anatomia comparativa de espécies de <i>Cissampelos</i> L. (Menispermaceae) ocorrentes no Nordeste do Brasil .....	31
Artigo 2. Caracterização Histoquímica e Cromatográfica de <i>Cissampelos</i> spp. (Menispermaceae) utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil .....	61
Considerações finais .....	80
RESUMO .....	81
ABSTRACT .....	82
Apêndice .....	83
Anexo .....	90



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos morfológicos das espécies de <i>Cissampelos</i> . <b>A:</b> <i>C. andromorpha</i> (MF Agra et al. 7132); <b>B:</b> <i>C. ovalifolia</i> (JC Moraes 2082), detalhe da inflorescência feminina; <b>C:</b> <i>C. sympodialis</i> (MF Agra et al. 7000), detalhe do fruto; <b>D:</b> <i>Cissampelos</i> sp. Flores masculinas, barra = 2 mm (fonte: <a href="http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm">http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm</a> ). <b>E:</b> <i>C. sympodialis</i> (MF Agra et al. 7000), inflorescência masculina; <b>F:</b> <i>C. glaberrima</i> (MF Agra et al. 7127), detalhe da inflorescência feminina e fruto; <b>G:</b> <i>C. glaberrima</i> (MF Agra et al. 7131); <b>H:</b> <i>Cissampelos</i> sp. Fruto drupa (fonte: <a href="http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm">http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm</a> ) .....	21
Figura 2	Tipos de alcaloides isoquinolínicos isolados de espécies de <i>Cissampelos</i> .....	25
Figura 3	Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.: (A) ausência de tricomas na epiderme de <i>C. sympodialis</i> ; (B) <i>C. glaberrima</i> com indumento púberulo; (C) presença de tricomas unisseriados curtos em <i>C. andromorpha</i> ; (D) Detalhe da parede das células epidérmicas com contorno ondeado em <i>C. andromorpha</i> ; (E) epiderme com paredes anticlinais poligonais a retas em <i>C. pareira</i> ; (F) Epiderme densamente recoberta por tricomas em <i>C. ovalifolia</i> .....	51
Figura 4	Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.: (A) Papilas na face abaxial de <i>C. glaberrima</i> ; (B) Detalhe do formato esférico das papilas em <i>C. glaberrima</i> ; (C) Células epidérmicas com parede anticlinal reta em <i>C. pareira</i> ; (D) Células epidérmicas com parede anticlinal ondeada em <i>C. sympodialis</i> ; (E) Epiderme densamente recoberta com tricomas unisseriados em <i>C. ovalifolia</i> ; (F) Células epidérmicas com parede anticlinal ondeada em <i>C. andromorpha</i> .....	53
Figura 5	Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme abaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.: (A) <i>C. sympodialis</i> mostrando cera	

	distribuída de forma densa sobre a epiderme; (B) Detalhe da cera em forma de grânulos e camadas fissuradas em <i>C. sympodialis</i> ; (C) <i>C. glaberrima</i> com cera em forma de túbulos; (D) Detalhe de camadas de cera epicuticular na epiderme de <i>C. andromorpha</i> ; (E) Ultraestrutura da cera em forma de túbulos em <i>C. pareira</i> ; (F). Cera epicuticular depositada sobre estômatos em <i>C. pareira</i> ; (G) Cera em grânulos depositada sobre tricomas em <i>C. ovalifolia</i> ..... 55	
Figura 6	Nervação foliar de <i>Cissampelos</i> L.: (A) nervuras quartenárias do tipo poligonal reticulada em <i>C. glaberrima</i> (barra 100 µm); (B) nervuras quartenárias do tipo pecorrente alternada em <i>C. pareira</i> (barra 100 µm); (C) venação última marginal fimbriada em <i>C. ovalifolia</i> (barra 100 µm); (D) <i>C. sympodialis</i> , as aréolas são imperfeitas e apresentam formato irregular, com terminações simples, lineares ou curvadas, 2-3 ramificações (barra 250 µm) ..... 57	
Figura 7	Secção transversal do bordo de <i>Cissampelos</i> L. (A) <i>C. glaberrima</i> possui bordo circular (barra 50 µm); (B) <i>C. pareira</i> com bordo revoluto (barra 50 µm); (C) <i>C. ovalifolia</i> possui bordo revoluto, o feixe vascular está envolvido por células esclerenquimáticas formando um arco (barra 100 µm); (D) <i>C. sympodialis</i> apresenta bordo rotundo (barra 50 µm)..... 58	
Figura 8	Secção transversal de caule de espécies de <i>Cissampelos</i> L.: (A) <i>C. sympodialis</i> , com medula formada por células parenquimáticas (barra 500 µm); (B) <i>C. glaberrima</i> com células esclerificadas na medula (barra 500 µm); (C) Detalhe da região cortical em <i>C. ovalifolia</i> com formação de um anel esclerenquimático envolvendo o sistema vascular (barra 300 µm); (D) Detalhe da região cortical, formada por colênquima e parênquima subjacente em <i>C. sympodialis</i> (barra 200 µm); (E) Detalhe do câmbio interfascicular em <i>C. sympodialis</i> (barra 200 µm); <i>C. andromorpha</i> com idioblastos associados a células parenquimáticas (barra 100 µm)..... 59	
Figura 9	Estrutura química da warifteína, alcaloide isolado do extrato das folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> ..... 74	
Figura 10	Anatomia e histoquímica de <i>Cissampelos</i> . A-C: <i>Cissampelos</i>	

*sympodialis*: A – Secção transversal do caule (escala 300 µm); B – Secção transversal do caule evidenciando células parenquimáticas contendo alcaloides (escala 100 µm); C – Idioblastos com alcaloides (escala 50 µm). D-F: *Cissampelos glaberrima*: D – Secção transversal do caule (escala 300 µm); E – Detalhe de idioblastos com alcaloides presentes na nervura mediana (escala 100 µm); F – Região cortical do caule evidenciando célula secretora (escala 50 µm). G-J: *Cissampelos andromorpha*: G – Secção transversal do caule (escala 300 µm); H – Idioblastos associados a células colenquimáticas na nervura mediana (escala 100 µm). I – Secção transversal do caule destacando idioblastos presentes no floema (escala 100 µm); J – Região cortical mostrando esclereídes com alcaloides (escala 100 µm). Legenda: ct: córtex; ep: epiderme; fl: floema; xl: xilema, md: medula; pr: parênquima; col: colênquima; esi: esclereíde..... 75

- Figura 11 Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de *Cissampelos* visualizada em UV a 366 nm (A) e borrifadas com Dragendorff (B). Manchas alcaloídicas destacadas nas cromatoplacas. Legenda: warf: padrão warifteína; csf: extrato foliar de *C. sympodialis*; csc: extrato caulinar de *C. sympodialis*; cgf: extrato foliar de *C. glaberrima*; cgc: extrato caulinar de *C. glaberrima*; caf: extrato foliar de *C. andromorpha*; cac: extrato caulinar de *C. andromorpha* ..... 77
- Figura 12 Cromatograma (CLAE) do padrão warifteína (1,0 mg/mL) em MeOH/H<sub>2</sub>O/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), a λ 277nm. Número corresponde ao tempo de retenção ..... 78
- Figura 13 Gráfico da linearidade obtido com o procedimento de quantificação da warifteína em comprimento de onda 277 nm ..... 78
- Figura 14 Cromatogramas (CLAE) das espécies de *Cissampelos* na concentração 1,0 mg/mL, com fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O/ácido acético (80:9,5:0,5 v/v), a λ 277 nm. Números correspondem ao tempo de retenção..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações etnomedicinais das espécies de <i>Cissampelos</i> L. utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil.....	18
Tabela 2	Procedência e número do voucher das espécies de <i>Cissampelos</i> analisadas.....	35
Tabela 3	Parede das células epidérmicas na face adaxial e abaxial: 0 – reta, 1 – sinuosa a ondeada, 2– ondeada. Tricomas na face adaxial e abaxial das células epidérmicas: 0 – ausente, 1 – presente. Papila nas faces adaxial e abaxial das células epidérmicas: 0 – ausente, 1 – presente. Micromorfologia da cera epicuticular na face adaxial e abaxial: 0 – grânulos, 1 – túbulos, 2 – aglomerados de túbulos, 3 – camadas fissuradas. Bordo: 0 – revoluto, 1 – circular, 2 – rotundo. Nervura central: 0 – biconvexa, 1 – acuminada na face adaxial, 2 – levemente acuminada na face adaxial .....	38
Tabela 4	Procedência e número do voucher das espécies de <i>Cissampelos</i> analisadas.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma grande diversidade de plantas com potencial medicinal ainda não pesquisada, e que são promissoras fontes de inovações terapêuticas e farmacológicas para as mais diversas áreas da saúde humana. A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras, bem como o risco de sua extinção pela ação predatória do homem, tem motivado os estudos destas plantas, visando sua preservação e aproveitamento racional (Falkenberg *et al.*, 2002).

Estima-se que 80% da população mundial procuram nas plantas a cura para as suas mais diferentes enfermidades (WHO, 1999). Por outro lado, a maioria das espécies difundidas como medicinais no país, não são nativas. Assim, o Brasil pouco conhece a potencialidade de sua flora, apesar de ser o mais rico em biodiversidade.

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, produtos de origem vegetal com eficácia comprovada, têm sido muito investigados pela indústria farmacêutica. Vimblastina, vincristina, podofilotoxina e taxol são alguns dos principais exemplos do mercado milionário das drogas de origem vegetal (Montanari & Bolzani, 2001).

A prática da fitoterapia tem sido largamente estimulada por órgãos públicos de saúde. Entretanto, é imprescindível a cautela no uso de plantas medicinais devido à existência de substâncias que podem causar toxicidade. Na medicina popular corriqueiramente espécies distintas, às vezes, até pertencentes a diferentes famílias, são confundidas e empregadas para o mesmo fim terapêutico pelo fato de apresentarem características morfológicas semelhantes.

Menispermaceae Juss. é uma família predominantemente tropical conhecida quimicamente pela produção de alcaloides, notadamente os bisbenzilisoquinolínicos (Barbosa-Filho *et al.*, 2000). Compreende 71 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por oito espécies principalmente na região Nordeste do Brasil (Rhodes, 1975). A grande semelhança morfológica existente entre as diferentes espécies de *Cissampelos*, por exemplo, faz com que estas compartilhem nomes populares como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” e, conseqüentemente, indicações terapêuticas comuns (Agra *et al.*, 2007).

Considerando a anatomia como um parâmetro taxonômico importante para certificação e controle de qualidade de plantas medicinais, bem como a localização de sítios de secreção e/ou acúmulo e caracterização química de compostos biologicamente ativos, tornam-se necessárias investigações da estrutura dos órgãos vegetativos de espécies que possuem atividades terapêuticas. Devido às características morfológicas semelhantes entre

*Cissampelos sympodialis* Eichl., *Cissampelos ovalifolia* DC., *Cissampelos pareira* L., *Cissampelos glaberrima* A.St.-Hil., *Cissampelos andromorpha* DC., comparações anatômica e química foram utilizadas como ferramentas na busca por caracteres marcadores, fornecendo subsídios à caracterização e distinção dessas espécies.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Utilização de plantas medicinais no Nordeste do Brasil

Desde o início da civilização, o homem faz uso das plantas, pela necessidade de sobrevivência, levando-o à descoberta de possíveis aplicações terapêuticas de determinadas espécies. As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional (etnofarmacologia); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (fitoquímica); transformações químicas de princípios ativos (síntese orgânica); estudo da relação estrutural/atividade e dos mecanismos de ação dos componentes químicos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (tecnologia farmacêutica), o que leva a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos fármacos (Maciel *et al.*, 2002).

A cultura popular brasileira é particularmente rica em relação ao conhecimento sobre plantas medicinais. Contudo, a população em geral, não faz bom uso da sua biodiversidade e os saberes populares acabam se perdendo ao longo dos tempos. Mesmo sob o risco iminente da perda da biodiversidade a investigação e o desenvolvimento de agentes fitoterapêuticos para o país são mais promessas do que realidade (Calixto, 2005). Para a região Nordeste, a situação é ainda mais crítica, seja pela menor qualidade de vida da população ou pelas condições climáticas da região. Neste caso a importância medicinal das espécies acabam se perdendo mais rapidamente (Agra *et al.*, 2007a).

O estudo dos usos tradicionais de plantas na região Nordeste tem crescido gradualmente durante os últimos anos, favorecendo estudos químicos e farmacológicos (Agra *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2005; Silva & Albuquerque, 2005; Agra *et al.*, 2007a, b, c; Albuquerque *et al.*, 2007a, b). Estudo recente realizado por Agra *et al.* (2008) registrou um total de 650 espécies pertencentes a 111 famílias com informações etnomedicinais, utilizadas com fins terapêuticos na região nordeste do Brasil, entre as quais a família Menispermaceae.

### 2.2 Família Menispermaceae Juss.

A família Menispermaceae pertence à ordem Ranunculales e está subdividida em oito tribos e três subtribos (Diels, 1910), compreendendo 71 gêneros e aproximadamente 520 espécies (Jacques & Bertolino, 2007). Os representantes desta família correm principalmente em florestas tropicais e subtropicais, algumas em áreas de climas temperados, sendo a

Amazônia o maior centro de diversidade genética (Krukoff & Barneby, 1970). No Brasil, está representada por 12 gêneros e 106 espécies (Barroso, 2002).

Morfológicamente, as Menispermaceae caracterizam-se por serem lianas lenhosas a sub-herbáceas, arbustos escandentes, e raramente pequenas árvores. Com folhas alternas, simples, de formas variadas, possuem pecíolo espessado em sua maioria no ápice e/ou base, estípulas ausentes. As inflorescências variam de espigas, racemos, panículas ou cimeiras, são axilares ou freqüentemente caulifloras com tamanhos e quantidades diferentes entre as flores femininas e masculinas. As flores são pequenas (6 mm), unissexuais, normalmente trímeras, de coloração esverdeada, esbranquiçada, marrom ou amarelada. O fruto é uma drupa com exocarpo membranoso a subcoriáceo, com mesocarpo carnoso ou fibroso, e endocarpo lenhoso (Rhodes, 1962).

A subdivisão em tribos está baseada em caracteres dos frutos (morfologia do endocarpo) e sementes (presença ou ausência de endosperma, ruminação e morfologia do embrião reto ou curvo). Segundo Wang *et al.* (2007), tal divisão é reconhecida por Troupin (1956) para os representantes da família na África, Krukoff & Barneby (1971) para América, Forman (1985) para a Ásia no Pacífico, e Luo (1996) para a China. Contudo, Forman (1985) considerou que a tradicional divisão das tribos apresentava número elevado. Desta forma, Kessler (1993) apresentou um sistema com cinco tribos, seguido por Mabberley (1997) e Wu *et al.* (2003).

Caracteres fenotípicos como número de carpelos e simetria do perianto das flores femininas, foram utilizados por Diels (1910) para a divisão da tribo em três subtribos: Cocculinae (2-6 carpelos), Cissampelinae (1 carpelo, perianto assimétrico) e Stephaniinae (1 carpelo, perianto simétricos). Atualmente estudos filogenéticos apoiados em dados moleculares têm sido relevantes quanto à divisão de tribos e o posicionamento de algumas espécies (Hong *et al.*, 2001a, b; Ortiz *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Jacques & Bertolino, 2008; Hoot *et al.*, 2009).

A família Menispermaceae é altamente especializada na diversificação de compostos alcalóidicos (Pachaly, 1988). Até o final de 1996, 1.525 alcaloides foram descritos a partir de 159 espécies (Barbosa-Filho *et al.*, 2000). Estes alcaloides favoreceram importantes descobertas no campo da medicina e da farmacêutica, um exemplo de tal composto é a tubocurarina. Este é o principal componente ativo utilizado na preparação do curare, isolado de *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav., que funciona como um relaxante muscular (Krukoff & Smith, 1939). A disponibilidade limitada deste composto levou ao



desenvolvimento de uma série de análogos sintéticos, dentre eles o atracúrio, com base no bistetrahidropapaverina (Lewis & Elvin-Lewis, 1995).

Muitos representantes das Menispermaceae são tradicionalmente conhecidos por seus usos etnomedicinais. Dentre os gêneros com espécies mais utilizadas para fins medicinais, destacam-se: *Cissampelos*, *Cocculus*, *Dioscoreophyllum*, *Jateorhiza*, *Sphenocentrum*, *Stephania*, *Tiliacora*, *Tinospora* e *Triclisia* (Neuwinger, 2000; Duke, 2007).

### 2.2.1 Gênero *Cissampelos* L.

O gênero *Cissampelos* L. (Menispermaceae) pertence à tribo Menispermeae e subtribo Cissampelinae (Ortiz *et al.*, 2007). O tratamento mais abrangente para o gênero foi realizado por Rhodes (1975), uma revisão descrevendo 19 espécies distribuídas no Norte e Sul das Américas, na África e na Ásia. No Brasil são encontradas oito espécies, das quais cinco ocorrem no Nordeste e uma espécie, *Cissampelos sympodialis* Eichl., é exclusiva do território brasileiro. As espécies são utilizadas na medicina popular contra infecções urinárias, genitais, respiratórias e cardíacas com utilização, principalmente, das folhas e raízes (Tabela 1).

Estudos filogenéticos recentes têm sido realizados sobre a evolução da tribo Menispermeae (Hong *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2007). Esta tribo compreende 16 gêneros, dentre eles: *Antizoma*, *Stephania*, *Cyclea*, *Cissampelos* e *Cocculus*, que se caracterizam por apresentar endosperma presente, não ruminado, semente curvada, côneo bem desenvolvido e cotilédones subcarnosos (Kessler, 1993). A subtribo Cissampelinae é formada pelos gêneros *Cyclea* e *Cissampelos*. Dados de ITS e cpDNA apóiam o monofiletismo de Stephaniinae e Cissampelinae, enquanto que a subtribo Cocculinae é parafilética (contendo a tribo Tiliacoreae) (Wang *et al.*, 2007). Contudo, Hoot *et al.*, (2009) analisando um maior número de espécies a partir de cpDNA, considerou os gêneros *Stephania* e *Cissampelos* como parafiléticos e sugere a subdivisão do gênero *Cissampelos* em estudos futuros.

Quimicamente as espécies caracterizam-se pela presença de alcaloides do tipo bisbenziltetrahidroisoquinolínicos e aporfínicos (Barbosa-Filho *et al.*, 2000). Vários alcaloides isoquinolínicos foram isolados, dentre os quais se destacam: milonina (Freitas *et al.*, 1995), warifteína (Cortes *et al.*, 1995), metilwarifteína, laurifolina (Barbosa-Filho *et al.*, 1997a), liriodenina e roraimina (Lira *et al.*, 2002) e aporfínicos: cissaglaberrimina, oxobuxifolina, magnoflorina e trilobinina (Barbosa-Filho *et al.*, 1997a).

Os alcaloides de Menispermaceae são citados por diversos autores como sendo os responsáveis por determinadas propriedades medicinais encontradas nestas espécies. Os extratos de *C. pareira*, por exemplo, possui ação antiinflamatória (Amresh *et al.*, 2004), efeito imunomodulador (Bafna & Mishra, 2005) e atividade contraceptiva (Ganguly *et al.*, 2007). O extrato etanólico de folhas de *C. glaberrima* apresenta atividade broncodilatadora (Cornélio *et al.*, 1999). *C. ovalifolia* possui ação antimalárica (Milliken, 1997) e *C. sympodialis* apresentou ação espasmolítica (Freitas *et al.*, 1996), anti-anafilática (Thomas *et al.*, 1997), antidepressiva (Almeida *et al.*, 1998), antiinflamatória (Lima *et al.*, 2001; Alexandre-Moreira *et al.*, 2003) e efeito imunomodulador (Bezerra-Santos *et al.*, 2004) e antialérgica (Bezerra-Santos *et al.*, 2006).

Tabela 1. Informações etnomedicinais das espécies de *Cissampelos* L. utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil.

<b>Espécies</b>	<b>Nomes populares</b>	<b>Parte usada</b>	<b>Forma do uso</b>	<b>Indicação</b>	<b>Referências</b>
<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	milona abutua	Raízes	Infusão e decocção	-tosses, bronquites, doenças respiratórias;	Agra <i>et al.</i> , 2007a
		Folhas	Infusão	-asma, bronquites, reumatismo	Barbosa-Filho <i>et al.</i> , 1997a
<i>Cissampelos glaberrima</i> A.St.-Hil.	abuta, parreira jarrinha	Raízes	Infusão e decocção	-tosses, bronquites, doenças respiratórias	Agra <i>et al.</i> , 2007a
				-doenças cardíacas, doenças urinárias, genitais e respiratórias	Cornélio <i>et al.</i> , 1999
				-picadas de cobras, asma, bronquites	Rosário <i>et al.</i> , 1996
				-dispepsia, diurético e sudorífica	Rodrigues & Carvalho, 2001
<i>Cissampelos pareira</i> L.	abuta milona	Raízes	Infusão	-antidiarréica, adstringente, tônica, analgésica	Amresh <i>et al.</i> , 2004
				-doenças urinárias, uterinas, cardiovasculares	Selvam, 2008
<i>Cissampelos ovalifolia</i> DC.	orelha-de-onça	Raízes	Infusão e decocção	-antimalárica, febrífuga, anti-helmíntica	Milliken, 1997
				- diurética, antifebril	Rodrigues & Carvalho, 2001
<i>Cissampelos andromorpha</i> DC.	não conhecidos	Folhas	Uso externo	-febrífuga, cefaléia	NAPRALERT ( <i>Natural Products Alert</i> )

### 2.2.2 Caracterização das espécies

As espécies de *Cissampelos* são, em geral, trepadeiras herbáceas, com uma única espécie arbustiva, *Cissampelos ovalifolia* DC. Possuem folhas alternas com venação actinódroma. As flores apresentam no máximo 2 mm de comprimento, com coloração amarela a verde-clara. As flores masculinas caracterizam-se por apresentar 4 sépalas, 1 pétala conada, 4 estames com filetes formando um sinândro. As flores femininas são constituídas por 1 sépala, 1 pétala e 1 carpelo com estigma trifido. O fruto é uma drupa, oboval (Rhodes, 1975) (Fig. 1).

*Cissampelos sympodialis* Eichl. *Flora* 47: 392, 1864

O caule apresenta coloração verde-clara a vermelho ferrugíneo. Possui lâmina foliar oval a deltóide com ápice obtuso a retuso e base truncada a cordada, membranácea a subcoriácea. As flores masculinas possuem corola pateliforme. É distinguível pelas superfícies glabras e pecíolo peltado excêntrico (Porto *et al.*, 2008). É uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência nos estados do Ceará a Minas Gerais (Rhodes, 1975).

*Cissampelos pareira* L. *Spec. Pl.* 2: 1031, 1753

Possui folhas ovadas a suborbiculares, raramente deltóides, com menos de 10 cm de largura e inseridas na base da lâmina foliar e indumento seríceo. Apresenta inflorescências masculina e feminina fasciculadas, suas flores masculinas possuem corola pateliforme e sinândrio séssil. É uma espécie com ampla distribuição nos trópicos e subtropicais da América, Ásia e África, com numerosos sinônimos (Ortiz, 2001).

*Cissampelos ovalifolia* DC. *Syst. Nat.* 1: 537, 1817

Apresenta caule ereto, densamente tomentoso. Possui folhas com pecíolo inserido na base da lâmina, diminuto (3-5 mm), a lâmina foliar é oval a orbicular com ápice agudo a obtuso e base cordada. As flores femininas são axilares com brácteas foliáceas, velutinas a tomentosas. Espécie com distribuição na América do Sul (Rhodes, 1975).

*Cissampelos glaberrima* A.St.-Hil. *Fl Bras Merid* 1: 46, 1825

Suas folhas apresentam formato oval a orbicular, com ápice agudo, mucronulado e base truncada, pubescentes e pecíolo peltado. As flores masculinas possuem corola cupuliforme e sinândrio séssil. A espécie é amplamente distribuída na América Central e Sul (Rhodes, 1975).

*Cissampelos andromorpha* DC. *Syst. Nat.* 1: 539

Possui folhas ovadas a cordadas, ápice obtuso a retuso, pubescentes com pecíolo inserido na base da lâmina foliar. A inflorescência feminina é cauliflora e bractéolas foliáceas ausentes, as flores masculinas apresentam corola cupuliforme e sinândrio distintamente estipitado. Apresenta distribuição nas Américas Central e Sul (Barneby, 1996).

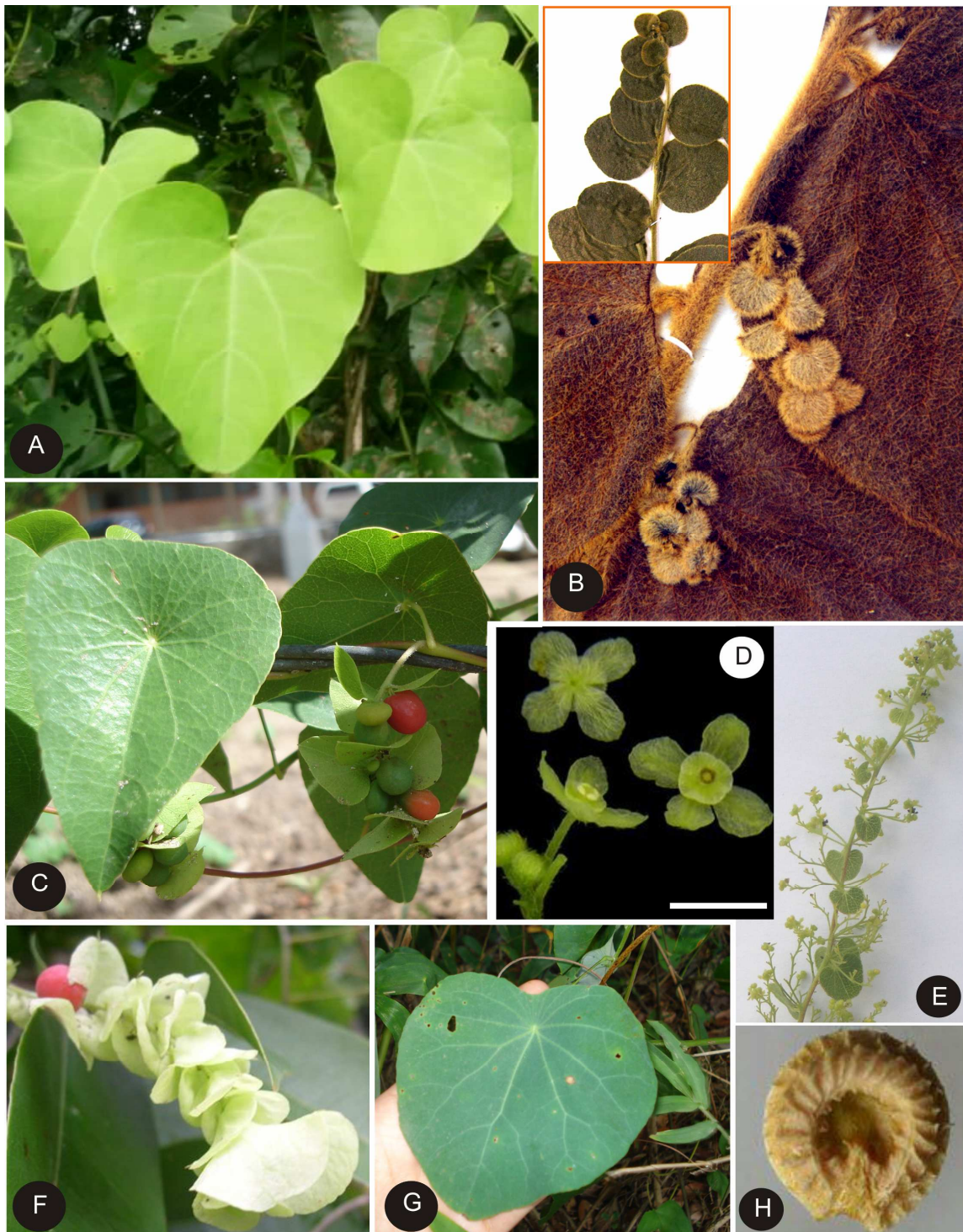


Figura 1 (A-H). Aspectos morfológicos das espécies de *Cissampelos*. **A:** *C. andromorpha* (MF Agra et al. 7132); **B:** *C. ovalifolia* (JC Moraes 2082), detalhe da inflorescência feminina; **C:** *C. sympodialis* (MF Agra et al. 7000), detalhe do fruto; **D:** *Cissampelos* sp. Flores masculinas, barra = 2 mm (fonte: [http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant\\_images\\_c.htm](http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm)). **E:** *C. sympodialis* (MF Agra et al. 7000), inflorescência masculina; **F:** *C. glaberrima* (MF Agra et al. 7127), detalhe da inflorescência feminina e fruto; **G:** *C. glaberrima* (MF Agra et al. 7131); **H:** *Cissampelos* sp. Fruto drupa (fonte: [http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant\\_images\\_c.htm](http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm)).

### **2.3 Anatomia Vegetal e Quimiotaxonomia: fermentas utilizadas na validação de drogas e taxonômicas**

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (Veiga Jr. *et al.*, 2005). A adulteração, a substituição, a falta de estudos científicos que assegurem as propriedades farmacológicas e a padronização química e o mau uso terapêutico têm sido os principais problemas encontrados no uso de plantas medicinais (Rates, 2001). Um outro agravante é que as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes (Carvalho *et al.*, 2008).

A correta identificação e a caracterização morfoanatômica das plantas são fundamentais para o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de fitoterápicos, garantindo desta forma, a confiabilidade dos mesmos (Joshi *et al.*, 2008). Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar a presença de uma ou mais espécies adulterantes, principalmente quando relacionadas a espécies pertencentes ao mesmo clado (Oliveira *et al.*, 2000).

A maioria dos membros de Menispermaceae é caracterizada pela presença de câmbios sucessivos, que formam anéis parciais ou anéis de feixes vasculares separados radialmente por raios multisseriados. Tangencialmente, os anéis são separados por um tecido misto de células lignificadas e parenquimáticas (Carlquist, 2007). As folhas são usualmente dorsiventrais, tricomas secretores e tectores ocorrem em alguns gêneros. Os feixes vasculares se dispõem em círculo, com um anel esclerenquimático circundado na maioria das vezes, a presença de cristais de oxalato de cálcio são comuns, podendo ocorrer solitários ou agrupados, em forma de ráfides, estilóides ou areia cristalina. Órgãos secretores são relatados para certos gêneros, estes consistem de ductos com taninos, canais com látex e células secretoras. Podem ocorrer no córtex e medula do caule, no córtex primário da raiz, no parênquima do pecíolo e nervura central da folha, associados ao anel esclerenquimático (Metcalf & Chalk, 1957).

Estudos anatômicos com o gênero *Cissampelos* são escassos. Além das descrições anatômicas apresentadas por Metcalfe & Chalk (1979), em nível de família, podem ser citados os trabalhos de Hong *et al.* (2001), que descreveram os caracteres epidérmicos foliares de 29 gêneros de Menispermaceae, De Wet *et al.* (2002) que descreveu caracteres

morfológicos e anatômicos para espécies de *Cissampelos* ocorrentes na África do Sul e Porto *et al.* (2008) que realizou uma caracterização anatômica foliar de *C. sympodialis*.

A grande semelhança morfológica entre as espécies de *Cissampelos*, como destacado por Barbosa-Filho *et al.* (1997a) e por DeWet *et al.* (2002), contribui para problemas de identificação, troca e até mesmo falsificação quando as espécies são coletadas e comercializadas como medicinais. Segundo Barbosa-Filho *et al.* (2000), espécies do gênero *Cissampelos* são quimicamente conhecidas pela presença de alcaloides (Fig. 2).

Os alcaloides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (Cordell, 1981). Entretanto os alcaloides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de plantas (McNair, 1935). Esta distribuição restrita dos compostos secundários constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (Harborne, 1988).

A abordagem quimiotaxonômica consiste na seleção de espécies de uma família ou gênero, para as quais se tenha algum conhecimento fitoquímico de ao menos uma espécie do grupo (Albuquerque, 2006). Em *Cissampelos* os alcaloides possuem núcleo isoquinolínico e todas as bases descritas na literatura pertencem a 7 tipos de esqueleto diferentes: benzilisoquinolínico (BIQ), bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ), aporfínico (APORFIN), morfinândienônico (MORF), tetrahidroprotoberberínico (PROTOB), tropolisoquinolínico (TROPOLI) e azafluorantênico (AZAFLU) (Barbosa-Filho *et al.*, 2000).



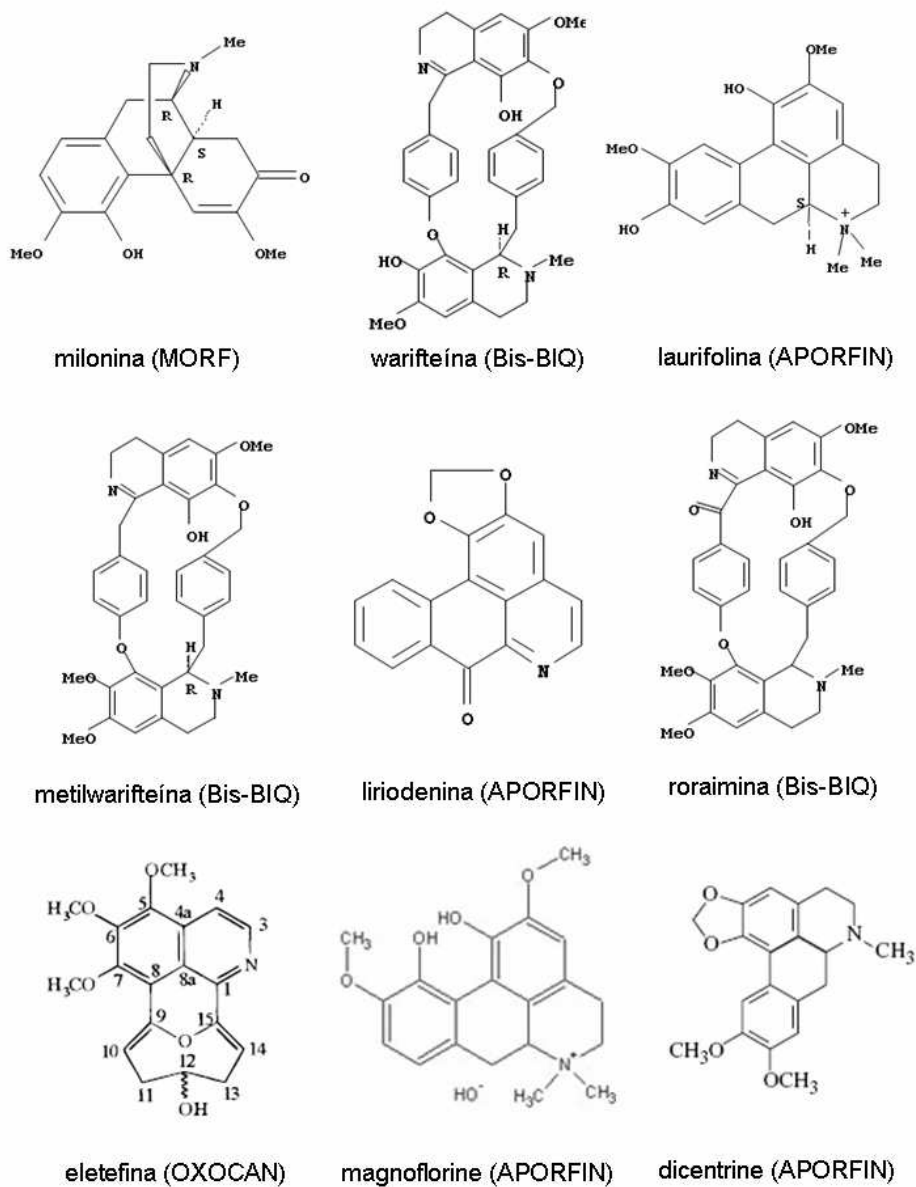


Figura 2. Tipos de alcaloides isoquinolínicos isolados de espécies de *Cissampelos*.

## Referências

- Agra, M.F., Freitas, P.F., Câmara, C.A., Silva, T.M.S., Almeida, R.N., Amaral, F.M.M., Almeida, M.Z., Medeiros, I.A., Moraes, M.O., Barbosa-Filho, J.M., Nurit, K., Oliveira, F.S., Freire, K.R.L., Morais, L.C.S.L., Rêgo T.J.A.S. & Barros, R.F.M. 2005. Mediciniais e produtoras de princípios ativos. Pp.135-198. In: E.V.S.B. Sampaio, F.G.C. Pareyn, J.M. Figueirôa & A.G. Santos-Jr (eds.). Espécies da Flora Nordestina de Importância Econômica Potencial. Recife, Associação Plantas do Nordeste.
- Agra, M.F., Freitas, P.F. & Barbosa-Filho J.M. 2007a. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 114-140.
- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D. & Coelho, V.P.M. 2007b. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2006.12.007.
- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D., Coelho, V.P.M. & Barbosa, D.A. 2007c. Sinopse da flora medicinal do Cariri Paraibano. *Oecologia Brasiliensis* 11: 323-330.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F. & Barbosa-Filho, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18: 472-508.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C. & Silva, A.C.O. 2005. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (Northeastern Brazil). *Acta Botanica Brasilica* 19: 27–38.
- Albuquerque, U.P. & Hanazaki, N. 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 678-689.
- Albuquerque, A.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A. & Amorim, E.L.C. 2007a. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 76-91.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., Melo, J.G. & Santos, J.P. 2007b. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 325–354.
- Alexandre-Moreira, M.S., Piuvezam, M.R. & Peçanha, L.M.T. 2003. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos*

- sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36: 199-205.
- Almeida, R.N., Navarro, D.S., Assis, T.S., Medeiros, I.A. & Thomas, G. 1998. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. Journal of Ethnopharmacology 63: 247–252.
- Amresh, G., Reddy, G.D., Rao, CH.V. & Shirwaikar, A. 2004. Ethnomedical value of *Cissampelos pareira* extract in experimentally induced diarrhoea. Acta Pharmaceutica 54: 27–35.
- Bafna, A.R. & Mishra, S.H., 2005. Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las raíces de *Cissampelos pareira* Linn. Ars Pharmaceutica 46: 253–262.
- Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F. & Thomas, G. 1997a. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science (Ciência e Cultura) 49: 386-394.
- Barbosa-Filho, J.M., Leitão da-Cunha, E.V. & Gray, A.I. 2000. Alkaloids of the Menispermaceae. In: Cordell G.A. (org.). The alkaloids 54: 1-190. Illinois, Academic Press.
- Barneby, R.C. 1996. Tidings of Menispermaceae from Interior French Guiana and from the Brazilian State of Bahia. Brittonia 48: 20-25.
- Barroso, G.M., Guimarães, E.F., Ichaso, C.L.F., Costa, C.G. & Peixoto, A.L., 2002. Sistemática das angiospermas do Brasil. 2ª ed. Viçosa, UFV.
- Bezerra-Santos, C.R., Balestieri, F.M.P., Rossi-Bergmann, B., Peçanha, L.M.T. & Piuvezam, M.R. 2004. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology 95: 191–197.
- Bezerra-Santos, C.R., Vieira-de-Abreu, A., Barbosa-Filho, J.M., Bandeira-Melo, C., Piuvezam, M.R. & Bozza, P.T. 2006. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. International Immunopharmacology 6: 1152-1160.
- Calixto, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. Journal of Ethnopharmacology 100: 131–134.
- Carlquist, S. 2007. Successive cambia revisited: ontogeny, histology, diversity, and functional significance. Journal Torrey Botany Society 134: 301–332.
- Carvalho, A.C.B., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia 18: 314-319.

- Cordell, G.A. 1981. Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach. Nova York, John Wiley & Sons
- Cornélio, M.L., Barbosa-FILHO, J.M., Cortes, S.F. & Thomas, G. 1999. Tracheal relaxant activity of cissaglaberrimine and trilobinine, two aporphinic alkaloids from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Medica* 65: 462-464
- Cortes, S.F., Alencar, J.L., Thomas, G. & Barbosa-Filho, J.M. 1995. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Phytotherapy Research* 9: 579-583.
- De Wet, H., Tilney, P.M. & Van Wyk, B.E., 2002. Vegetative morphology and anatomy of *Cissampelos* in South Africa. *South African Journal of Botany* 68: 181–190.
- Diels, L. 1910. Menispermaceae. In: A. Engler (Ed.), *Das Pflanzenreich*, 4: 94. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- Duke, J.A. 2007. *Phytochemical and Ethnobotanical Database*, USDA-ARSNGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. Fevereiro 2009. <http://www.ars-grin.gov/duke/>
- Falkenberg, M.B., Santos, R.I. & Simões, C.M.O. 2002. Introdução à análise fitoquímica. Pp. 229-234. In: Simões, C.M.O. (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/ UFSC.
- Forman, L.L. 1985. A revision of tribe Fibraureae (Menispermaceae) in Asia. *Kew Bulletin* 40: 539–551.
- Freitas, M.R., Alencar, J.L., Cunha, E.V.L., Barbosa-Filho, J.M. & Gray, A.I. 1995. Milonine, a novel 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. *Phytochemistry* 40: 1553-1555.
- Freitas, M.R., Cortes, S.F., Thomas, G. & Barbosa-Filho, J.M. 1996. Modification of Ca<sup>2+</sup> metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *C. sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48: 333-336.
- Ganguly, M., Kr.Borthakur, M., Devi, N. & Mahanta, R. 2007. Antifertility activity of the methanolic leaf extract of *Cissampelos pareira* in female albino mice. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 688–691.
- Harbone, J.B. 1998. *Phytochemical methods*. 3ª ed. London, Chapman & Hall.
- Hong, Y., Pan, K., Chen, Z. & Lu, A. 2001a. Phylogeny of the tribe Menispermeae (Menispermaceae) reconstructed by ITS sequence data. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 39: 97-104.

- Hong, Y.P., Pan, K.Y., Chen, Z.D. & Lu, A.M. 2001b. Characters of leaf epidermis and their systematic significance in Menispermaceae. *Acta Botanica Sinica* 43: 615-623.
- Hoot, S.B., Zautke, H., Harris, D.J., Crane, P.R. & Neves, S.S. 2009. Phylogenetic patterns in Menispermaceae based on multiple chloroplast sequence data. *Systematic Botany* 34: 44–56.
- Jacques, F.M.B. & Bertolino, P. 2008. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Plant Systematic Evolution* doi. 10.1007/s00606-008-0038-7.
- Joshi, V.C., Avula, B., Khan, I.A. Authentication of *Stephania tetrandra* S. Moore (Fang Ji) and differentiation of its common adulterants using microscopy and HPLC analysis. *Journal of Natural Medicines* 62:117–121.
- Kessler, P.J.A. 1993. Menispermaceae. In: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich. The families and genera of vascular plants – dicotyledons 2. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Krukoff, B.A. & Smith, A.C. 1939. Notes on the botanical components of curare-II. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 66: 305 – 314.
- Krukoff, B.A. & Barneby, R.C. 1971. Supplementary notes on American Menispermaceae-VI. *Memories of the New York Botanic Garden* 20: 1-70.
- Lewis, W.H. & Elvin-Lewis, P. 1995. Medicinal plants as sources of new therapeutics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 16-24.
- Lima, K.V.B., Ribeiro, R., Balestieri, F.M.P., Thomas, G. & Piuvezam, M.R. 2001. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) leaf extract. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 20: 275-279.
- Lira, G.A., Andrade, L.M., Florêncio, K.C., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M. & Cunha, E.V.L. 2002. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. *Fitoterapia* 73: 356-358.
- Luo, H.S. 1996. Menispermaceae. In: *Flora Republicae Popularis Sinicae*. Science Press, Beijing.
- Mabberley, D.J. 1997. *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C. & Veiga Jr, V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438.
- McNair, J.B. 1935. The Taxonomic and Climatic Distribution of Alkaloids. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 62: 219-226.

- Metcalf, C. R. & Chalk, L. 1957. Anatomy of the dicotyledons, vol. 1. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons, 2<sup>a</sup> ed. v.1. Oxford, Editora Clarendon Press.
- Milliken, W. 1997. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botany* 51: 212-237.
- Montanari, C.A. & Bolzani, V.S. 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova* 24: 105-111.
- Natural Products Alert (NAPRALERT). Disponível em <http://www.napralert.org/>. Acessado em 25 de novembro de 2008.
- Neuwinger, H.D. 2000. African Traditional Medicine: a Dictionary of Plant Use and Applications. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- Oliveira, A.F.M. & Andrade, L.H.C. 2000. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* JACQ. e *Justicia gendarussa* BURM. F. (Acanthaceae). *Acta Amazonica* 30: 569-578.
- Ortiz, R. 2001. Menispermaceae. In: W.D. Stevens, C. Ulloa Ulloa, A. Pool & O.M. Montiel (Eds.), Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 85: 1432-1442.
- Ortiz, R.D.C., Kellogg, R.A. & Van Der Werff, H. 2007. Molecular phylogeny of the moonseed family (Menispermaceae): Implications for morphological diversification. *American Journal of Botany* 94: 1425-1438.
- Pachaly, P. 1988. Analytical studies on the structure of natural products from Menispermaceae drugs. *Archives of Pharmacal Research* 11: 14-32.
- Porto, N.M., Basílio, I.J.L.D. & Agra, M.F. 2008. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 102-107.
- Rhodes, D.G. 1962. Menispermaceae. In: Duke, J. A., Flora of Panama IV, fascicle V. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 49: 137-255.
- Rhodes, D.G. 1975. A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytologia* 30: 415-485.
- Rosario, S.L., Da-Silva, A.J.R., Parente, J.P. 1996. Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Medica* 62: 376-377.
- Selvam, A.B.D. 2008. Inventory of vegetable crude drug samples housed in botanical survey of India, Howrah. *Pharmacognosy Reviews* 2: 61-94.
- Silva, A.C.O. & Albuquerque, U.P. 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica* 19: 17-26.

- Thomas, G., Araújo, C.C., Duarte, J.C. & Souza, D.P. 1997. Bronchodilatory activity of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in guinea-pig. *Phytomedicine* 4: 233-238.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. 2001. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rodrigues, V.E.G. & Carvalho, D.A. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. *Revista Ciência Agrotécnica* 25: 102-123.
- Troupin, G. 1956. Menispermaceae. In: *Flora of Tropical East Africa*. The Authority of the Secretary of State for the Colonies, London.
- Wang, W., Heng-Ghang, W. & Zhi-Duan, C. 2007. Phylogeny and morphological evolution of tribe Menispermeae (Menispermaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8: 141-154.
- Veiga-Jr, V.F., Pinto, A.C. & Maciel, M.A. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28: 519-528.
- World Health Organization (WHO). 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. Vol.1.
- Wu, C.Y., Lu, A.M., Tang, Y.C., Chen, Z.D. & Li, D.Z. 2003. *The Family and Genera of Angiosperms in China: A Comprehensive Analysis*. Science Press, Beijing.

## ARTIGO 1

### Anatomia comparativa de espécies de *Cissampelos* L. (Menispermaceae) ocorrentes no Nordeste do Brasil

Niara Moura Porto<sup>1</sup>, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo<sup>2</sup>

Antonio Fernando Morais Oliveira<sup>3</sup>, Maria de Fátima Agra<sup>4\*</sup>

1. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

2. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas, Caixa-Postal 7472, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

3. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

4. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Caixa Postal 5009, 58051-970, Paraíba, PB, Brasil. \*e-mail: [agramf@yahoo.com.br](mailto:agramf@yahoo.com.br)

Artigo a ser submetido ao periódico "Flora"



**Anatomia comparativa de espécies de *Cissampelos* L. (Menispermaceae)  
ocorrentes no Nordeste do Brasil**

Niara Moura Porto<sup>1</sup>, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo<sup>2</sup>, Antonio Fernando Morais  
Oliveira<sup>3</sup>, Maria de Fátima Agra<sup>4\*</sup>

1. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.
2. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas, Caixa-Postal: 7472, 50670-420, Recife, PE, Brasil.
3. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50670-901, Recife, PE, Brasil.
4. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Caixa Postal 5009, 58051-970, Paraíba, PB, Brasil. \*e-mail: [agramf@yahoo.com.br](mailto:agramf@yahoo.com.br)

**Resumo**

O gênero *Cissampelos* L., pertence à tribo Menispermeae possui cerca de 20 espécies com distribuição tropical, das quais cinco ocorrem no Nordeste do Brasil. As semelhanças morfológicas entre as espécies de *Cissampelos* são notáveis, tornando difícil suas identificações. Este trabalho apresenta um estudo anatômico comparativo de folhas e caules de espécies de *Cissampelos* encontradas no Nordeste brasileiro, realizado com o apoio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Caracteres anatômicos de lâminas foliares, relacionados à epiderme e anexos epidérmicos como tricomas e estômatos, distribuição e o tipo de cera epicuticular, bordo, nervura central e número de feixes

do sistema vascular mostraram-se úteis para auxiliar na distinção e delimitação das espécies estudadas, auxiliando nos estudos taxonômicos.

**Palavra-chaves:** Anatomia, *Cissampelos*, Menispermeae, Nordeste do Brasil.

## Introdução

Menispermaceae é uma família cosmopolita composta em sua grande maioria por plantas dióicas, trepadeiras, herbáceas a arbustivas e lianas, raramente árvores e arbustos (Ortiz et al., 2007), composta por cerca de 70 gêneros e 520 espécies de acordo com Jacques & Bertolino (2007). Oito tribos foram reconhecidas por Diels (1910), e a tribo Menispermeae foi dividida em três subtribos. A família ficou reconhecida, principalmente, pelo uso de suas espécies na preparação do “curare” (Krukoff & Barneby, 1970).

Espécies de Menispermaceae são empregadas para fins medicinais em todo o mundo, destacando-se as dos gêneros: *Cissampelos*, *Cocculus*, *Dioscoreophyllum*, *Jateorhiza*, *Sphenocentrum*, *Stephania*, *Tiliacora*, *Tinospora* e *Triclisia* (Neuwinger, 2000; Duke, 2007).

O gênero *Cissampelos* L. compreende 19 espécies com distribuição tropical. No Brasil são encontradas oito espécies, das quais cinco ocorrem no Nordeste e uma, *Cissampelos sympodialis* Eichl., é exclusiva do território brasileiro (Rhodes, 1975). Algumas dessas espécies são utilizadas na medicina popular brasileira contra infecções dos sistemas geniturinário, respiratório e cardiovascular com utilização, principalmente, de folhas e raízes (Agra et al., 2007; 2008).

Estudos filogenéticos recentes, buscando avaliar o relacionamento filogenético na tribo Menispermeae (Ortiz et al., 2007; Wang et al., 2007; Hoot et al., 2009) têm indicado *Cissampelos* e *Cyclea* como um clado fortemente apoiado como monofilético. As espécies são morfologicamente muito similares, entretanto, as principais diferenças é ausência de brácteas foliáceas e a presença de pétalas soldadas em *Cyclea*, de acordo com Kessler (1993).

Dados de ITS e cpDNA apóiam o monofiletismo da subtribo Cissampelinae e Stephaniinae, e o parafiletismo da tribo Tiliacoreae (Wang et al., 2007). Entretanto, Hoot et al. (2009) analisando um maior número de espécies a partir de cpDNA, consideraram *Cissampelos* e *Stephania* como parafiléticos e sugeriram a necessidade de uma sub-divisão infragenérica futura.

Os estudos existentes centrados em espécies de *Cissampelos* são ainda escassos e dizem respeito às áreas de fitoquímica e farmacologia e mais raramente surgem àqueles dedicados à anatomia. Além das descrições apresentadas por Metcalfe & Chalk (1979) para a família, destacam-se os trabalhos de Hong et al. (2001), que descreveram os caracteres epidérmicos foliares de 29 gêneros de Menispermaceae; De Wet et al. (2002) descreveram caracteres morfológicos e anatômicos de espécies de *Cissampelos* ocorrentes na África do Sul; mais recentemente Porto et al. (2008) realizaram uma caracterização foliar de *C. sympodialis*.

As semelhanças morfológicas entre as espécies de *Cissampelos* são marcantes, o que dificulta a distinção entre as espécies. Este trabalho foi realizado com o objetivo de obter caracteres morfológicos e anatômicos, que possam contribuir taxonomicamente na diagnose e diferenciação de espécies de *Cissampelos*.

## **Material e Métodos**

**Coleta de dados** - A tabela 2 sumariza todas as espécies analisadas e seus respectivos dados de coleta. Foram estudadas 12 populações de cinco espécies de *Cissampelos*, sendo três populações de *Cissampelos sympodialis* Eichl., três de *Cissampelos glaberrima* A.St-Hil., duas de *Cissampelos ovalifolia* DC., duas de *Cissampelos pareira* L., duas de *Cissampelos andromorpha* DC., ocorrentes nos estados da Paraíba e Pernambuco no período de fevereiro de 2008 a março de 2009.

Tabela 2. Procedência e número do voucher das espécies de *Cissampelos* analisadas.

Espécie	Procedência	Coletor/ número
<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	João Pessoa, Paraíba <sup>1</sup>	MF Agra, NM Porto 7.000
	Triunfo, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.128
	Recife, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.129
<i>Cissampelos glaberrima</i> A.St-Hil.	João Pessoa, Paraíba	MF Agra, NM Porto 7.131
	Buritirana, Maranhão <sup>2</sup>	MF Agra, NM Porto 7.068
	Igarassu, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.127
<i>Cissampelos ovalifolia</i> DC.	Areia, Paraíba	JC Moraes 2.082
	Garanhuns, Pernambuco	M Oliveira 544
<i>Cissampelos pareira</i> L.	Campina Grande, Paraíba	MF Agra et al. 1.996
	Gravatá, Pernambuco	M Oliveira 2.658
<i>Cissampelos andromorpha</i> DC.	Igarassu, Pernambuco	MF Agra, NM Porto, AFM Oliveira 7.132
	Igarassu, Pernambuco	GJ Bezerra, 54.508

1 Espécie cultivada, no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

2 Espécie coletada em Buritirana, Maranhão.

Amostras de espécimes secos disponíveis na coleção de referência do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) e Universidade Federal da Paraíba foram avaliadas. O material proveniente de exsicatas foi devidamente reidratado (Smith & Smith, 1942) e, posteriormente, submetido ao mesmo padrão de amostragem citado para o material fixado. Amostras coletadas foram herborizadas e depositadas no herbário Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba, com duplicatas no herbário Geraldo Mariz (UFP), Universidade Federal de Pernambuco.

Para os estudos anatômicos parte das amostras foi fixada em FAA 50%, posteriormente, conservada em álcool a 70° GL para análise microscópica. As identificações das espécies foram realizadas após estudos morfológicos de amostras frescas e exsicatas dos herbários JPB, UFP e do Herbário Dárdano Andrade Lima (IPA), Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco, com o auxílio da bibliografia especializada (Duke, 1963; Krukoff & Barneby, 1970; Rhodes, 1975; Barbosa-Filho et al., 1997; Ortiz, 2001) e o apoio de estereomicroscópio binocular, Zeiss. As abreviaturas dos autores dos táxons estão de acordo com Brummitt & Powell (1992).

### **Morfodiagnose Microscópica**

Secções transversais foram realizadas à mão livre, com auxílio de lâmina cortante, em folhas (lâmina foliar e pecíolo) e fragmentos caulinares, posteriormente clarificadas com hipoclorito de sódio 20%, neutralizadas com água acética 0,2%, lavadas em água destilada, coradas com azul de Astra e safranina 1% (Kraus & Arduin, 1997), montadas em glicerina a 50% (Johansen 1940, modificado). A classificação dos estômatos seguiu Wilkinson (1979) e para evidenciar a espessura da cutícula e paredes suberizadas foi realizado teste histoquímico com Sudan IV, em cortes à mão livre de material fresco de lâminas foliares, pecíolos e caules

(Johansen, 1940). As estruturas foram observadas e fotografadas ao microscópio óptico, Olympus, modelo CX31, com câmara fotográfica Olympus PM-BP35.

Os padrões da vascularização foliar foram determinados a partir de lâminas foliares diafanizadas, de acordo com Strittmater (1973), onde o material foi fervido por três minutos em etanol 95%, subsequentemente fervido por mais três minutos em solução de hidróxido de sódio 5% e etanol 95%. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada e clarificadas na solução de hipoclorito de sódio a 50% (o tempo variou de espécie para espécie). O material foi lavado novamente em água destilada, desidratado em série etanólica e corado com safranina 1% em etanol 70%. As folhas foram distendidas em placas de vidro. Para o estudo do retículo (rede menor de nervuras), fragmentos do terço mediano das folhas diafanizadas foram montados em lâminas permanentes. Para a descrição e classificação dos padrões de nervação utilizaram-se os tipos básicos definidos por Hickey (1979).

A caracterização morfológica da superfície foliar foi complementada com análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo JEOL JSM – 5600. Fragmentos de folhas foram fixados por 24 h em 4% de glutaraldeído (G.A) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) em tampão cacodilato por 1 h e desidratados em séries crescentes de etanol, secos pelo método do ponto crítico, revestido com ouro e examinados ao MEV para observação e registro fotográfico. Para micromorfologia das ceras epicuticulares, as amostras não foram fixadas, sendo metalizadas e examinadas ao MEV.

## **Resultados**

Características micromorfológicas e anatômicas da folha e do caule das espécies de *Cissampelos* L. analisadas estão detalhadas na tabela 3.

Tabela 3 Características micromorfológicas e anatômicas observadas nas folhas e caule de espécies de *Cissampelos* L.

Espécies	Caracteres												
	Parede anticlinal das células epidérmicas		Tricomas unisseriados		Papilas		Micromorfologia da cera epicuticular		Bordo	Nervura central	Número de feixes vasculares		
	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial			Pecíolo	Nervura central	Caule
<i>C. sympodialis</i>	1	1	0	0	0	0	0/3	0/3	2	1	6	1-2	9
<i>C. ovalifolia</i>	2	2	1	1	0	0	0	0	0	1	9	1-2	13
<i>C. glaberrima</i>	2	1	1	1	0	1	1	0/1	1	1	7	2	13
<i>C. pareira</i>	0	0	1	1	0	0	1	1/2	0	1	6	1	8
<i>C. andromorpha</i>	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2	8-9	1	11

Legenda: Parede das células epidérmicas na face adaxial e abaxial: 0 – reta, 1 – sinuosa a ondeada, 2 – ondeada. Tricomas na face adaxial e abaxial das células epidérmicas: 0 – ausente, 1 – presente. Papila nas faces adaxial e abaxial das células epidérmicas: 0 – ausente, 1 – presente. Micromorfologia da cera epicuticular na face adaxial e abaxial: 0 – grânulos, 1 – túbulos, 2 – aglomerados de túbulos, 3 – camadas fissuradas. Bordo: 0 – revoluto, 1 – circular, 2 – rotundo. Nervura central: 0 – biconvexa, 1 – acuminada na face adaxial, 2 – levemente acuminada na face adaxial.



Com exceção de *Cissampelos pareira* que apresentou epiderme com paredes anticlinais poligonais a retas na face adaxial (Fig. 3E) e irregularmente reta a sinuosa na face abaxial (Fig. 3C). O contorno das paredes anticlinais das células epidérmicas apresentou-se ondeado a sinuoso em ambas as faces, na maioria das espécies, como observado em *C. andromorpha* (Figs. 3C-D, 4F), por exemplo. A epiderme possui paredes periclinais irregulares e convexas, revestidas por uma cutícula lisa e delgada, em ambas as faces em *C. sympodialis*, *C. pareira* e *C. andromorpha*, enquanto que em *C. ovalifolia* (Fig. 3E) e *C. glaberrima* (Fig. 3B) a cutícula é espessa na face adaxial. Na região do bordo, a epiderme é revestida por uma cutícula espessada e apresenta pequenos feixes vasculares, circundados por células esclerenquimáticas, que aparecem com espessamento, formando um arco em *C. ovalifolia*.

As folhas são hipoestomáticas, com estômatos do tipo anomocítico, como visualizado em *C. sympodialis* (Fig. 4D). Em secção transversal, apresentam-se situados no nível das células epidérmicas para todas as espécies analisadas. Em *C. glaberrima* observou-se a presença de células papilosas esféricas, em vista frontal, que aparecem como pontuações sobre a epiderme, o que dificulta a visualização dos estômatos (Figs. 4A-B). A análise em MEV confirmou a ausência de tricomas na lâmina foliar em *C. sympodialis* (Figs. 3A, 4D). Nas demais espécies os tricomas unisseriados estão distribuídos sobre a superfície foliar ou restrito as veias principais. Em *C. pareira*, *C. glaberrima* e *C. andromorpha* apresentam indumento pubérulo a piloso, enquanto que *C. ovalifolia* é tomentoso (Fig. 3F, 4E).

A microscopia eletrônica de varredura revelou uma variação da micromorfologia das ceras epicuticulares das folhas entre as espécies. Em *C. sympodialis*, a epiderme é densamente recoberta por cera em forma de cristais (cristalóides), fato que dificulta a sua visualização (Fig. 5A). *C. ovalifolia* apresentou cristais depositados nos tricomas (Fig. 5G) e em *C. andromorpha* quase não se observou depósitos de cera (Fig. 5D). Quanto aos arranjos ultra-

estruturais a cera de *C. ovalifolia* e *C. sympodialis* apresentaram-se em grânulos e com camadas fissuradas (Fig. 5B). Em *C. pareira*, *C. andromorpha* e *C. glaberrima* a cera origina túbulos. Na superfície abaxial variações foram observadas quanto à composição de ceras epicuticulares. Em *C. pareira* os cristais de cera formam túbulos aglomerados e isolados (Figs. 5E-F) e em *C. glaberrima* aparecem em túbulos e grânulos (Fig. 5C).

O padrão de venação foliar caracterizou-se como actinódromo-broquidódromo para todas as espécies, com as nervuras secundárias formando uma série de arcos próximos ao bordo da lâmina. O espaçamento entre as nervuras secundárias é irregular em todas as espécies. No entanto, o ângulo formado por estas nervuras é variável; em *C. glaberrima*, *C. pareira* e *C. andromorpha* diminui em direção a base da folha; em *C. sympodialis* e *C. ovalifolia* permanecem uniformes em toda a folha. A maioria das espécies não possui veias intersecundárias, contudo em *C. sympodialis* e *C. glaberrima* elas aparecem delgadas. A venação marginal é fimbriada (Fig. 6C), como visualizado em *C. ovalifolia*. As nervuras terciárias são do tipo percurrente alternada, enquanto que as nervuras quaternárias apresentam-se em dois tipos: reticulada regular poligonal em *C. sympodialis*, *C. glaberrima* (Fig. 6A) e *C. ovalifolia*; e percurrente alternada para as demais espécies, como observado em *C. pareira* (Fig. 6B). As nervuras terciárias e de ordem superior determinam aréolas imperfeitas, de formato irregular, podendo apresentar terminações simples, lineares e curvas com 2-3 ramificações (Fig. 6D).

O mesofilo em secção transversal é dorsiventral, com epiderme unisseriada em ambas as faces, entretanto, em *C. ovalifolia* é ocasionalmente bi-estratificada na face abaxial. Os feixes vasculares colaterais são de pequeno porte, distribuídos ao longo de sua extensão, envolvidos por uma bainha parenquimática. Em *C. sympodialis* e *C. ovalifolia* a bainha é formada por células esclerificadas.

O bordo foliar, em corte transversal, apresentam a forma revoluta em *C. ovalifolia* (Fig. 7C), *C. pareira* (Fig. 7B) e *C. andromorpha*; circular em *C. glaberrima* (Fig. 7A); e rotunda em *C. sympodialis* (Fig. 7D).

A nervura mediana, no plano transversal, pode ser convexa nas duas faces, em *C. glaberrima*; acuminada na face adaxial e convexa na abaxial, em *C. pareira*; ou exibir contorno levemente acuminado a plano na face adaxial e convexo na face abaxial, como observado para *C. andromorpha*. Na face abaxial notam-se o colênquima lacunar seguido do parênquima. No terço basal o sistema vascular da nervura mediana é constituído por um único feixe vascular. Ao longo do terço médio, ocorre à formação do anel esclerenquimático circundando os feixes vasculares, estes com tamanhos distintos, um feixe maior em formato oval e um diminuto. No terço apical, o sistema vascular está constituído por 2-3 feixes diminutos, intercalados por células parenquimáticas.

O pecíolo caracterizou-se pelo formato circular a semicircular. A epiderme é uniestratificada, sendo revestida por cutícula espessa em *C. ovalifolia* e *C. glaberrima*, enquanto as demais apresentam cutícula delgada. O córtex é formado por colênquima do tipo lacunar, subjacente à epiderme por parênquima interno, semelhante ao apresentado por *C. sympodialis*. Um anel esclerenquimático circunda os feixes vasculares na porção mediana, não evidenciado nas porções apical e basal. Os feixes vasculares colaterais são de formatos ovóides a cônicos, variando o número de feixes e sua disposição. Em *C. ovalifolia* o pecíolo apresenta 9-11 feixes colaterais, com disposição semicircular, enquanto as demais apresentam de 6-7 feixes, circulares. Os feixes vasculares estão separados por células parenquimáticas, o floema é multisseriado, seguido do câmbio vascular e do xilema com elementos de vasos dispostos radialmente.

O caule possui contorno cilíndrico e, apresentam-se em estrutura primária (Figs. 8A-B). Está constituído por epiderme uniestratificada, clorofilada e recoberta por cutícula

espassada em *C. ovalifolia*, *C. pareira* e *C. glaberrima*; em *C. sympodialis* e *C. andromorpha* constitui-se delgada. Em *C. ovalifolia* ocorre tricomas simples, unisseriados, enquanto nas demais espécies são apresentadas são raros e esparsos. O colênquima adjacente à epiderme é do tipo lacunar, 2-3 estratificado como em *C. sympodialis* (Fig. 8D); em *C. ovalifolia* é uniestratificado ou ausente (Fig. 8C). O parênquima está situado abaixo de uma faixa colenquimática, delimitando o cilindro vascular. Idioblastos com cristais prismáticos estão associados às células parenquimáticas na região cortical e próximo aos feixes vasculares. Em *C. ovalifolia* há bainha esclerenquimática contínua, envolvendo o sistema vascular, mais espessado na região cortical (Fig. 8C).

O sistema vascular é organizado em feixes vasculares colaterais, tipicamente eustelico, formado por 9-13 feixes colaterais, delimitado lateralmente por células parenquimáticas alongadas. O floema é multisseriado, representado por elementos do tubo crivado, células companheiras e parênquima floemático, podendo ocorrer idioblastos cristalíferos. O xilema é constituído por elementos de vaso solitários de grande diâmetro, entremeados com vasos pequenos, algumas vezes obliterados (protoxilema), as fibras xilemáticas são numerosas e o parênquima radial exhibe comumente células esclerificadas, entre as quais ocorrem idioblastos cristalíferos, como observado em *C. andromorpha* (Fig. 8A). Em alguns feixes observa-se o início de atividade cambial (Fig. 8E). O crescimento secundário se restringe à formação de tecidos vasculares secundários, não ocorrendo o desenvolvimento de periderme nesta fase. Este crescimento em espessura ocorre pela diferenciação de câmbio fascicular de origem procambial e interfascicular de origem pericíclica, na faixa mais externa de feixes vasculares e segue o padrão de desenvolvimento de dicotiledôneas.

A medula consiste de células parenquimáticas isodiamétricas, contendo pigmentos clorofilianos em *C. sympodialis* (Fig. 8A) e *C. andromorpha*, nas demais espécies tais células são esclerificadas.

## Discussão

Apesar da homogeneidade morfológica, as espécies de *Cissampelos* estudadas apresentam caracteres diagnósticos representativos, tais como o indumento, a inserção do pecíolo na lâmina foliar, tamanho da lâmina foliar e pecíolo. A lâmina foliar de *C. sympodialis* apresenta um indumento glabro, a ausência de tricomas tectores unicelulares mostrou ser um caráter fundamental na identificação do material vegetativo, uma vez que, os ramos e a forma da lâmina foliar das cinco espécies são muito semelhantes, sendo muitas vezes impossível à identificação das mesmas apenas pela análise foliar.

Segundo Barthlott et al. (1998), cera epicuticular formando cristais como placas ou plaquetas encontram-se amplamente distribuídos nas plantas apresentando, portanto, pouco significado taxonômico. Contudo, para as espécies analisadas, apresentou-se como um caráter importante pela variação na forma dos cristais encontrados sobre na superfície foliar.

A anatomia foliar das espécies de *Cissampelos* aqui tratadas, com relação ao mesofilo (dorsiventral) e à vascularização (do tipo colateral) correspondeu ao padrão registrado para a família Menispermaceae por Metcalfe & Chalk (1979) e Hong et al. (2001) que, ao estudar a epiderme de 29 gêneros da família, descreveu similaridades anatômicas para cerca de 50 espécies, representantes das tribos Anosmospermeae, Menispermeae e Tinosporeae, dentre elas epiderme foliar hipoestomática com estômatos predominantemente anomocíticos, características também observadas nas espécies estudadas.

A ocorrência de papilas em *C. glaberrima* na superfície abaxial, distinguindo-a das demais espécies, é um caráter já referido por Metcalfe & Chalk (1957), e De Wet et al. (2002)

para outras espécies do gênero, como em *Cissampelos capensis* L. f. e *Cissampelos fluminensis* Eichl.

Barthlott (1981) refere que o contorno das paredes e a escultura da superfície celular da epiderme são características importantes, podendo ter valor taxonômico. No presente estudo verificou-se que as células epidérmicas das folhas de *C. pareira* apresentam as paredes anticlinais retas, sendo esta característica mais acentuada na face adaxial, diferenciando-se, assim das demais espécies, que em vista frontal, apresentam células epidérmicas com paredes anticlinais sinuosas a ondeadas. Tal caráter registrado por Hong et al. (2001) para vários gêneros da tribo Menispermaceae, como *Hypserpa*, *Menispermim*, *Diploclisia*, *Stephania*, *Cocculus* e *Cyclea*, este considerado como o gênero filogenicamente mais relacionado com *Cissampelos*, o qual compartilha vários caracteres, inclusive a presença de um único carpelo e perianto feminino assimétrico (Ortiz et al., 2007; Wang et al., 2007) na maioria dos casos.

O padrão de venação do tipo actinódromo-broquidódromo e a organização do sistema vascular na nervura mediana mostraram-se constante nas espécies estudadas. A observação da nervura mediana, no terço basal, mediano e distal permitiu o estabelecimento do padrão do sistema vascular, e a semelhança deste padrão corroborou com a afinidade morfológica entre as espécies estudadas. Entretanto, o padrão do sistema vascular da nervura mediana poderá apresentar-se como um caráter taxonômico, ao analisar um número maior de espécies do gênero.

Células secretoras são registradas para várias espécies de Menispermaceae, inclusive em *Cissampelos fasciculata* Benth. (Metcalf & Chalk, 1979), *Cissampelos hirta* Klotzsch e *Cissampelos mucronata* A. Rich. (De Wet et al., 2002). Na maioria das vezes estão associados ao arco esclerenquimático, geralmente presente na nervura central da folha, córtex e medula do caule, no parênquima do pecíolo. Porém, tal caráter não foi observado nas espécies aqui analisadas com o tratamento utilizado, necessitando maiores estudos.

A análise do caule de espécies dos dois hábitos, trepador e arbutivo, mostraram que ambos possuem o mesmo padrão anatômico, porém, destaca-se que os diâmetros de elementos de vasos são menores no tipo arbustivo, observado em *C. ovalifolia*. A presença de vasos de diferentes diâmetros é relativamente comum em plantas de hábito lianescente, de acordo com Carlquist (1985). Vasos de grande calibre possibilitam maior fluxo de água, entretanto, são mais suscetíveis ao embolismo. Simultaneamente, a presença de vasos de menor calibre confere segurança ao sistema vascular, pois continuam a conduzir água enquanto os de maior calibre estão embolisados (Baas & Schweingruber 1987; Carlquist 1991; Ewers et al. 1991).

A formação de câmbios sucessivos é relatada para alguns gêneros (*Disciphania*, *Abuta*, *Anomospermum*, *Chondodendron*, *Menispermum*) de Menispermaceae (Metcalf & Chalk, 1979). Neste tipo de desenvolvimento, há formação de um câmbio extrafascicular, que dá origem a um novo arco de células pétreas e a novos feixes vasculares, sucessiva vezes, dito “anômalo” verificada em *Cocculus hirsutus*, pertencente à tribo Menispermeae, à qual o gênero *Cissampelos* está subordinado (Rajput & Rao, 2003). Contudo tal variação cambial não foi observada nas espécies analisadas. Estudos realizados por De Wet et al. (2002), demonstram o mesmo padrão anatômico em outras espécies de *Cissampelos*, corroborando com os dados expostos.

A abundância de tecidos parenquimáticos nos caules das trepadeiras aumenta sua flexibilidade, ajudando-as a evitar danos mecânicos e acelerando a taxa de recuperação quando ocorrem danos (Fisher & Ewers, 1989; Holbrook & Putz, 1991). Em *C. ovalifolia* a presença de células esclerificadas constituindo a medula e a ausência quase por completo de tecidos parenquimáticos no córtex, demonstra caracteres referentes ao hábito.

As estruturas anatômicas observadas nas diversas partes da folha e do caule apresentam-se semelhantes nas espécies estudadas, tais como: mesofilo dorsiventral, lâmina

hipoestomática, estômatos anomocíticos, feixes vasculares colaterais e venação actinódromabroquidodroma. Para as folhas das espécies estudadas, as diferenças entre os caracteres da epiderme foliar foram decisivas na distinção e delimitação dos táxons, principalmente a presença ou ausência de papilas, tricomas tectores, e ceras epicuticulares.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida ao primeiro autor; ao Conselho Nacional de Pesquisas e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida de M. F. Agra (PQ); à Dulce G. Oliveira (LTF) pelo apoio técnico; Rafael Padilha, pelo apoio técnico à microscopia eletrônica de varredura.

### **Referências**

- Agra, M. F., Freitas, P. F., Barbosa-Filho, J. M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 114-140.
- Agra, M. F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L. D., Freitas, P. F., Barbosa-Filho, J. M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, 472-508.
- Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., Thomas, G., 1997. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *J. Braz. Assoc. Advanc. Sci.* 49, 386-394.
- Barthlott, W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord. J. Bot.* 1, 345-355.



- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., Wilhelmi, H., 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* 126, 237–260.
- Carlquist, S., 1985. Vasicentric tracheids as a drought survival mechanism in the woody flora of southern California and similar regions; review of vasicentric tracheids. *Aliso* 11, 37–68.
- Carlquist, S., 1991. Anatomy of vines and liana stems: A review and synthesis. In: F.E. Putz & H.A. Mooney (eds.), *The biology of vines*: 53–71. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Carlquist, S., 2007. Successive cambia revisited: ontogeny, histology, diversity, and functional significance. *J. Tor. Bot. Soc.* 134, 301–332.
- De Wet, H., Tilney, P. M., Van Wyk, B. E., 2002. Vegetative morphology and anatomy of *Cissampelos* in South Africa. *S. Afr. J. Bot.* 68, 181–190.
- Dickison, W. C., 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, San Diego.
- Diels, L., 1910. Menispermaceae. In: A. Engler (Ed.), *Das Pflanzenreich*, 4: 94. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- Duke, J.A., 2007. *Phytochemical and Ethnobotanical Database*, USDA-ARSNRGL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. February 2009. <http://www.ars-grin.gov/duke/>
- Esau, K., 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd ed. New York, John Wiley.
- Ewers, F.W. & J.B. Fisher., 1991. Why vines have narrow stems: Histological trends in *Bauhinia* (Fabaceae). *Oecologia* 88, 233–237.
- Hickey, L. J., 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Metcalfe, C. R., Chalk, L. (Eds.), *Anatomy of the dicotyledons*. 2 ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 25-39.
- Hong, Y. P., Pan, K. Y., Chen, Z. D. & Lu, A. M., 2001. Characters of leaf epidermis and their systematic significance in Menispermaceae. *Acta Bot. Sin.* 43, 615-623.

- Hoot, S. B., Zautke, H., Harris, D. J., Crane, P. R., Neves, S. S., 2009. Phylogenetic patterns in Menispermaceae based on multiple chloroplast sequence data. *Syst. Bot.* 34, 44–56.
- Jacques, F. M. B., Bertolino, P., 2008. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Plant Syst Evol.* doi 10.1007/s00606-008-0038-7.
- Johansen, D. A., 1940. *Plant Microtechnique*. Tata McGraw-Hill Book Company, Bombay.
- Kessler, P. J. A., 1993. Menispermaceae. In: *The families and genera of vascular plants—dicotyledons 2.* (eds. Kubitzki, K., Rohwer, J. G., Bittrich, V.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kraus, J., Arduin, M., 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Edur, Seropédia.
- Krukoff, B. A., Barneby, R. C., 1970. Supplementary notes on American Menispermaceae-VI. *Mem. New York Bot. Gard.* 20, 1-70.
- Metcalf, C. R., Chalk, L., 1957. *Anatomy of the dicotyledons*, vol. 1. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Metcalf, C. R., Chalk, L., 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. 2.ed. v.1. Clarendon Press, Oxford.
- Neuwinger, H. D., 2000. *African Traditional Medicine: a Dictionary of Plant Use and Applications*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- Ortiz, R. D. C., Kellogg, R. A., Van der Werff, H., 2007. Molecular phylogeny of the moonseed family (Menispermaceae): Implications for morphological diversification. *Am. J. Bot.* 94, 1425–1438.
- Porto, N. M., Basílio, I. J. L. D., Agra, M. F., 2008. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, 102-107.
- Rajput, K. S., Rao, K. S., 2003. Cambial variant and xylem structure in the stem of *Cocculus hirsutus* (Menispermaceae). *IAWA J.* 24, 411–420.

Rhodes, D. G., 1962. Menispermaceae. In: Duke, J. A., Flora of Panama IV, fascicle V. Ann. Mo. Bot. Gard. Vol. 49, pp. 137-255.

Rhodes, D. G., 1975. A revision of the genus *Cissampelos*. Phytol. 30, 415–484.

Smith, F. H., Smith, E. C., 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbia*. Am. J. Bot. 29, 464-471.

Wang, W., Heng-Ghang, W., Zhi-Duan, C., 2007. Phylogeny and morphological evolution of tribe Menispermeae (Menispermaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. Perspect. Plant. Ecol. Evol. Syst. 8, 141-154.

Wilkinson, H. P., 1979. The plant surface (mainly leaf). In: Metcalfe, C. R., Chalk, L. (Eds.), Anatomy of the dicotyledons, Clarendon Press, Oxford, pp. 97-165.

Figura 3 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

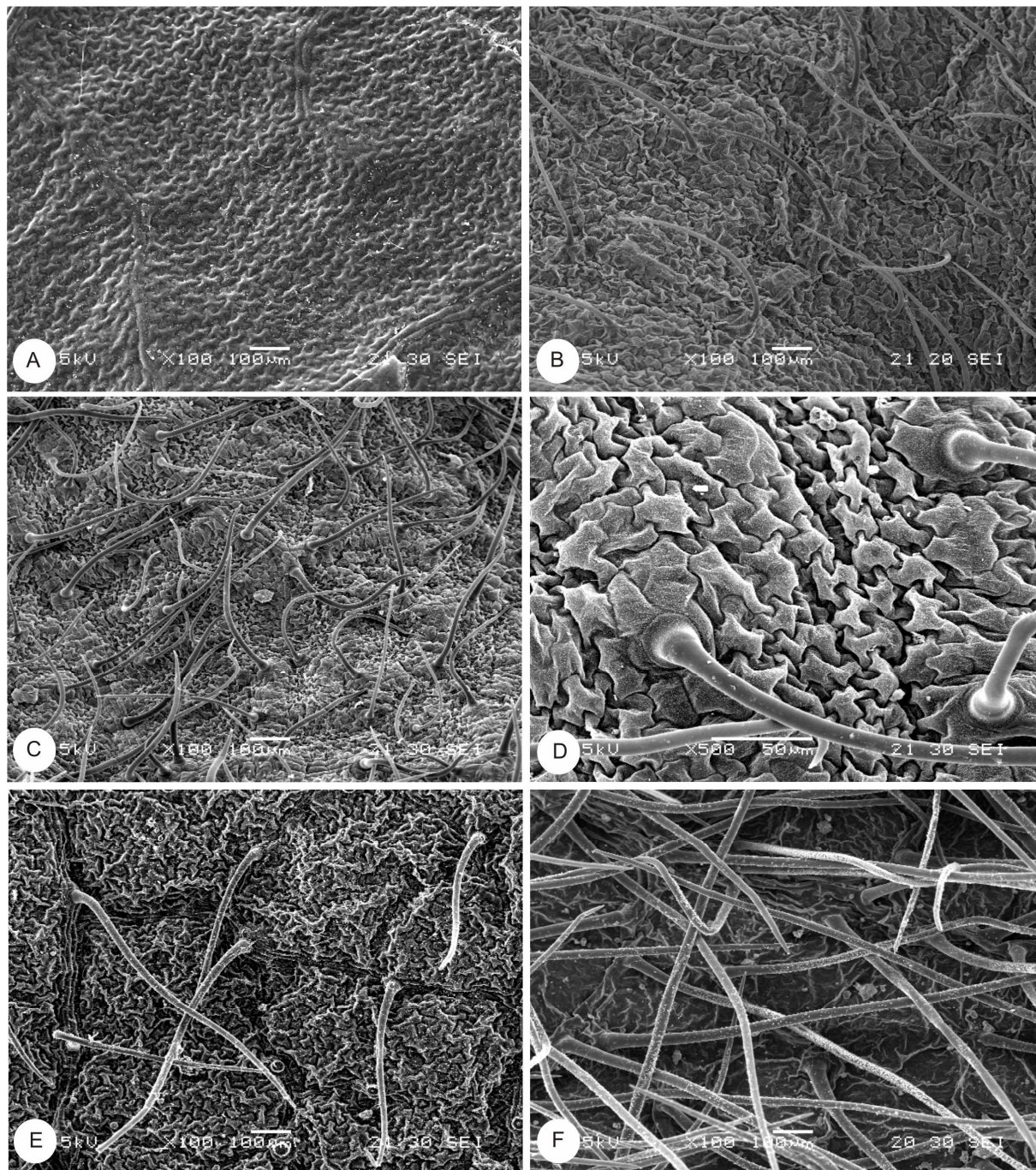


Figura 3 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) ausência de tricomas na epiderme de *C. sympodialis*; (B) *C. glaberrima* com indumento púberulo; (C) presença de tricomas unisseriados curtos em *C. andromorpha*; (D) Detalhe da parede das células epidérmicas com contorno ondeado em *C. andromorpha*; (E) epiderme com paredes anticlinais poligonais a retas em *C. pareira*; (F) Epiderme densamente recoberta por tricomas em *C. ovalifolia*.

Figura 4 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

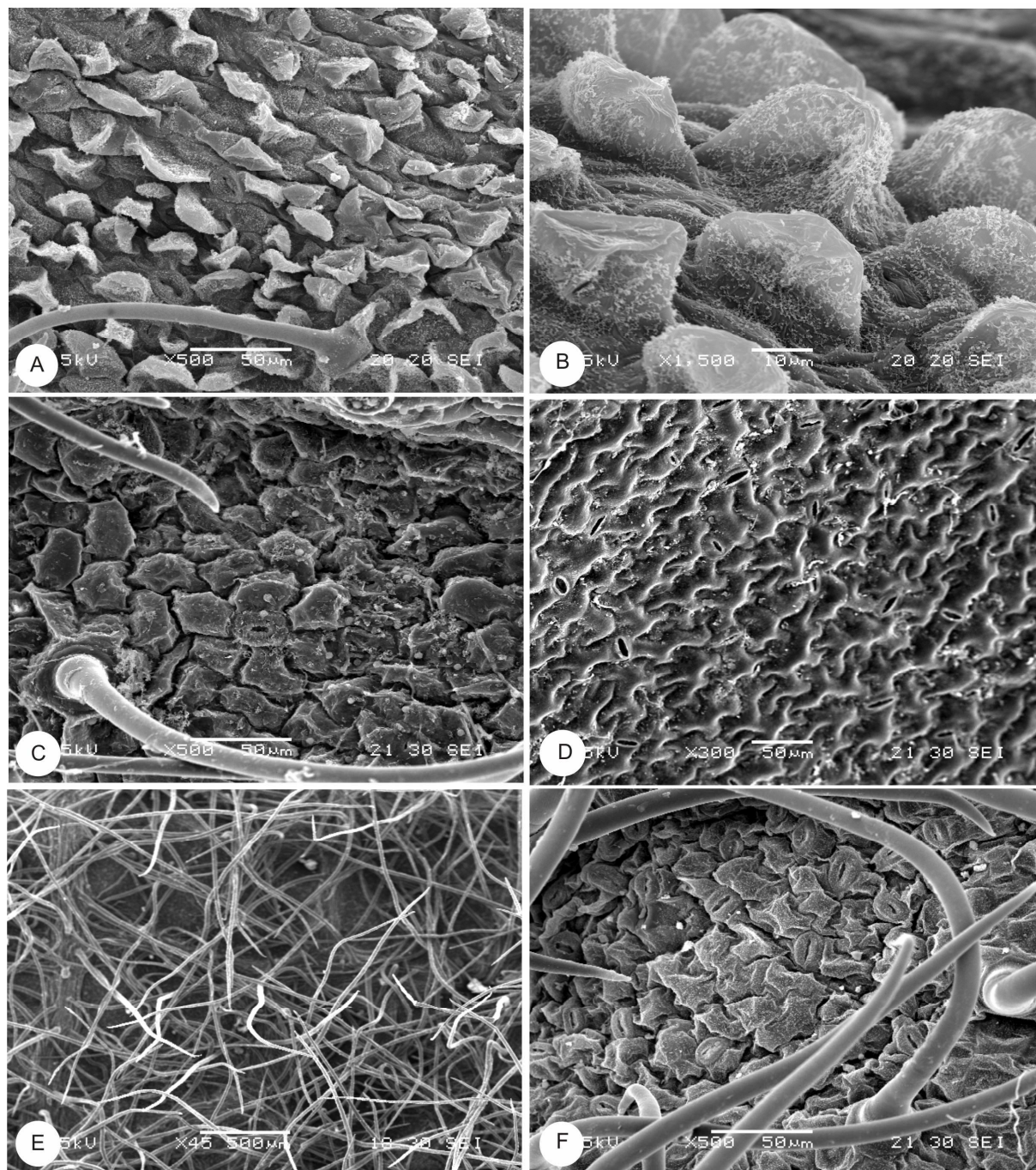


Figura 4 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) Papilas na face abaxial de *C. glaberrima*; (B) Detalhe do formato esférico das papilas em *C. glaberrima*; (C) Células epidérmicas com parede anticlinal reta em *C. pareira*; (D) Células epidérmicas com parede anticlinal ondeada em *C. sympodialis*; (E) Epiderme densamente recoberta com tricomas unisseriados em *C. ovalifolia*; (F) Células epidérmicas com parede anticlinal ondeada em *C. andromorpha*.

Figura 5 (A-G). Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

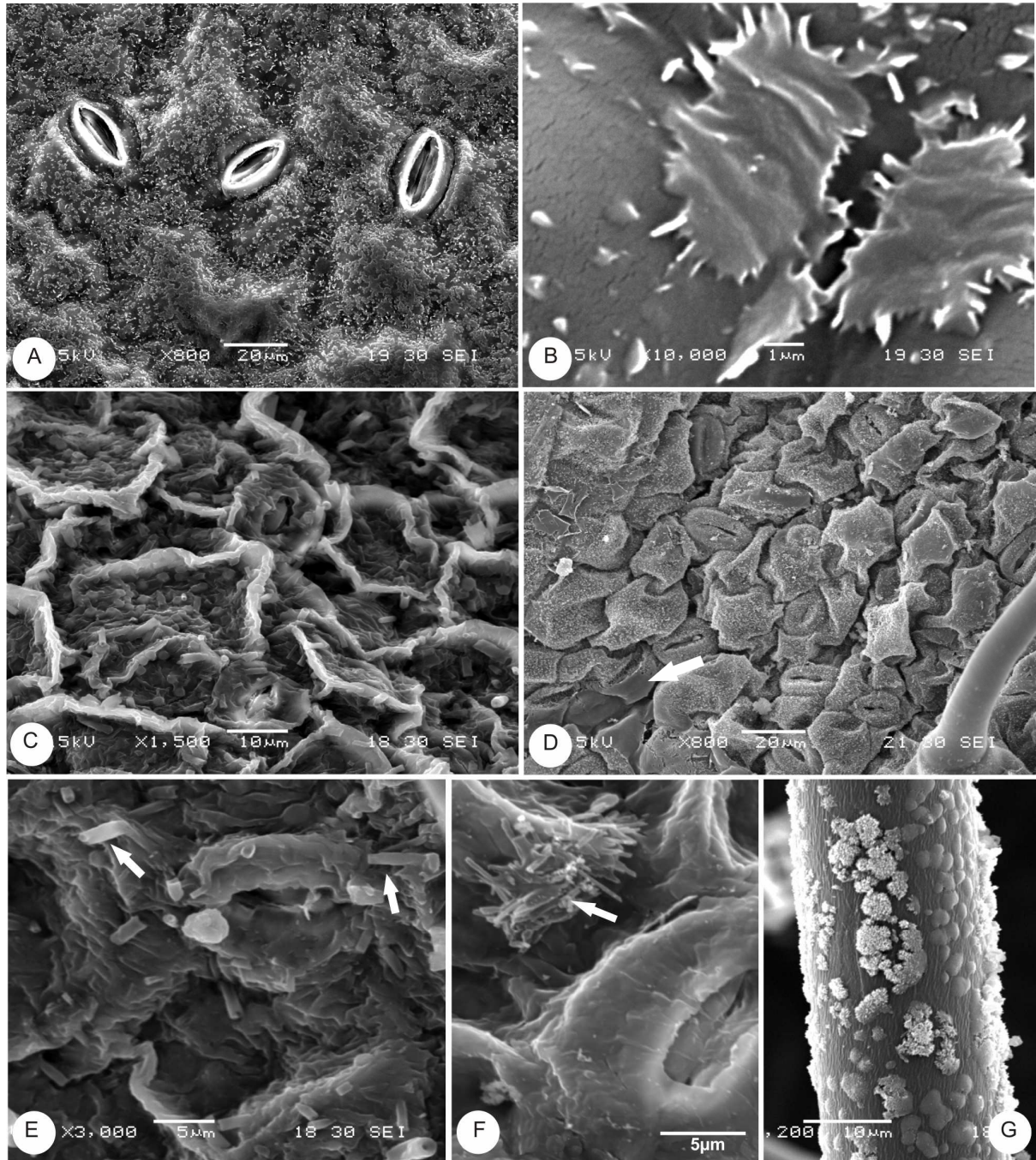




Figura 5 (A-G). Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) *C. sympodialis* mostrando cera distribuída de forma densa sobre a epiderme; (B) Detalhe da cera em forma de grânulos e camadas fissuradas em *C. sympodialis*; (C) *C. glaberrima* com cristais de cera em forma de túbulos; (D) Detalhe de camadas de cera epicuticular na epiderme de *C. andromorpha*; (E) Ultraestrutura da cera em forma de túbulos em *C. pareira*; (F). Cera epicuticular depositada sobre estômatos em *C. pareira*. (G) Cera em forma de grânulos depositada sobre tricomas em *C. ovalifolia*.

Figura 6 (A-D). Nervação foliar de *Cissampelos* L.

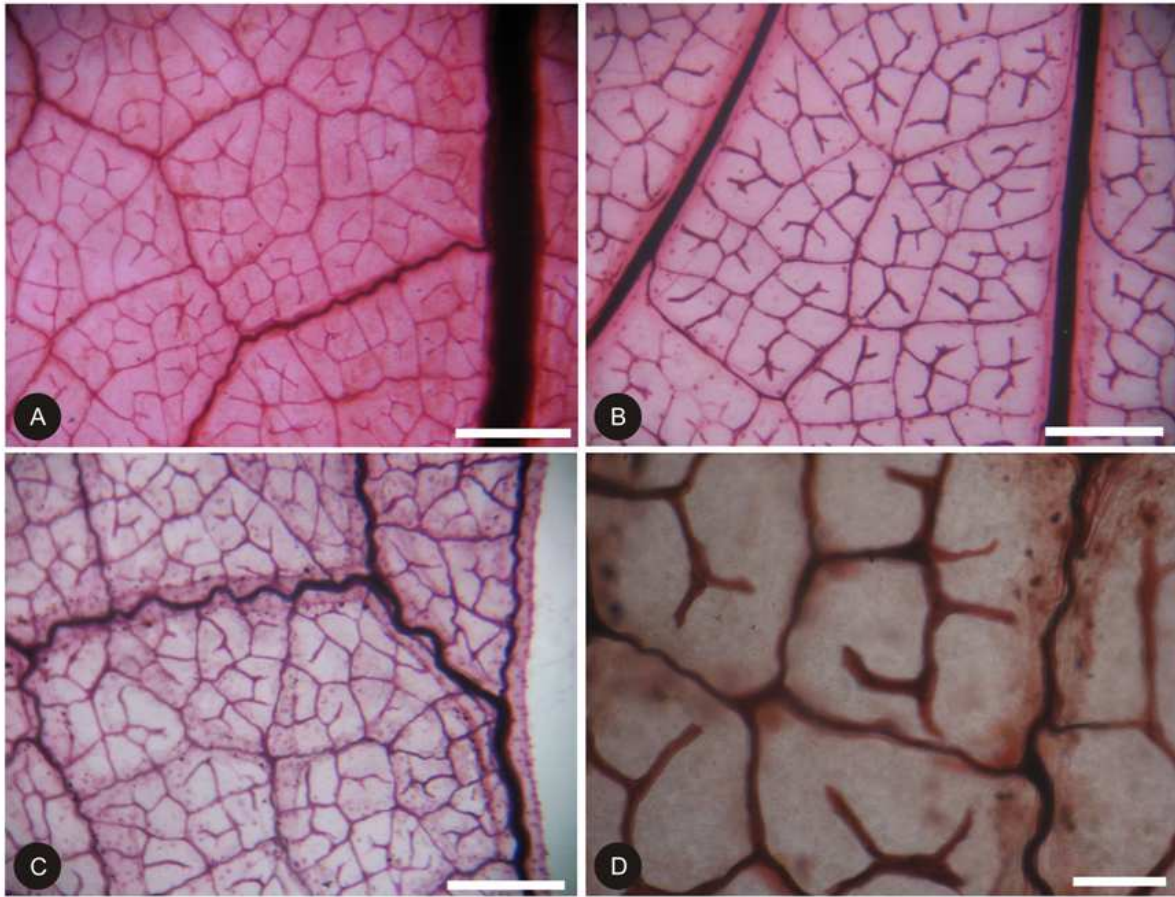


Figura 6 (A-D). Nervação foliar de *Cissampelos*. (A) nervuras quartenárias do tipo poligonal reticulada em *C. glaberrima* (barra 100  $\mu\text{m}$ ); (B) nervuras quartenárias do tipo pecorrente alternada em *C. pareira* (barra 100  $\mu\text{m}$ ); (C) venação última marginal fimbriada em *C. ovalifolia* (barra 100  $\mu\text{m}$ ); (D) *C. sympodialis*, as aréolas são imperfeitas e apresentam formato irregular, com terminações simples, lineares ou curvadas, 2-3 ramificações (barra 250  $\mu\text{m}$ ).

Figura 7 (A-D). Secção transversal do bordo de *Cissampelos* L.

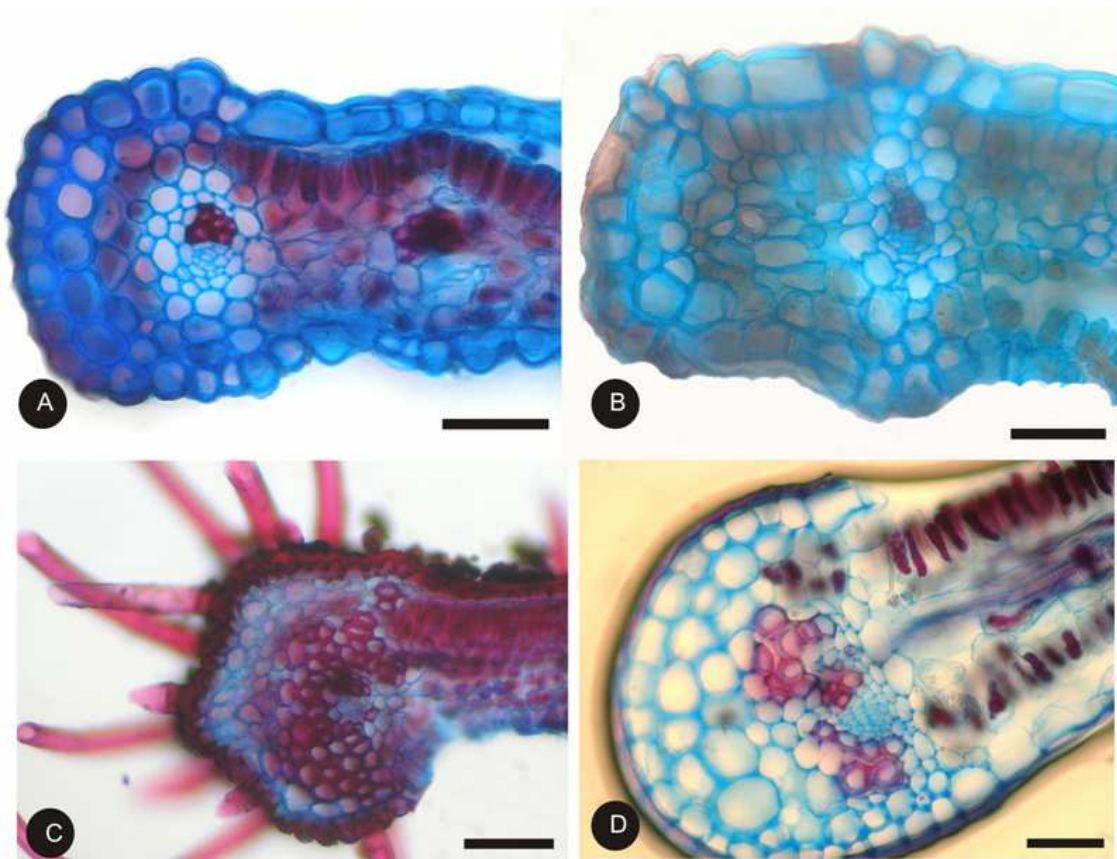


Figura 7 (A-D). Secção transversal do bordo de *Cissampelos*. (A) *C. glaberrima* possui bordo circular (barra 50  $\mu\text{m}$ ); (B) *C. pareira* com bordo revoluto (barra 50  $\mu\text{m}$ ); (C) *C. ovalifolia* possui bordo revoluto, o feixe vascular está envolvido por células esclerenquimáticas formando um arco (barra 100  $\mu\text{m}$ ); (D) *C. sympodialis* apresenta bordo rotundo (barra 50  $\mu\text{m}$ ).

Figura 8 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.

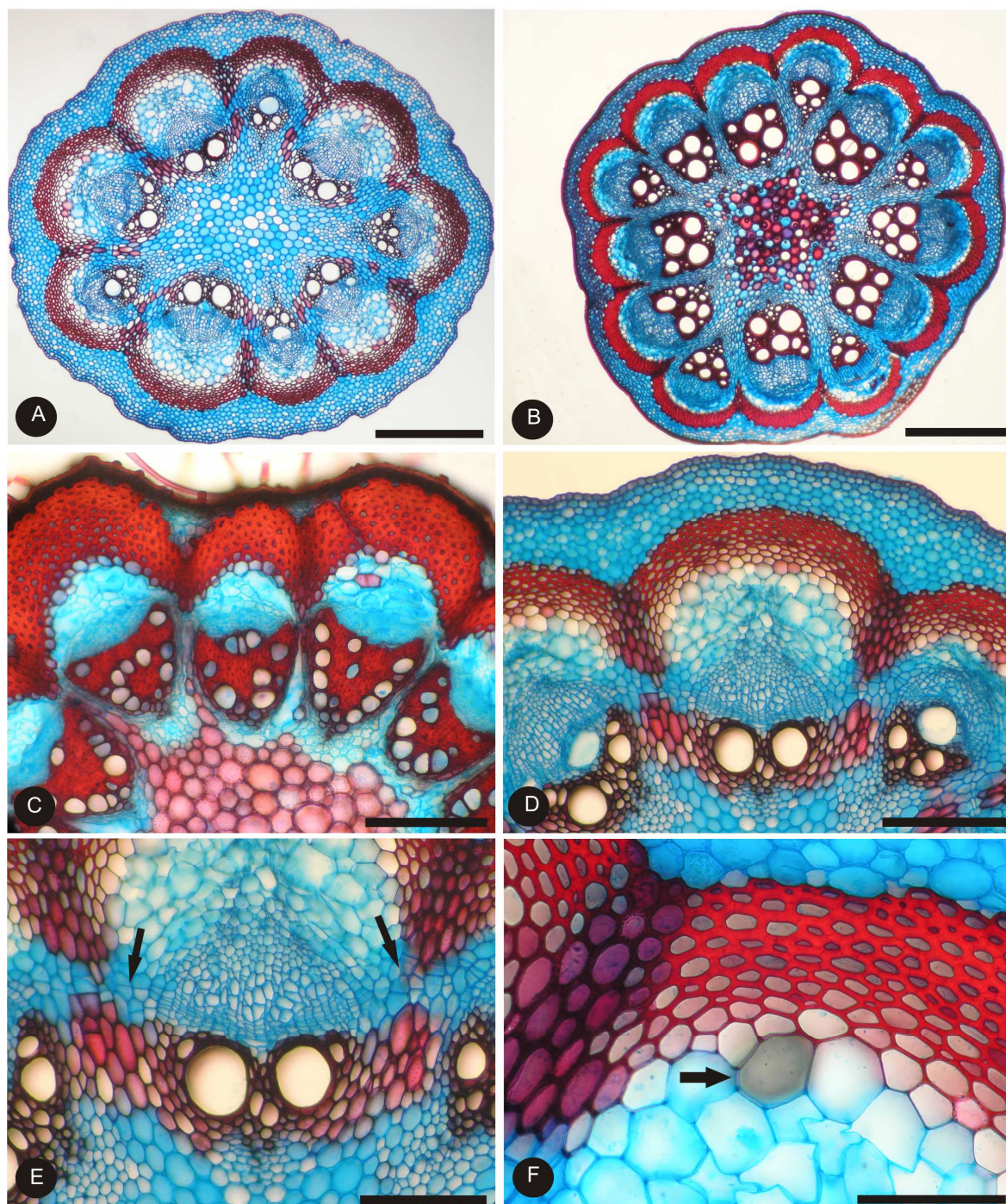


Figura 8 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.: (A) *C. sympodialis*, com medula formada por células parenquimáticas (barra 500  $\mu\text{m}$ ); (B) *C. glaberrima* com células esclerificadas na medula (barra 500  $\mu\text{m}$ ); (C) Detalhe da região cortical em *C. ovalifolia* com formação de um anel esclerenquimático envolvendo o sistema vascular (barra 300  $\mu\text{m}$ ); (D) Detalhe da região cortical, formada por colênquima e parênquima subjacente em *C. sympodialis* (barra 200  $\mu\text{m}$ ); (E) Detalhe do câmbio interfascicular em *C. sympodialis* (barra 200  $\mu\text{m}$ ); *C. andromorpha* com idioblastos associados a células parenquimáticas (barra 100  $\mu\text{m}$ ).

## ARTIGO 2

### Caracterização Histoquímica e Cromatográfica de *Cissampelos* spp. (Menispermaceae) utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil

Niara Moura Porto<sup>1</sup>, Emerson Peter da Silva Falcão<sup>2</sup>, Maria de Fátima Agra<sup>3</sup>, Antonio  
Fernando Morais Oliveira<sup>4</sup>

1. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.
2. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Núcleo de Nutrição CAV/UFPE, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.
3. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Caixa Postal 5009, 58051-970, Paraíba, PB, Brasil.
4. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Artigo a ser submetido a “Pharmaceutical Biology”

**Caracterização Histoquímica e Cromatográfica de *Cissampelos* spp. (Menispermaceae)  
utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil**

Niara Moura Porto<sup>1</sup>, Emerson Peter da Silva Falcão<sup>2</sup>, Maria de Fátima Agra<sup>3</sup>, Antonio  
Fernando Morais Oliveira<sup>4\*</sup>

1. Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50670-970, Recife, PE, Brasil.
2. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Núcleo de Nutrição CAV/UFPE, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.
3. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Caixa Postal 5009, 58051-970, Paraíba, PB, Brasil.
4. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50670-901 - Recife, PE, Brasil.

**Resumo**

*Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) é conhecida popularmente como “milona e abuteira” sendo utilizada na medicina tradicional, cujos estudos farmacológicos são bastante promissores no tratamento de doenças do trato respiratório. Neste trabalho realizou-se a caracterização cromatográfica (CCD e CLAE) e histoquímica (MO) de *C. sympodialis* e outras duas espécies morfológicamente semelhantes: *C. glaberrima* e *C. andromorpha*. A análise do extrato etanólico em CLAE evidenciou a presença de alcaloides nas três espécies. Contudo, a presença de warifteína foi constatada somente nos extratos de folhas e caule de *C. sympodialis*, confirmado por dados obtidos em CCD. A análise histoquímica corroborou com

---

\* Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50670-901, Recife, PE, Brasil. Tel: +55-81-2126-8352, Fax: +55-81- 2126-7803, e-mail: [afmoliveira@yahoo.com.br](mailto:afmoliveira@yahoo.com.br)

os dados cromatográficos quanto à presença de alcaloides. O sistema secretor é formado por idioblastos localizados principalmente na região cortical associados a células parenquimáticas e floema. Não foram visualizados ductos secretores. A caracterização anatômica e química de *Cissampelos* permitiu o estabelecimento de parâmetros que serão úteis em testes de autenticidade de drogas a partir dessas espécies.

**Palavra-chaves:** alcaloides, CCD, *Cissampelos*, CLAE, Menispermaceae.

## Introdução

Menispermaceae é uma família predominantemente tropical conhecida quimicamente pela produção de alcaloides, notadamente os bisbenzilisquinolínicos (Barbosa-Filho et al., 2000). Compreende 71 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por oito espécies principalmente na região Nordeste do Brasil (Rhodes, 1975).

*Cissampelos sympodialis* Eichl. é uma espécie exclusiva do território brasileiro, utilizada na medicina popular no combate a tosse, bronquite e doenças respiratórias (Agra et al., 2007). A grande semelhança morfológica existente entre as diferentes espécies de *Cissampelos* (De Wet et al., 2002) faz com que estas compartilhem nomes populares como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” e, conseqüentemente, indicações terapêuticas comuns (Barbosa-Filho et al., 1997). Raízes de *C. glaberrima*, por exemplo, têm as mesmas aplicações medicinais que *C. sympodialis* (Agra et al., 2007).

Alcaloides do tipo bisbenziltetrahydroisoquinolínicos e aporfínicos são comuns em *Cissampelos* (Barbosa-Filho et al., 2000) e assim podem ser utilizados em estudos taxonômicos (quimiosistemático), bem como marcadores para espécies de interesse medicinal (McNair, 1935). Os estudos químicos em *Cissampelos* levaram ao isolamento de vários alcaloides, dentre eles a warifteína (Cortes et al., 1995) ilustrada na figura 9, um dos mais conhecidos farmacologicamente (Freitas et al., 1996; Thomas et al., 1997; Almeida et



al., 1998; Lima et al., 2001; Alexandre-Moreira et al., 2003; Bezerra-Santos et al., 2004; Bezerra-Santos et al., 2006).

De acordo com Oliveira et al. (2000) espécies distintas são confundidas e conseqüentemente empregadas para uma mesma finalidade terapêutica, por compartilharem a mesma denominação popular. As semelhanças morfológicas contribuem para problemas de identificação, troca e até mesmo falsificação. Em se tratando de espécies medicinais as conseqüências podem ser prejudiciais (Joshi et al., 2008).

Devido ao grande interesse comercial em *C. sympodialis*, estudos que caracterize, diferencie e autentique essa espécie são de suma importância do ponto de vista taxonômico e medicinal. Este estudo envolve caracterização histoquímica e cromatográfica de três espécies de *Cissampelos*: *C. sympodialis*, *C. glaberrima* e *C. andromorpha*, utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil, esta última pouco conhecida quimicamente.

## **Material e métodos**

### **Material vegetal**

Foram realizadas coletas no período de agosto de 2008 a fevereiro de 2009, em diferentes áreas dos estados da Paraíba, Pernambuco e Maranhão (Tabela 4). Amostras foram identificadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e depositadas no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB), com duplicatas no Herbário Geraldo Mariz (UFP).

Tabela 4. Procedência e número do voucher das espécies de *Cissampelos* analisadas.

<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Voucher</b>
<i>Cissampelos sympodialis</i>	- Horto de plantas medicinais “Delby Fernandes de Medeiros” (LTF - UFPB)	MF Agra, NM Porto 7.000
	- Campus da UFPE	MF Agra, NM Porto 7.129
<i>Cissampelos andromorpha</i>	- Usina São José, Igarassu-PE	MF Agra, NM Porto, AFM Oliveira 7.132
<i>Cissampelos glaberrima</i>	- Usina São José – PE	MF Agra, NM Porto 7.068,
	- João Pessoa – PB	MF Agra, NM Porto 7.127,
	- Buritirana – MA	MF Agra, NM Porto 7.131

### **Preparação dos extratos**

Folhas e caules foram secos em estufa a 40 °C, triturados separadamente (10 g cada) e submetidos a três macerações exaustivas com etanol a 80%, a temperatura ambiente. Os extratos foliares e caulinares foram concentrados em evaporador rotativo e posteriormente acidificados com HCl 3%. Os extratos foram particionados com clorofórmio e a fração aquosa foi recuperada e alcalinizada com NH<sub>4</sub>OH 10% até pH 9,0. Esta fração contendo alcaloides foi extraída exaustivamente com clorofórmio, recuperada e filtrada sob sulfato de sódio anidro. Cada extrato foi concentrado a pressão reduzida e analisado por CCD e CLAE.

### **Desenvolvimento dos métodos cromatográficos**

Para análises em cromatografia e camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), preparou-se uma solução de 5 mg/mL em etanol de cada extrato. Os

extratos foram cromatografados em placas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck) no sistema clorofórmio/metanol (17:3 v/v) e padrão de warifteína a 1 mg/mL foi usado como substância de referência. Os spots foram visualizados com reagente de Dragendorff (Wagner & Bladt, 1996) sob luz visível e UV 366 nm. As placas foram documentadas por fotografia digital. Os ensaios cromatográficos em CLAE foram realizados em cromatógrafo HITACHI modelo 655A-11, acoplado a um detector de UV, modelo CG437-B. A separação foi realizada em uma coluna cromatográfica de fase reversa MicroPack MCH-18 (300 x 4,0 mm com volume de 20 µL) e operada a um fluxo de 1 mL/min. As análises foram monitoradas a 277 nm, e temperatura do forno ajustada a 30 °C. A fase móvel utilizada para as condições analíticas descritas foi MeOH/ H<sub>2</sub>O/ ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), segundo Legaz & Vicente (1983).

A quantificação da warifteína nas espécies em estudo foi realizada através de uma amostra padrão deste alcalóide. Uma solução estoque de warifteína a 1 mg/mL em metanol espectroscópico foi diluída sucessivamente originando nove concentrações que foram mantidas a 4 °C e armazenadas até as análises. As amostras de warifteína foram injetadas no cromatógrafo (15 µL) em triplicata e a média das áreas dos picos cromatográficos foram utilizadas para a construção da curva de calibração. As frações alcaloídicas (folha e caule) das espécies foram pesadas (1 mg) e diluídas em metanol na concentração 1mg/mL e analisadas por CLAE.

### **Caracterização histoquímica dos alcaloides**

Secções transversais de folhas frescas (lâmina foliar e pecíolo) e fragmentos caulinares foram realizadas à mão livre, com auxílio de lâmina cortante. Posteriormente, as secções foram tratadas com ácido sulfúrico 5%, submetidas ao reagente de Dragendorff (Wagner & Bladt, 1996) e montadas com glicerina a 50%. As estruturas foram observadas e fotografadas (Olympus PM-BP35) ao microscópio óptico (Olympus CX31). Secções sem

tratamento prévio com o reagente Dragendorff e corados com lugol foram utilizadas como controle.

## Resultados e discussão

### Anatomia e Histoquímica

Os alcaloides, frequentemente presentes em Menispermaceae (Pachaly, 1988; Barbosa-Filho et al., 2000), constituem um grupo heterogêneo sob o ponto de vista químico, bioquímico e fisiológico, com distribuição restrita a determinada taxa e ocorrência em diferentes órgãos da planta (McNair, 1935). O resultado dos testes histoquímicos aplicados às secções transversais do caule e folhas nas espécies de *Cissampelos*, demonstrou reação positiva para alcaloides, apresentando coloração castanha avermelhada nas células secretoras (Fig. 10).

As estruturas secretoras são registradas para vários gêneros de Menispermaceae como *Cyclae*, *Diploclisia*, *Stephania* e *Cissampelos* (Metcalf & Chalk, 1957). Tais estruturas podem estar individualizadas constituindo os idioblastos ou compondo estruturas multicelulares como os ductos ou canais (Castro & Machado, 2006). Nas espécies analisadas o material secretado está armazenado em idioblastos, não sendo observados ductos ou cavidades secretoras. A ocorrência de ductos em *Cissampelos* associados ao tecido vascular, no córtex, em células colenquimáticas e medula foi descrita nas folhas de *C. hirta* e *C. torulosa*, mas não em *C. capensis* e *C. mucronata* (De Wet et al., 2002).

A anatomia do caule das espécies de *Cissampelos* estudadas é estruturalmente similar. A região cortical formada por células colenquimáticas apresentou idioblastos secretores associados ao parênquima clorofiliano (Figs. 10F, H). Em *C. andromorpha* o parênquima encontra-se em fase de esclerificação, onde estão incluídos abundantes grupos de células pétreas, as esclereídes contendo alcaloides (Fig. 10J). Idioblastos ocorrem em torno do

floema secundário de vários feixes colaterais dispostos em círculo e envolvidos por um anel esclerenquimático (Figs. 10C, I). A medula é constituída por células parenquimáticas contendo grânulos de amido (Figs. 10A, D, G). Embora ocorra a realização simultânea da coloração de amido, em diferentes tonalidades, a avaliação de tais grânulos foi baseada na observação dos ensaios de controle, permitindo a diferenciação dos alcaloides (Fig. 10B).

Na nervura mediana e no pecíolo foram observados poucos idioblastos secretores, restritos a região cortical, associados ao colênquima ou a células parenquimáticas próximas ao feixe vascular colateral (Fig. 10E). De modo geral, as células parenquimatosas provavelmente envolvidas na síntese de metabólitos secundários, são abundantes em toda região cortical até diversas faixas cambiais, incluindo o floema secundário.

### **Análises cromatográficas**

Os resultados das análises cromatográficas (CCD e CLAE) para detecção de alcaloides quando confrontados com os testes histoquímicos reforçaram a ocorrência desses metabólitos nas três espécies investigadas. Nas análises em CCD (Figs. 11A, B), os extratos caulinares de *C. sympodialis* e de *C. glaberrima* apresentaram uma maior intensidade e/ou maior número de *spots* com resultados positivos para alcaloides. A literatura reporta a ocorrência de vários alcaloides nestas duas espécies (Pachaly, 1988; Barbosa-Filho et al., 2000). Por outro lado, a ocorrência de alcaloides em *C. andromorpha* não foi fortemente evidenciada através da CCD. Fischer et al. (2004), utilizando metodologia semelhante à empregada neste estudo, identificaram frações com resultados positivos para alcaloides em *C. andromorpha*. Estudos químicos com esta espécie, no entanto, são raros.

A ocorrência de warifiteína ( $R_f$  0,72) só foi confirmada nos extratos foliares e caulinares de *C. sympodialis*. Além de *C. sympodialis*, warifiteína também ocorre em *C. ovalifolia*, espécie onde este alcaloide foi isolado inicialmente (Palmer et al., 1971). Como não

há relatos da ocorrência deste alcaloide em nenhuma outra espécie de *Cissampelos*, este funciona como um bom marcador para diferenciar *C. sympodialis* de *C. glaberrima* e *C. andromorpha*.

Os resultados dos testes histoquímicos para detecção de alcaloides foram apoiados pelas análises de CCD e CLAE dos extratos etanólicos das folhas e caule. Nas análises em CCD, o sistema de fase móvel escolhido foi o que utiliza clorofórmio/metanol (17:3 v/v) por apresentar melhor separação dos alcalóides alvos. Os perfis obtidos para os alcaloides neste sistema de eluição testado, utilizando-se uma largura de aplicação de amostra e distância de desenvolvimento respectivamente de 1 e 16,5 cm (placa cromatográfica de 20 cm), é mostrado na Figura 3. O número de manchas observadas nas frações obtidas de folhas foi equivalente às frações obtidas do caule nas espécies analisadas. A fração obtida de *C. andromorpha* exibiu um número menor de manchas quando comparadas às demais. O alcaloide warifiteína apresentou Rf próximo a 0,72, com fluorescência amarela-avermelhada, quando revelado sob luz UV 366 nm, e fluorescência levemente azulada sob luz UV 254 nm. Este alcaloide foi identificado nas frações obtidas de *C. sympodialis* (folha e caule), não sendo visualizado nas frações extraídas de *C. glaberrima* e *C. andromorpha*.

O cromatograma obtido pela cromatografia líquida (Fig. 12) mostra a detecção da warifiteína após 5,38 min de análise. A curva de calibração para a warifiteína estabelecida com as nove concentrações pelo método dos mínimos quadrados forneceu a equação da reta  $y = 0,0038x + 0,0092$ . A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9987$ , valor que comprova a linearidade do método (Fig. 13).

Os picos nos cromatogramas obtidos foram comparados com o tempo de retenção da warifiteína (Figs. 14A-C). A presença deste alcaloide foi confirmada novamente nos extratos de *C. sympodialis*. Também foi confirmado pela CLAE que a warifiteína não está presente

nos extratos das demais espécies. Os demais picos cromatográficos não identificados podem tratar-se dos outros alcaloides referidos na literatura para as espécies.

A ausência de warifiteína em *C. glaberrima* e *C. andromorpha* não descende estas espécies como medicinais. Maiores estudos que enfoquem a atividade biológica destas plantas devem ser realizados para a confirmação do seu potencial medicinal, principalmente para esta última, ainda desconhecida quimicamente.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem as agências de fomento CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas e Desenvolvimento) e a FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo suporte financeiro. Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva e a Profa. Dra. Eugênia Pereira, pela concessão do cromatógrafo líquido de alta eficiência do Laboratório de Química de Produtos Naturais - UFPE e ao técnico João Antônio Virgínio pelo auxílio nas análises químicas.

### **Referências**

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 17, 114-140.
- Alexandre-Moreira MS, Freire-de-Lima CG, Trindade MN, Castro-Faria-Neto HC, Piuvezam MR, Peçanha LMT. (2003). Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Braz J Med Biol Res*, 36, 199-205.

Almeida RN, Navarro DS, Assis TS, Medeiros IA, Thomas G. (1998). Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. *J Ethnopharmacol*, 63, 247–252.

Barbosa-Filho JM, Agra MF, Thomas G. (1997). Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *J Braz Assoc Advanc Sci*, 49, 386-394.

Barbosa-Filho JM, Da-Cunha EVL, Gray AI. (2000). Alkaloids of the Menispermaceae. In: Cordell G.A. (org.). *The Alkaloids*, 54, 1-190. Academic Press, Illinois.

Bezerra-Santos CR, Balestieri FMP, Rossi-Bergmann B, Peçanha LMT, Piuvezam MR 2004. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol*, 95, 191–197.

Bezerra-Santos CR, Vieira-de-Abreu A, Barbosa-Filho JM, Bandeira-Melo C, Piuvezam MR, Bozza PT 2006. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *Int Immunopharmacol*, 6, 1152-1160.

Castro MM, Machado SR. (2006). Células e tecidos secretores. In: Appeazzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM, eds. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: UFV, 179-203.

Cortes SF, Alencar JL, Thomas G, Barbosa-Filho JM. (1995). Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Phytother Res*, 9, 579-583.

De Wet H, Tilney PM, Van Wyk BE. (2002). Vegetative morphology and anatomy of *Cissampelos* in South Africa. *S Afr J Bot*, 68, 181–190.

Fischer DCH, Gualda NCA, Bachiega D, Carvalho CS. (2004). In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Trop*, 92, 261-266

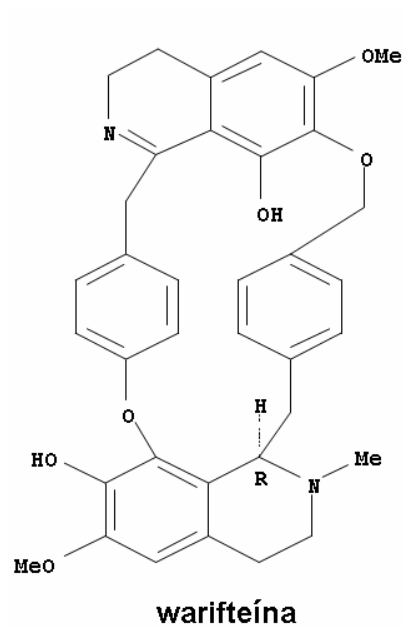


- Freitas MR, Cortes SF, Thomas G, Barbosa-Filho JM. (1996). Modification of  $Ca^{2+}$  metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of wariftein, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *C. sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *J Pharm Pharmacol*, 48, 333-336.
- Joshi VC, Avula B, Khan IA. (2008). Authentication of *Stephania tetrandra* S. Moore (Fang Ji) and differentiation of its common adulterants using microscopy and HPLC analysis. *J Nat Med*, 62, 117–121.
- Legaz MEE, Vicente C. Endogenous inactivators of arginase decarboxilase and agmatine amidinohydrolase. (1983). In: *Evernia prusnatri* thallus. *Plant Physiol*, 71, 300-302.
- Lima KVB, Ribeiro R, Balestieri FMP, Thomas G, Piuvezam MR. (2001). Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) leaf extract. *Acta Farm Bonaerense*, 20, 275-279.
- McNair JB. (1935). The Taxonomic and Climatic Distribution of Alkaloids. *J Torrey Bot Soc*, 62, 219-226.
- Metcalf CR, Chalk L. (1957). *Anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press: Oxford.
- Oliveira AFM, Andrade LHC. (2000). Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* JACQ. e *Justicia gendarussa* BURM. F. (Acanthaceae). *Acta Amazonica*, 30, 569-578.
- Pachaly P. (1988). Analytical studies on the structure of natural products from Menispermaceae drugs. *Arch Pharm Res*, 11, 14-32.
- Palmer RA, Reynolds CD, Bywater RP. (1971). Preliminary studies on the structure and function of the bisbenzylisoquinoline alkaloids warifteine and D-tubocurarine chloride. *J Cryst Mol Struct*, 1, 307-309.
- Rhodes DG. (1975). A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytol*, 30, 415-485.

Thomas G, Araújo CC, Duarte JC, Souza DP 1997. Bronchodilatory activity of an aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in guinea-pig. *Phytomed*, 4, 233-238.

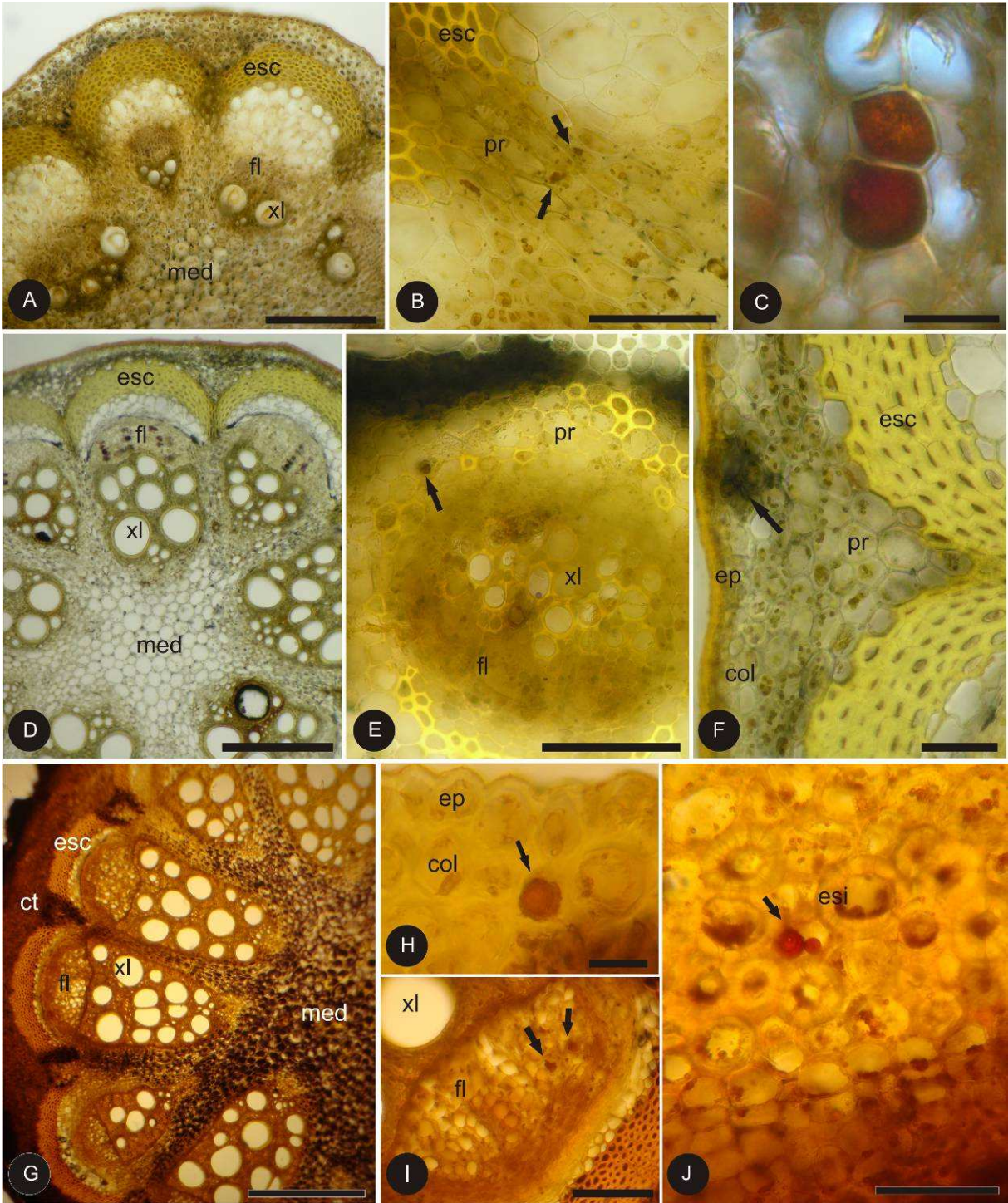
Wagner H, Bladt S. (1996). *Plant drug analysis*. New York: Springer Verlag.

Figura 9 Alcaloide warifteína.



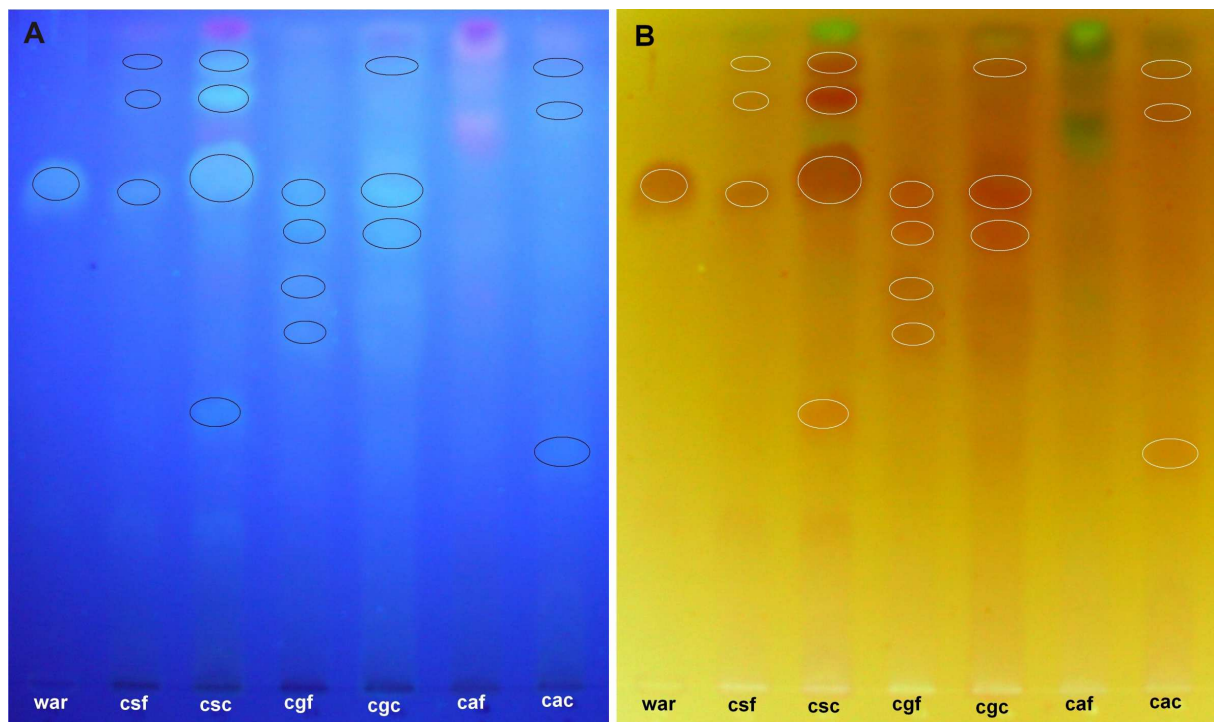
Legenda: Estrutura química da warifteína, alcaloide isolado do extrato das folhas de *Cissampelos sympodialis*.

Figura 10 (A-J) Anatomia e histoquímica de *Cissampelos*.



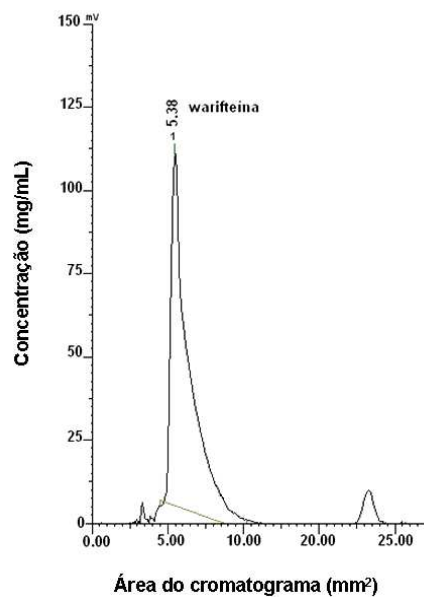
Legenda: Anatomia e histoquímica de *Cissampelos*. A-C: *Cissampelos sympodialis*: A – Secção transversal do caule (escala 300  $\mu\text{m}$ ); B – Secção transversal do caule evidenciando células parenquimáticas contendo alcaloides (escala 100  $\mu\text{m}$ ); C – Idioblastos com alcaloides (escala 50  $\mu\text{m}$ ). D-F: *Cissampelos glaberrima*: D – Secção transversal do caule (escala 300  $\mu\text{m}$ ); E – Detalhe de idioblastos com alcaloides presentes na nervura mediana (escala 100  $\mu\text{m}$ ); F – Região cortical do caule evidenciando célula secretora (escala 50  $\mu\text{m}$ ). G-J: *Cissampelos andromorpha*: G – Secção transversal do caule (escala 300  $\mu\text{m}$ ); H – Idioblastos associados a células colenquimáticas na nervura mediana (escala 100  $\mu\text{m}$ ). I – Secção transversal do caule destacando idioblastos presentes no floema (escala 100  $\mu\text{m}$ ); J – Região cortical mostrando esclereídes com alcaloides (escala 100  $\mu\text{m}$ ). Legenda: ct: córtex; ep: epiderme; fl: floema; xl: xilema, md: medula; pr: parênquima; col: colênquima; esi: esclereíde.

Figura 11 (A-B) Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de *Cissampelos*.



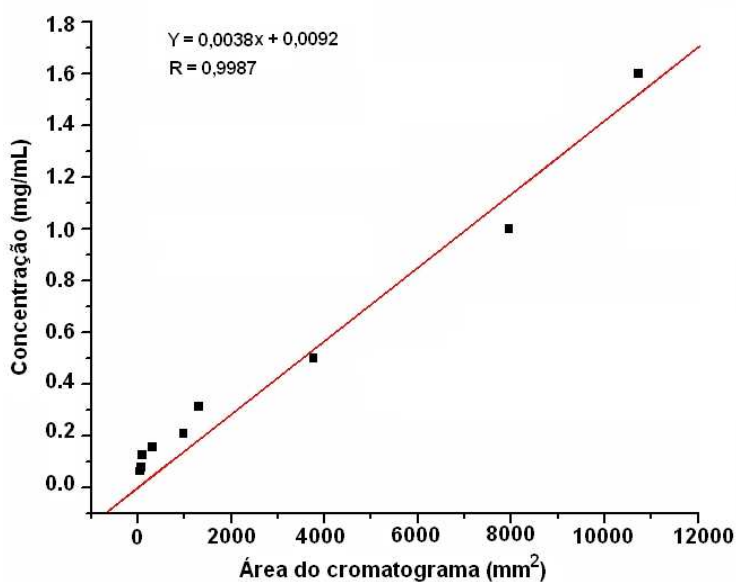
Legenda: Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de *Cissampelos* visualizada em UV a 366 nm (A) e borrifadas com Dragendorff (B). Manchas alcaloídicas destacadas nas cromatoplasmas. Legenda: warf: padrão warifteína; csf: extrato foliar de *C. sympodialis*; csc: extrato caulinar de *C. sympodialis*; cgf: extrato foliar de *C. glaberrima*; cgc: extrato caulinar de *C. glaberrima*; caf: extrato foliar de *C. andromorpha*; cac: extrato caulinar de *C. andromorpha*.

Figura 12 Cromatograma (CLAE) do padrão warifteína.



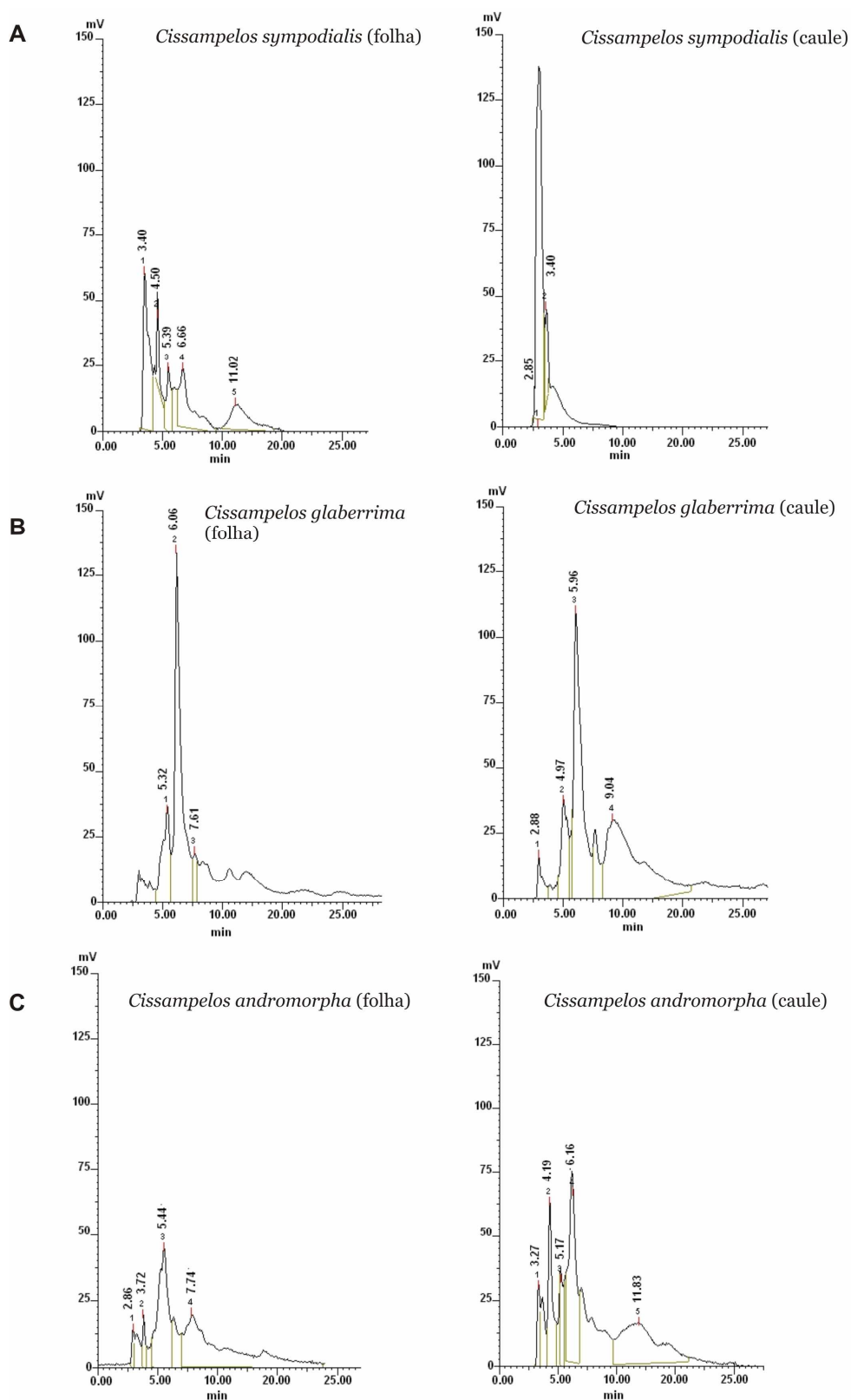
Legenda: Cromatograma (CLAE) do padrão warifteína (1,0 mg/mL) em MeOH/H<sub>2</sub>O/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), a  $\lambda$  277nm. Número corresponde ao tempo de retenção.

Figura 13 Gráfico da linearidade.



Legenda: Gráfico da linearidade obtido com o procedimento de quantificação da warifteína em comprimento de onda 277 nm.

Figura 14 (A-C) Cromatogramas (CLAE) das espécies de *Cissampelos*.



Legenda: Cromatogramas (CLAE) das espécies de *Cissampelos* na concentração 1,0 mg/mL, com fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O/ácido acético (80:9,5:0,5 v/v), a  $\lambda$  277 nm. Números correspondem ao tempo de retenção.



### **Considerações finais**

Os caracteres epidérmicos foliares apresentaram um papel importante na diagnose das espécies em estudo, oferecendo assim valiosas pistas para a identificação. A forma e orientação dos estômatos, peculiaridades estruturais das paredes epidérmicas, a presença de apêndices epidérmicos e células especializadas e a ornamentação e distribuição de ceras epicuticulares foram considerados bons marcadores.

As estruturas anatômicas presentes nas folhas e caules das espécies analisadas, mostraram características peculiares à família Menispermaceae, à exceção da ausência de câmbios sucessivos, a presença de canais ou cavidades secretoras e hipoderme. O parâmetro anatômico vascular permitiu o estabelecimento do padrão quanto à formação do anel esclerenquimático e disposição ao longo do caule, pecíolo e nervura. O sistema secretor é formado exclusivamente por idioblastos dispostos principalmente na região cortical associados a células parenquimáticas.

O desenvolvimento de técnicas de identificação por CCD e CLAE para os extratos obtidos destas espécies, com o estabelecimento das condições cromatográficas, permitiu caracterizar drogas vegetais obtida de *C. sympodialis*, utilizando-se a warifteína como marcador químico. Entretanto são necessários maiores estudos, sobretudo com *C. andromorpha*, uma espécie ainda pouco conhecida quimicamente, visando uma maior compreensão do potencial farmacológico, bem como das outras espécies analisadas.

**RESUMO** - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *Cissampelos* L. (MENISPERMACEAE) UTILIZADAS COMO MEDICINAIS NO NORDESTE DO BRASIL. O gênero *Cissampelos* (Menispermaceae) compreende, em geral, trepadeiras herbáceas, com uma única espécie arbustiva, *Cissampelos ovalifolia* DC. No Brasil são encontradas oito espécies, das quais cinco ocorrem no Nordeste e uma espécie, *Cissampelos sympodialis* Eichl., é exclusiva do território brasileiro. A grande semelhança morfológica entre as espécies de *Cissampelos* contribui para problemas de identificação, troca e até mesmo falsificação quando as espécies são empregadas como medicinais. Este estudo envolve a caracterização anatômica e química de cinco espécies de *Cissampelos* utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil. Algumas características anatômicas observadas apresentam-se semelhantes entre as espécies como lâmina hipoestomática, estômatos anomocíticos, venação actinódroma-broquidódroma, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colaterais e colênquima lacunar. Contudo, alguns caracteres foliares foram distintivos, como presença e distribuição de papilas, tricomas tectores, contorno das paredes epidérmicas, micromorfologia e distribuição das ceras epicuticulares. Análises cromatográficas revelaram a presença de alcalóides que puderam ser visualizados em idioblastos secretores através de testes histoquímicos. O alcaloide warifteína foi identificado apenas em *C. sympodialis* podendo ser utilizado como um marcador químico.

**Palavra-Chaves:** Menispermaceae, *Cissampelos*, anatomia vegetal, fitoquímica.

**ABSTRACT** - ANATOMICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF *CISSAMPELOS* L. (MENISPERMACEAE) EMPLOYED AS MEDICINAL SPECIES IN THE NORTHEASTERN BRAZIL. The *Cissampelos* L. genus (Menispermaceae) consists of herbaceous twining vines or lianas, only one species, *C. ovalifolia* DC., is a shrub erect perennial. In Brazil, eight species are found, and five occur in the Northeast region. Of these, one species *Cissampelos sympodialis* Eichl. is endemic. The highest morphological similarity between *Cissampelos* species contributes to problems of identification, exchange and adulteration when the species are employed as medicinal. This study involves the chemical and anatomical characterization of five species of *Cissampelos* used as medicine in the Northeast of Brazil. Some anatomical and morphological characteristics are similar between species as dorsiventral mesophyll, leaf blade hypostomatic, anomocytic stomata, collateral vascular bundles and actinodromous-brochidodromous venation. However, some foliar characters were distinctive: presence and distribution of papillae, tector trichomes, contour of epidermal cells, and micromorphology and distribution of epicuticular waxes. Chromatographic analysis revealed the alkaloids presence in this species, and were also detected in secretory idioblasts by histochemical tests. The alkaloid warifteine was identified only in *C. sympodialis* and may be used as a chemical.

Keywords: Menispermaceae, *Cissampelos*, plant anatomy, phytochemistry.

## APÊNDICE

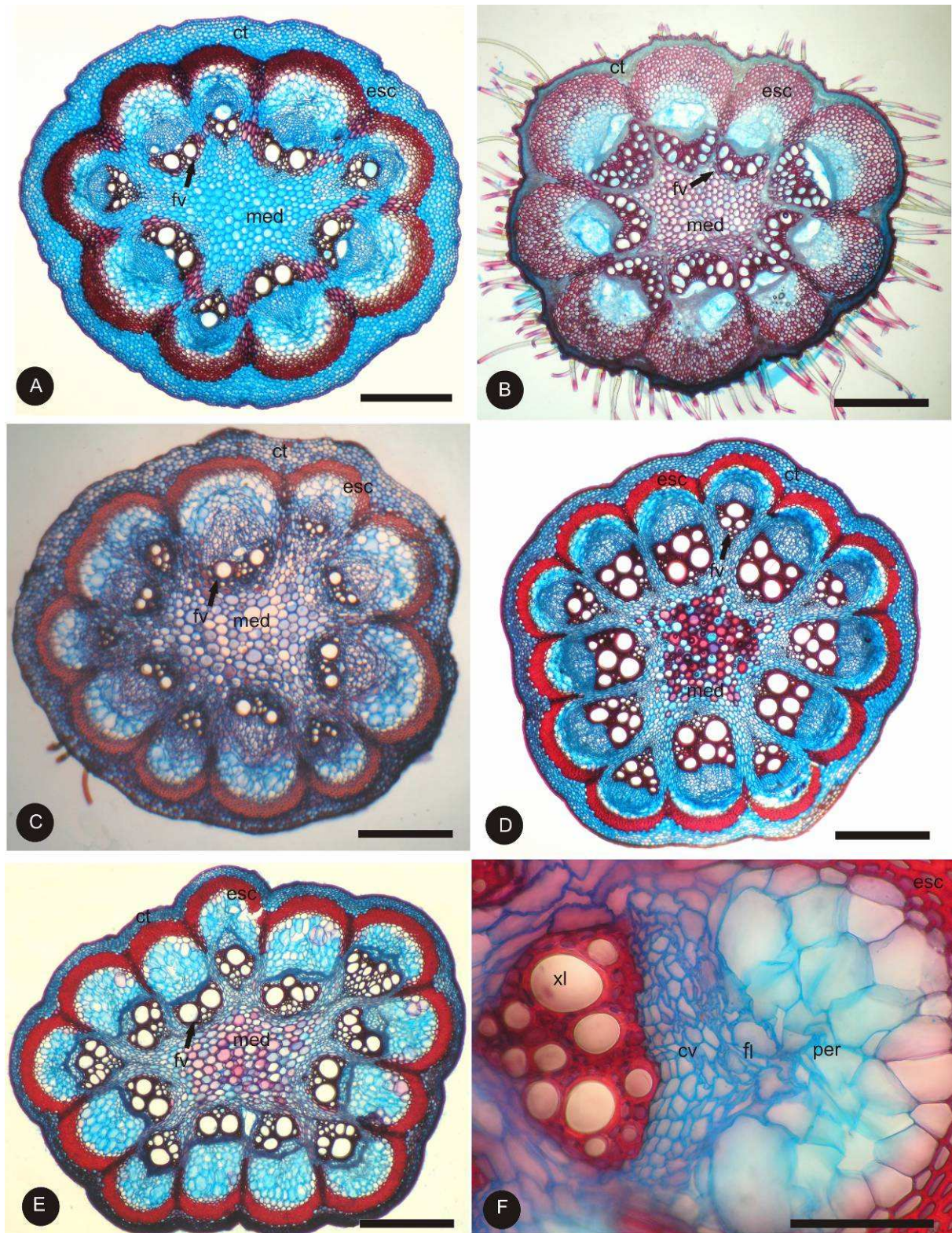


Figura 1 (A-F). Secção transversal do caule. A: *C. sympodialis*; B: *C. ovalifolia*; C: *C. andromorpha*; D: *C. glaberrima*; E: *C. pareira*; F: Detalhe do feixe vascular de *C. pareira*. Legenda: ct: córtex, esc: esclerênquima, fv: feixe vascular, med: medula, fl: floema, xl: xilema, cv: câmbio vascular, per: periciclo (Barra: A-E = 500 $\mu$ m; F = 100 $\mu$ m).

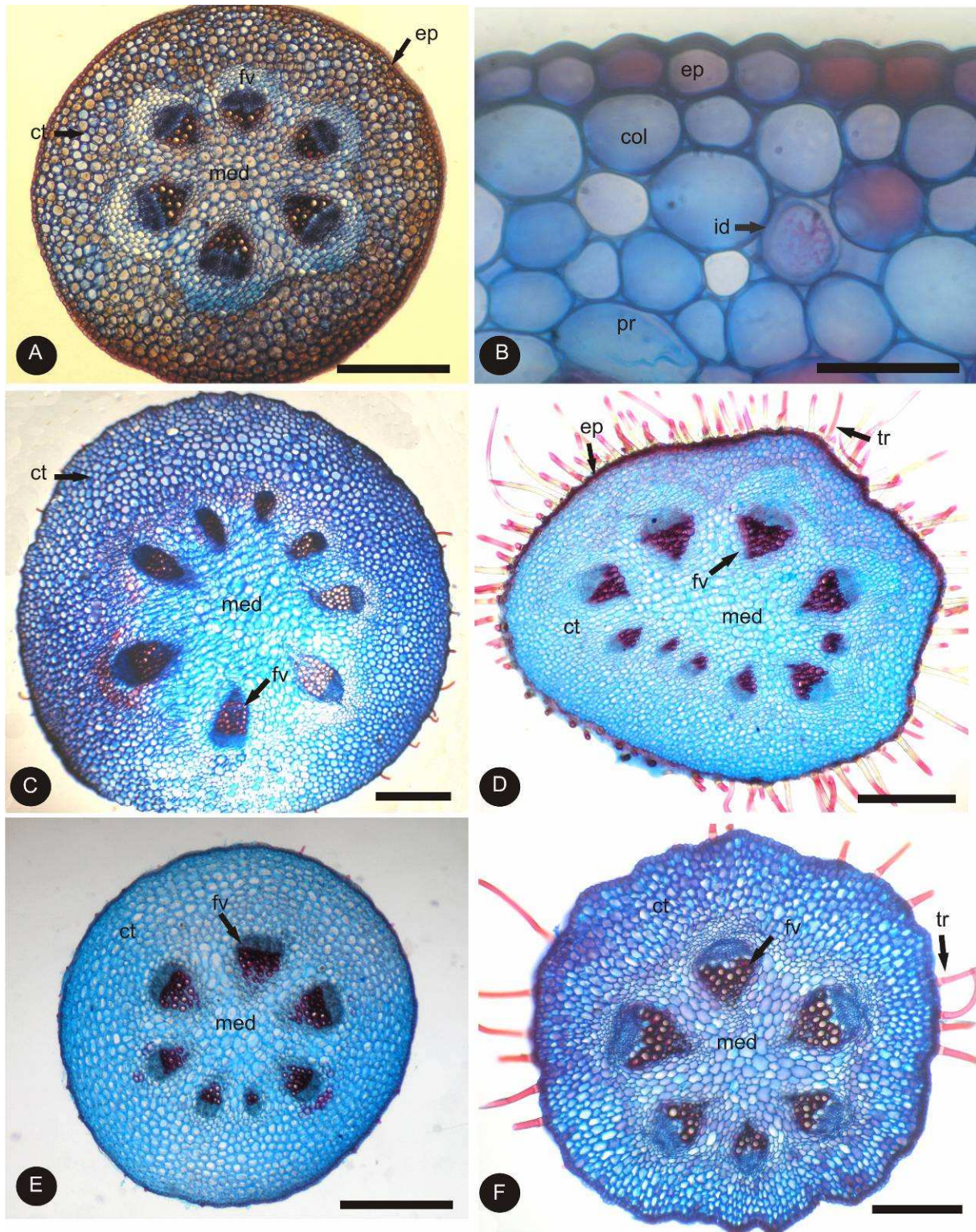


Figura 2 (A-F). Secção transversal do pecíolo basal. A: *C. sympodialis*; B: Detalhe da região cortical de *C. sympodialis* evidenciando idioblasto; C: *C. andromorpha*; D: *C. ovalifolia*; E: *C. pareira*; F: *C. glaberrima*. Legenda: ct: córtex, ep: epiderme, fv: feixe vascular, med: medula, tr: tricoma, pr: parênquima (Barra: A, C, D, E = 500µm; B = 100µm).

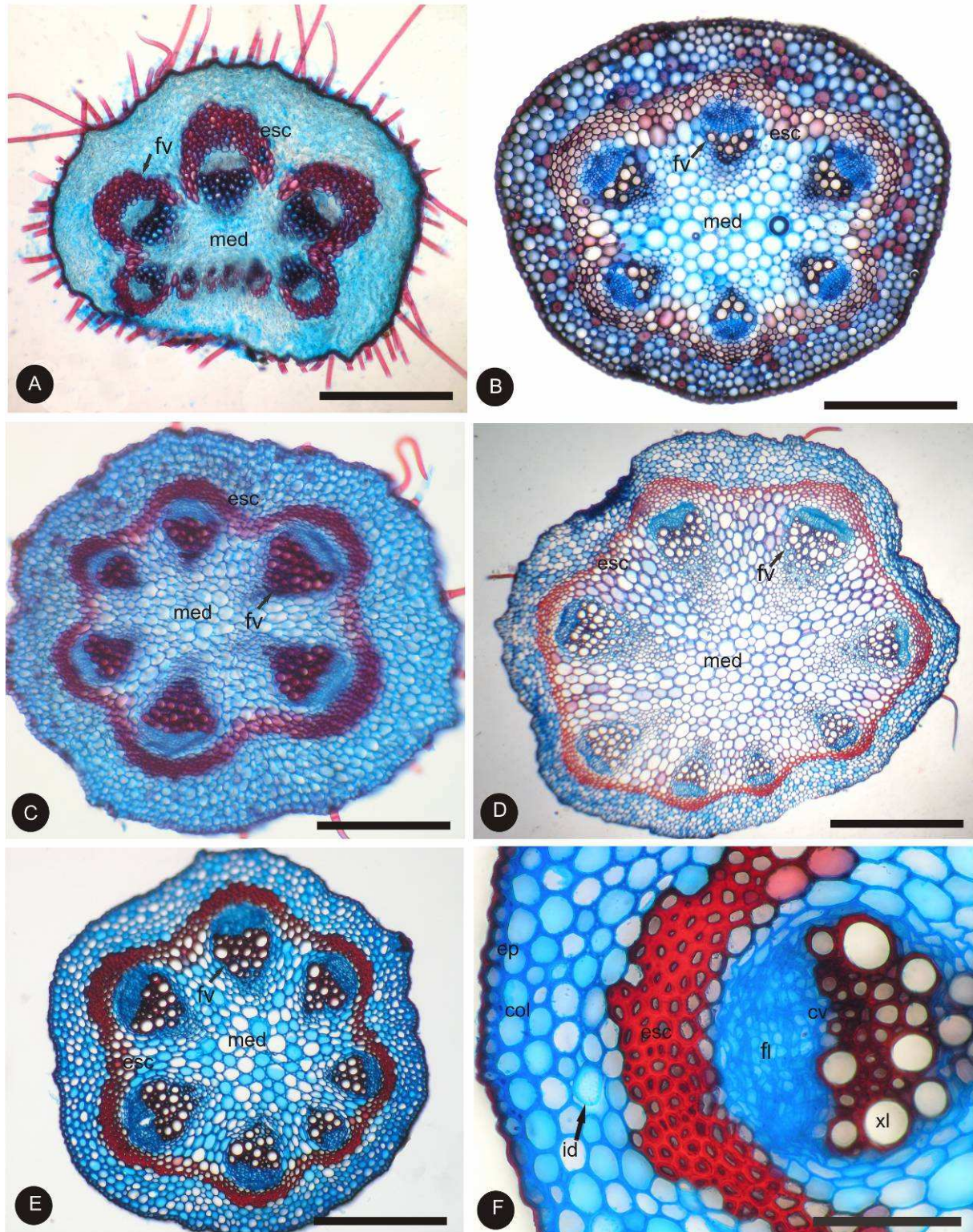


Figura 3 (A-F). Secção transversal do pecíolo mediano. A: *C. ovalifolia*; B: *C. sympodialis*; C: *C. pareira*; D: *C. andromorpha*; E: *C. glaberrima*; F: Detalhe da região cortical de *C. glaberrima* evidenciando idioblasto. Legenda: ep: epiderme, fv: feixe vascular, med: medula, col: colênquima, esc: esclerênquima, fl: floema, xl: xilema, cv: câmbio vascular (Barra: A-E = 300  $\mu$ m; F = 100  $\mu$ m).

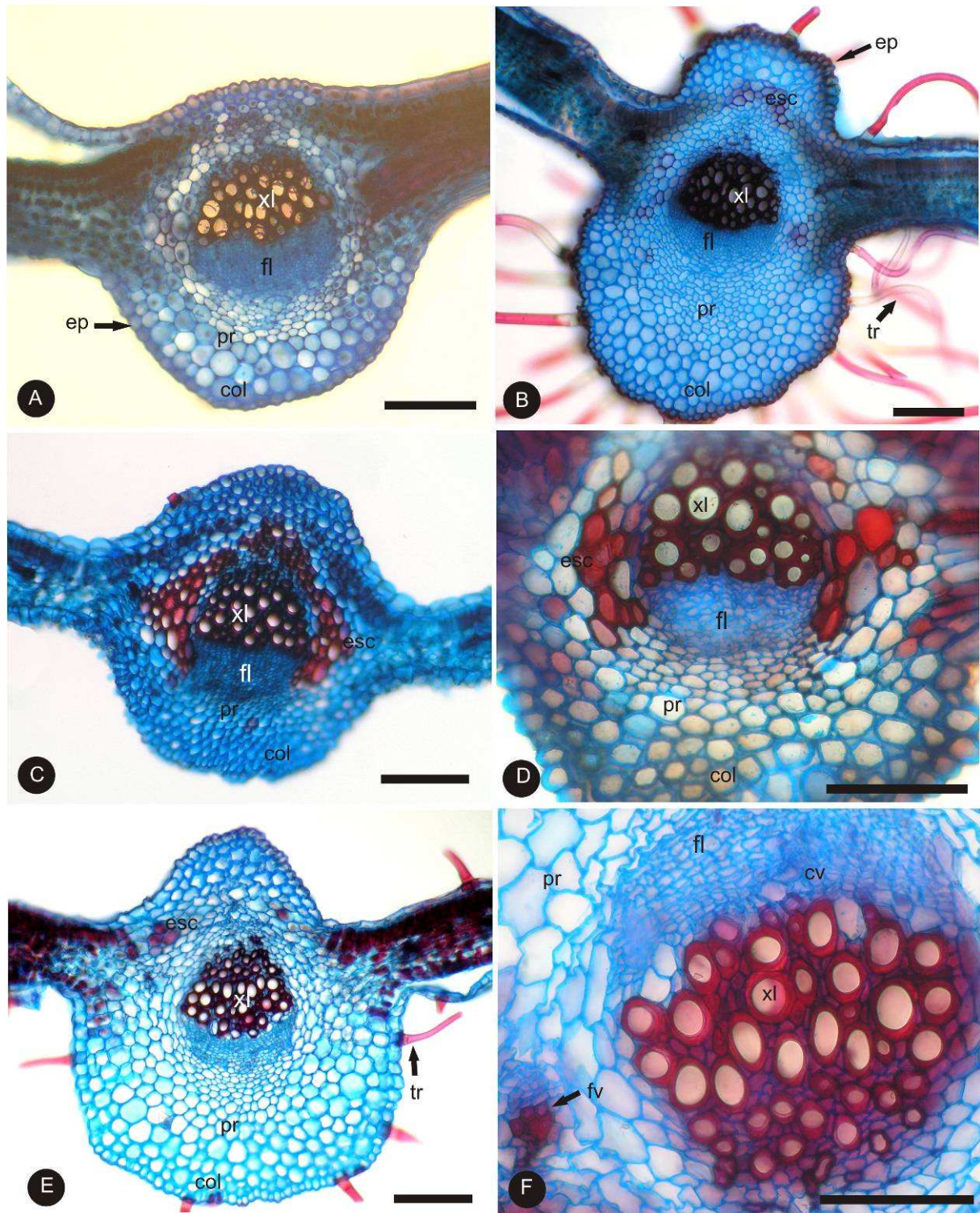


Figura 4 (A-F). Secção transversal da nervura basal. A: *C. sympodialis*; B: *C. ovalifolia*; C: *C. glaberrima*; D: Detalhe do feixe vascular colateral de *C. glaberrima*; E: *C. pareira*; F: Detalhe do sistema vascular de *C. glaberrima* evidenciando feixe vascular colateral diminuto. Legenda: ep: epiderme, fv: feixe vascular, med: medula, col: colênquima, esc: esclerênquima, fl: floema, xl: xilema, cv: câmbio vascular, pr: parênquima, tr: tricoma (Barra: A, B, E = 150  $\mu$ m; C = 300  $\mu$ m; D, F = 100 $\mu$ m).



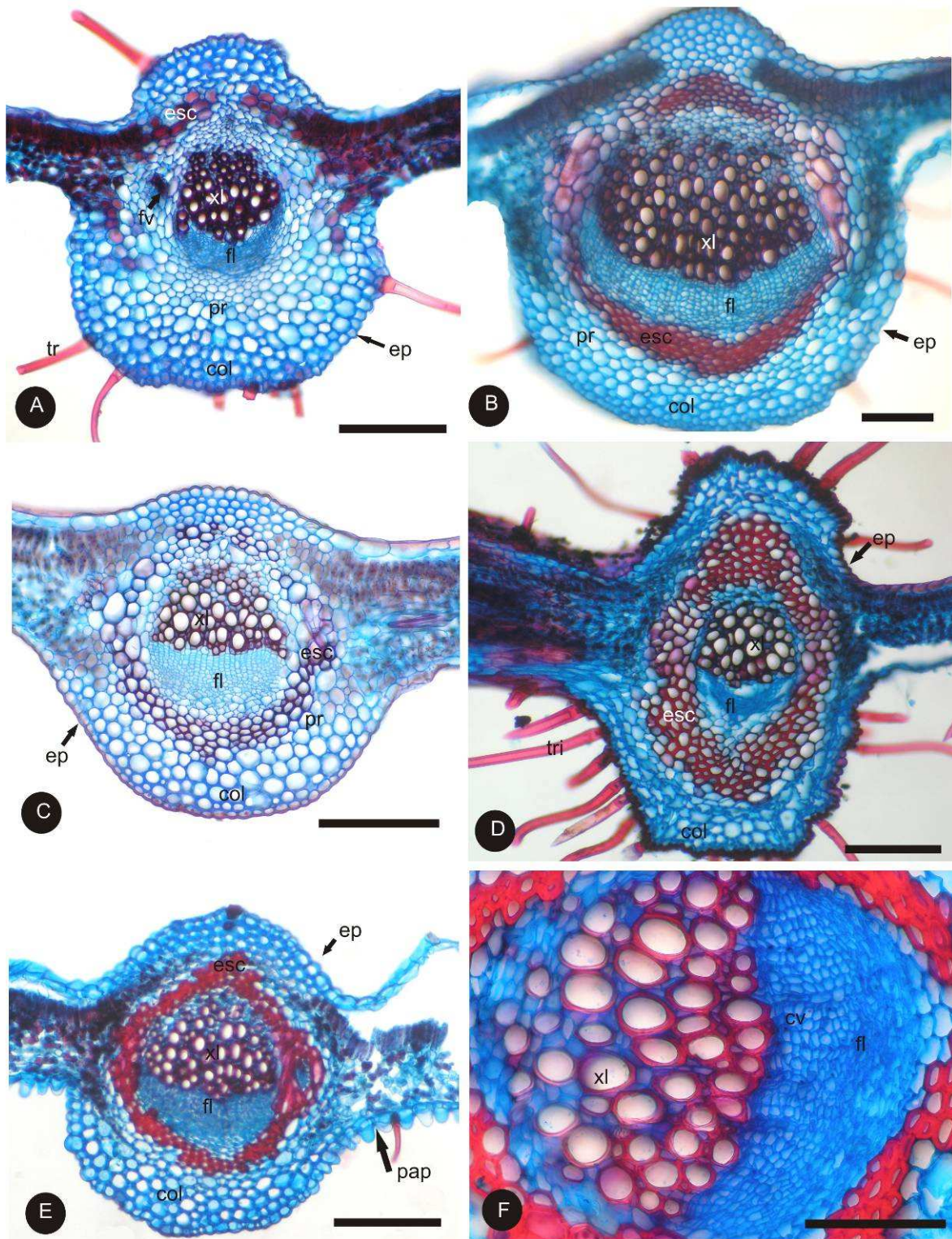


Figura 5 (A-F). Secção transversal da nervura mediana. A: *C. pareira*; B: *C. andromorpha*; C: *C. sympodialis*; D: *C. ovalifolia*; E: *C. glaberrima*; F: Detalhe do feixe vascular colateral de *C. glaberrima*. Legenda: ep: epiderme, fv: feixe vascular, med: medula, col: colênquima, esc: esclerênquima, fl: floema, xl: xilema, cv: câmbio vascular, pr: parênquima, tr: tricoma, pap: papila (Barra: A, B, E = 150 µm; C= 300 µm; D, F = 100µm).

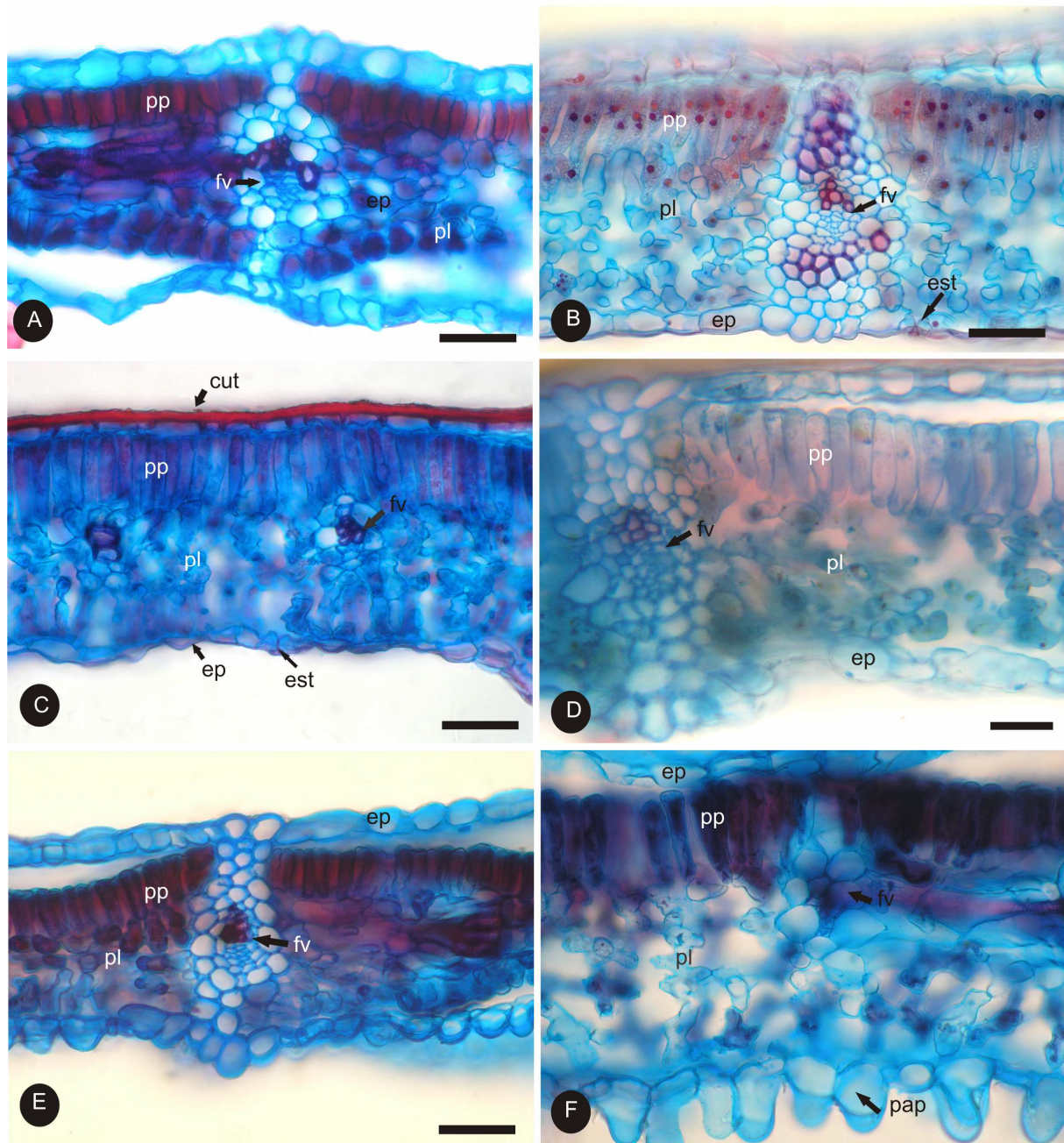


Figura 6 (A-F) **Secção transversal do mesofilo dorsiventral.** **A:** *C. pareira*; **(B):** *C. sympodialis*; **(C):** *C. ovalifolia*, evidenciando a cutícula espessada; **(D):** *C. andromorpha*; **(E):** *C. glaberrima*; **(F):** Detalhe das papilas na face abaxial em *C.glaberrima*. Legenda: ep: epiderme, fv: feixe vascular, pp: parênquima paliçadico, pl: parênquima lacunoso, pap: papila, est: estômato, cut: cutícula (Barra: A-E = 50 µm; F = 100X).

## ANEXOS

Normas

## ANEXO A

## Flora – Instructions to Authors

1. FLORA publishes regular articles and reviews, the latter solicited by the editors. Only contributions will be accepted which have not been published previously.

**Manuscripts should be submitted** in triplicate to the Editor-in-Chief: Prof. i.R. Dr. Rainer Lösch, Nebensteingasse 1, D-63739 Aschaffenburg, Germany, e-mail: loesch@uni-duesseldorf.de. In cases with difficult postage connections, manuscript submission may occur also in form of an e-mail attachment. An electronic file of the text (by preference in "Word" under "Windows") should be delivered after manuscript acceptance; it is not needed to add it earlier. Correspondence between authors and editor occurs by preference via e-mail.

2. **Copyright.** Once a paper is accepted, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance. If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

3. The manuscript will be **reviewed** by two referees, at least one of them being a Flora Editorial Board member. Decision about acceptance of a manuscript is based upon these reviews.

4. Manuscripts should be written in **English or German**; publication in English is recommended. Publication in French or Spanish is possible in exceptional cases by appointment of the editor-in-chief. Authors not using their mother tongue are strongly advised to have the text reviewed by a native speaker before submission. Manuscripts should be **submitted in final form** and prepared in accordance with the journal's accepted practice, form and content. Manuscripts should be checked carefully to exclude the need for corrections in proof. They should be typed doublespaced throughout, on one side of the paper only and with wide margins.

5. The first page (**title page**) should contain the full title of the paper, the full name(s) and surname(s) of the author(s), name of laboratory where the study was carried out, and the address (incl. e-mail) of the author(s).

6. Each manuscript must be preceded by an **English title** and an **English abstract** which presents briefly the major results and conclusions of the paper. In case of not-English-written papers this summary must be more extensive as normal and may be as long as maximally 1½ printed pages. Immediately following the abstract, up to six English **key words** should be supplied indicating the scope of the paper. **Legends of figures and tables** must be given also in **English** in the case of non-English papers.

7. Papers should be written as concise as possible; as a rule, the total length of an article must not exceed 10 printed pages; exceptions are possible only upon explicit consent of the editors.

The main portion of the paper should preferably be divided into four sections: **Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion**, followed by **Acknowledgements** (if necessary) and **References**. Each section and sub-section must bear a heading.

8. **Text marking:** Names of Authors should not be written in capitals. Scientific names up to the genus are to be written in italics or underlined with a wavy line (*Viola alba* subsp. *alba*); plant community names are not to be printed in italics (*Seslerietum*, but *Sesleria*-slope). The SI-System of units must be used wherever possible.

9. The beginning of a paragraph should be indented. The section "References", captions for illustrations and tables will be printed in small print (petit).

10. Each **table** should be typed on a separate sheet of paper resp. on a separate page of a file. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals, e.g. "Table 1, Table 2", etc., and attached to the end of the text. Tables should be supplied with headings, kept as simple as possible.

11. **Figures** (including photographic prints, line drawings and maps) should be numbered consecutively in Arabic numerals, e.g. "Fig. 1, Fig. 2", etc. and attached to the text after the tables. Legends for figures should be listed consecutively on a separate page. Plan all figures to suit a column width of 7.9 cm or a page width of 16.7 cm. Figures, in particular photographs, may be combined to a maximum plate size of 16.7 cm x 22.0 cm.

Submit illustration **files** separately from text files. Files for full color images must be in a CMYK color space. All illustration files should be in TIFF or EPS formats. Journal quality reproduction will require greyscale and color files at resolutions yielding approximately 300 dpi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions yielding 600-1200 dpi.

12. **Photographs** should be black-and-white, high-contrast, sharp glossy prints of the original negative and in a square or rectangular format.

**Free colour reproduction.** If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour figures can be printed only if the costs are covered by the author (€ 250.00 for first colour figure, € 200.00 for every following colour

figure). For further information on the preparation of electronic artwork, please see [www.elsevier.com/locate/authorartwork](http://www.elsevier.com/locate/authorartwork).

Magnification of microphotographs should be indicated by a scale bar. Inscriptions, marks, and scale bars should preferably be drawn neatly in black ink in an appropriate size on the face of the illustrations. When several pictures are used to produce a single plate, please ensure that they fit each other in size, are of equal contrast, and that they correspond to the caption in number and description.

13. **Line drawings** (incl. maps) should be large enough in all their details to permit a suitable reduction. Important points to note are thickness of lines, size of inscriptions, size of symbols, adequate spacing of shaded and dotted areas. Line drawings must be submitted as black drawings on white paper. If computerplotted they must have laser-print quality. If traditionally drawn the originals must be prepared with Indian ink according to the established methods of technical drawing.

14. Figures and tables should always be mentioned in the text in numerical order. The author should mark in the margin of the manuscript where figures and tables are to be inserted.

15. When quoting **references** in the text, the following format should be used: Meyer (1999) resp. (Meyer, 1999), Meyer and Smith (1995) resp. (Meyer and Smith, 1995) or Meyer et al. (1990) resp. (Meyer et al., 1990). Several papers by the same author(s) published in the same year should be differentiated in the text, and in the list of references, by a, b, c following the year of publication. "et al." should be used in the text in the case of more than two authors. Quotations of references from different authors within one pair of brackets must be separated by semicolons, commas are to be put between the years of publication of papers of the same author: (Meyer, 1992, 1999; Meyer and Smith, 1995; Jones et al., 1998a, b).

**References** should be listed alphabetically. Listings of several works by the same author should be grouped in chronological order. Then, papers of this author each with another one will follow according to the alphabetical order of the second author names, papers with three and more authors ("et al." in the text) will then be arranged again in the chronological order. The style to be used is shown in the following examples:

a. Papers published in periodicals:

Akhalkatsi, M., Wagner, J., 1996. Reproductive phenology and seed development of *Gentianaella caucasea* in different habitats in the Central Caucasus. *Flora* 191, 161-168.

Zotz, G., Patiño, S., Tyree, M.T., 1997. CO<sub>2</sub> gas exchange and the occurrence of CAM in tropical woody hemiepiphytes. *J. Exp. Biol.* 192, 143-150.

b. Books:

Takhtajan, A., 1959. Die Evolution der Angiospermen. G. Fischer, Jena.

c. Papers published in multi-author books:

Mathes, U., Feige, G.B., 1983. Ecophysiology of lichen symbiosis. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Physiological plant ecology. II. Responses to the chemical and biological environment*. Encyclopedia of plant physiology. New Series, vol. 12C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 423-467.

The titles of books and papers in periodicals should always be quoted completely and exactly. Titles of periodicals should be abbreviated according to the usual rules listed e.g. in the *World List of Scientific Periodicals* or in *Biological Abstracts*. The number of the volume should be given in Arabic numerals.

16. When papers are cited which were originally published in languages which use alphabets other than Latin (e.g. Russian Cyrillic etc.), then the author, title of the paper and the periodical name itself must be **transliterated** using standards like ISO 1 or ISO 2 (cf. *Taxon* 30: 168-183).

17. FLORA is produced directly in **page set**. Consequently the author only receives the final page proofs for checking and approval. *Extended corrections are not more possible at this stage.*

18. Publication of an article of normal size and without color photographs in FLORA is **free of charge** to the author(s). In exchange, the **Copyright** of the article is transferred to the publisher. However, the author(s) will be free to use single figures or tables of the article in subsequent own work. The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively 30 free paper offprints. The PDF file is watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional offprints may be ordered when proofs are returned. Authors who pay for printed colour figures will be sent another 50 free off-prints. Until publication of the print edition, corrected proofs will be available at online first ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

19. **Funding body agreements and policies.** Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

## ANEXO B

### *Pharmaceutical Biology*

### Instructions for Authors

#### About the Journal

Aims and Scope  
Editor-in-Chief

#### Manuscript Submission

#### Manuscript Preparation

File preparation and types  
Title Page  
Abstract  
Main Text  
Acknowledgments and Declaration of Interest sections  
References  
Tables  
Illustrations  
Notes on Style

#### Editorial Policies

Authorship  
Submission  
Peer Review  
Ethics and Consent  
Copyright and Permissions  
Declaration of Interest  
NIH and Public Access Policy

#### Additional Information

Proofs  
Reprints  
Color figure charges  
Contact the Publisher

#### **About the Journal**

##### Aims and Scope

**Pharmaceutical Biology** will publish manuscripts describing the discovery, methods for discovery, description, analysis characterization, and production/isolation (including sources and surveys) of biologically-active chemicals or other substances, drugs, pharmaceutical products, or preparations utilized in systems of traditional medicine.

Topics may generally encompass any facet of natural product research related to pharmaceutical biology. Papers dealing with agents or topics related to natural product drugs are also appropriate (e.g., semi-synthetic derivatives). Manuscripts will be published as reviews, perspectives, regular research articles, and short communications. The primary criteria for acceptance and publication are scientific rigor and potential to advance the field.

Editor-in-Chief

John M. Pezzuto, PhD

Professor and Dean, College of Pharmacy  
University of Hawaii  
Hilo, HI  
USA

## **Manuscript Submission**

All submissions should be made online at **Pharmaceutical Biology's [ScholarOne Manuscripts site](#)**. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact the ScholarOne helpline through the '[get help now](#)' link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text in the Acknowledgments section under a subheading "Declaration of interest", and, where available within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site).

Please see our full [Declaration of Interest Policy](#) for further information.

## **Manuscript Preparation**

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgments; declaration of interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

**Pharmaceutical Biology** publishes the following manuscript types:

- Original papers
- Reviews
- Perspectives
- Short communications
- Book reviews
- Notes

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. Three to ten key terms that are not in the

title should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

### Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 250 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

### Main Text

#### **Original articles**

The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

*Introduction:* This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.

*Methods:* This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. **Pharmaceutical Biology** requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers. In all studies of plants or animals, specific identification should be made as to the materials used, such as by citation of voucher specimen in herbarium or other collections, quoting name of collector, collection number (or date), place of collection, etc. Botanical nomenclature should be consistent with Index Kewensis, and include Latin binomial, authority, and family at first mention in the abstract and in the text. Authors are advised to consult the International Plant name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>) and W3Tropicos (<http://robot.org>) web based databases to determine the correct botanical name.

*Results:* Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Where biological testing is reported, the results should include IC<sub>50</sub> ED<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>, MIC, etc. as appropriate.

*Discussion:* This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

*Conclusions:* This must summarize the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalized to a broader study population.

#### **Reviews**

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed.

Wherever possible, use primary resources, avoiding "Data on File", "Poster" or other unpublished references.

### Acknowledgments and Declaration of Interest sections

Acknowledgments are different from declarations of interest. Acknowledgments detail special thanks, personal assistance, and dedications. Also, lines that declare "the opinions expressed in this article are the authors'..." would be included in this section. Contributions from individuals who do not qualify for [authorship](#) should also be acknowledged here.

Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see [Declaration of Interest section](#) below.

#### *Acknowledgments section*

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

#### *Declaration of Interest section*

All declarations of interest must be outlined under the subheading 'Declaration of interest'. If no declaration is declared, the following statement will be attached to all articles:

**Declaration of interest:** *The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.*

Please see our full [Declaration of Interest Policy](#) for further information.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

### References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date. Examples:

(Smith, 2001) – one author

(Smith & Jones, 2001) – two authors

(Smith et al., 2001) – more than three authors

(Smith & Jones, 2001a, b) – more than one paper in the same year by the same authors

(Smith & Jones, 2001; Smith et al., 2001; Smith, 2005) – listed by earliest year first for multiple citations

The list of references appears alphabetically by primary author's last name. Examples:

- *Journal:* Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. (2004). Chemical basis for the biological activity of Imexon and related Cyanaziridines. *J Med Chem*, 47, 218-23.
- *Book:* Vyas SP, Khar RK. (2001). *Targeted and Controlled Drug Delivery*. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.
- *Contribution to a Book:* Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. (1978). Methods to achieve controlled drug delivery: The biomedical engineering approach. In: Robinson JR, ed. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker, 557-93
- *Electronic Resources:* Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke SL, Lee K-H. (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online]. Available at:



<http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592>  
Accessed on 12 April 2009.

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

### Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

### Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in the text
- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

*For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#).*

*For information on color figures and charges please click [here](#).*

### Notes on Style

#### **General Style**

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise US English. Language and grammar should be consistent with *Fowler's English Usage*; spelling and meaning of words should conform to *Webster's Dictionary*. If English is not your native language please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.
2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized.
3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
4. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".
5. Double quotation marks rather than single are used unless the "quotation is 'within' another".
6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: "e.g."; "i.e."; "cf.". Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.

7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: "The 1980s [not the 1980's] saw ...". Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: "The APU's findings that ..." but note that the plural is "APUs".
9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. "The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ..." and subsequently, "The APU studies of achievement ...", in a reference "(Department of Education and Science [DES] 1989a)".
10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: "From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses".
11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, "African-American", "Hispanic" and "Native American" are used, e.g. "The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ..."; for the UK, "Afro-Caribbean" (not "West Indian"), etc.
12. Material to be emphasized by italicisation in the printed version should be italicized in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.
13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). "%" (not "per cent") should be used in typescripts.
14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgments section. The style of the title is shown by the following example:  
**"Appendix C: The random network generator"**.  
 Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as "the appendix" and not called "Appendix A".

#### **Abbreviations and nomenclature**

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the *CSE Style Manual* available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA.

#### **Mathematics**

Please click [here](#) for more information on the presentation of mathematical text.

#### **Footnotes**

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate [Acknowledgments section](#) at the end of the paper. Acknowledgments of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation also properly belong in an Acknowledgments section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: \* (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialize symbol sequence within tables.

## Editorial Policies

### Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Pharmaceutical Science adheres to the ICMJE guidelines (<http://www.icmje.org/#author>), which state that "authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published"<sup>1</sup>. All other contributors should be listed as acknowledgments.

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

### Submission

**Pharmaceutical Biology** considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to **Pharmaceutical Biology**, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Informa Pharmaceutical Science adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases, offending authors may be banned from submitting to Informa Pharmaceutical Science journals in the future, or reported to their institution's ethics committee.

### Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers' feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

### Ethics and Consent

- Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.
- Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).
- To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.
- All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).

---

<sup>1</sup> Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/>

- When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking [here](#)

#### Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgment is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorized. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking [here](#).

#### Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the [Conflict of Interest policy](#) recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding for research are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure.

If there are no declarations, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest", and, where available, within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site). This may be made available to reviewers and will appear in the published article at the discretion of the Editors or Publisher. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to [COPE guidance](#).

If no declaration is declared, the following statement will be attached to all articles:

**Declaration of interest:** *The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.*

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgements on conclusions drawn.

#### NIH/Wellcome Public and Open Access Policies

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Public and Open Access Policies, Informa Pharmaceutical Science acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research results may benefit future scientific and medical research. Because we value the current and future contributions our journals make to the scientific body of knowledge, we have made certain that our policies accommodate those authors who wish to submit to PubMed Central.

As part of our author services program, Informa Pharmaceutical Science will deposit to PubMed Central (PMC) and UK PubMed Central (UKPMC) author manuscripts reporting NIH or Wellcome Trust funded research.

This service will help authors to comply with the NIH and Wellcome Trust revised 'Public Access Policy' and 'Open Access Policy', respectively.

#### **NIH policy**

NIH-funded authors must submit to PMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Click [here](#) for more information.

#### **Wellcome Trust policy**

Wellcome-funded authors must submit to UKPMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on UKPMC no later than 6 months after final publication.

Click [here](#) for more information.

Informa Pharmaceutical Science will deliver to PMC/UKPMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review. We will also authorize the author manuscript's public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in print or electronic form (whichever is the sooner). Following the deposit, authors will receive further communications from the NIH Manuscript Submission System/UK Manuscript Submission System with respect to the submission.

Under our Author Rights policy, authors also have the right to post their version of the submitted author manuscript (pre-print), or their version of the final published article (post-print) on their personal or institutional web site. Post-print web postings are subject to an embargo of 12 months. Please note that authors should not post manuscripts directly to PMC/UKPMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (e.g., to a listserv or database connected to a public access server).

## **Additional Information**

### Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

### Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

*Further information on Reprints can be found by clicking [here](#).*

### Color figure charges

Any figure submitted as a color original will appear in color in the Journal's online edition free of charge. Print copy color reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with color is US \$1000/£500, each subsequent page is charged at US \$500/£250. There are no charges for non-color pages.

### Contact the publisher

*Click [here](#) for contact details for the Publisher.*

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)