

NIARA MOURA PORTO

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

RECIFE

2009

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-orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Agra

RECIFE

2009

Porto, Niara Moura

Caracterização Anatômica e Química de Espécies de *Cissampelos* L. (Menispermaceae) Utilizadas como Medicinais no Nordeste do Brasil / Niara Moura Porto. – Recife: O Autor, 2009.

115 folhas, il., fig., tab.

Orientador: Antonio Fernando M. de Oliveira

Co-orientador: Maria de Fátima Agra

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Plantas medicinais 2. Plantas-anatomia 3. Brasil, Nordeste
I. Título.**

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-150

NIARA MOURA PORTO

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

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Antonio Fernando Moraes de Oliveira (Orientador) – UFPE



Dra. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna – USP-SP



Dra. Laíse de Holanda Cavalcanti Andrade - UFPE

Recife- PE
2009

Santa e Zeca Porto (in memoriam)

Antonia (in memoriam) e Sebastião Moura (in memoriam)

Aos meus avós

DEDICO

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 coisas. 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 Moraes 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. Maria de 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 warifteina utilizado nas análises de CLAE; a Dra. Regina Bressan, do Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas (Aggeu Magalhães), pela disponibilidade e auxílio na confecção do material botânico utilizado no 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: Msc. 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, pela 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.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Utilização de plantas medicinais no Nordeste do Brasil.....	13
2.2 Família Menispermaceae Juss.....	13
2.2.1 Gênero <i>Cissampelos</i> L.....	15
2.2.2 Caracterização das espécies de <i>Cissampelos</i>	18
2.3 Anatomia Vegetal e Quimiotaxonomia: ferramentas utilizadas na validação de drogas e na taxonomia.....	21
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 1. Anatomia comparativa de espécies de <i>Cissampelos</i> L. (Menispermaceae) ocorrentes no Nordeste do Brasil.....	30
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO 2. Caracterização Histoquímica e Cromatográfica de três espécies de <i>Cissampelos</i> (Menispermaceae) utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil.....	79
RESUMO.....	79
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODOS.....	82

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	88
CONCLUSÕES.....	98
RESUMO	99
ABSTRACT	100
ANEXOS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos morfológicos das espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	20
Figura 2	Tipos de alcaloides isoquinolínicos isolados de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	23
Figura 3	Epiderme adaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.....	52
Figura 4	Epiderme abaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.....	53
Figura 5	Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.....	54
Figura 6	Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.....	56
Figura 7	Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme abaxial da lâmina foliar de <i>Cissampelos</i> L.....	58
Figura 8	Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de <i>Cissampelos</i> L.....	60
Figura 9	Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de <i>Cissampelos</i> L.....	62
Figura 10	Secção transversal do mesofilo dorsiventral de <i>Cissampelos</i> L.....	63
Figura 11	Secção transversal do bordo de <i>Cissampelos</i> L.....	64
Figura 12	Secção transversal da nervura mediana de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	65
Figura 13	Secção transversal da nervura basal de <i>Cissampelos</i> L.....	67
Figura 14	Secção transversal do pecíolo mediano de <i>Cissampelos</i> L.....	69
Figura 15	Secção transversal do pecíolo basal de <i>Cissampelos</i> L.....	71
Figura 16	Secção transversal de caule de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	73
Figura 17	Secção transversal de caule de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	75
Figura 18	Secção transversal de caule de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	77
Figura 19	Alcaloide warifteina.....	92
Figura 20	Anatomia e histoquímica de <i>Cissampelos</i>	93
Figura 21	Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de <i>Cissampelos</i>	95
Figura 22	Cromatograma (CLAE) do padrão warifteina.....	96
Figura 23	Gráfico da linearidade da warifteina.....	96
Figura 24	Cromatogramas (CLAE) das espécies de <i>Cissampelos</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações etnomedicinais das espécies de <i>Cissampelos</i> L. utilizadas como medicinais no Nordeste do Brasil.....	17
Tabela 2	Procedência e número do voucher das espécies de <i>Cissampelos</i> analisadas.....	49
Tabela 3	Características micromorfológicas e anatômicas observadas nas folhas e caule de espécies de <i>Cissampelos</i> L.....	50
Tabela 4	Procedência e número do voucher das espécies de <i>Cissampelos</i> analisadas.....	91

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma grande diversidade de plantas com potencial medicinal ainda não pesquisado, 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 da potencialidade de sua flora, apesar de ser um dos mais ricos em biodiversidade.

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, produtos de origem vegetal com eficácia comprovada, têm sido muito investigados pela indústria farmacêutica. Vimbastina, 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 bisbenzilisquinolínicos (Barbosa-Filho *et al.*, 2000). Compreende 71 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por 20 espécies distribuídas no Norte e Sul das Américas, na África e Ásia. No Brasil são encontradas oito espécies, das quais cinco ocorrem principalmente na região Nordeste (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.*, 2007c).

Considerando a anatomia como um parâmetro taxonômico importante para o controle de qualidade de plantas medicinais, bem como para a localização de sítios de secreção e/ou acúmulo e a 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 anatômicas e químicas foram utilizadas como ferramentas na busca por caracteres marcadores, fornecendo subsídios à caracterização e distinção dessas espécies.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

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 acaba se perdendo mais rapidamente (Agra *et al.*, 2007c).

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 para 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 *et al.*, 2007). Os representantes desta família apresentam uma grande diversidade de hábitos, sendo constituída em sua maioria, por trepadeiras – mas também

abrange ervas, arbustos, subarbustos e raramente árvores (Carlquist, 1996). Essa é uma família essencialmente pantropical com apenas três espécies registradas para a região temperada da América do Norte (Ott, 1997). No Brasil, está representada por 12 gêneros e 106 espécies (Barroso *et al.*, 2002), sendo a Amazônia o maior centro de diversidade genética (Krukoff & Barneby, 1970).

Morfológicamente, as Menispermaceae caracterizam-se por apresentarem 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).

O tratamento sistemático mais abrangente para Menispermaceae foi realizado por Diels (1910), que reconheceu oito tribos baseado 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 (1970) 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).

A subdivisão da tribo Menispermaceae em três subtribos foi baseada em caracteres fenotípicos como número de carpelos e simetria do perianto das flores femininas: Menisperminae (2-6 carpelos), Cissampelinae (1 carpelo, perianto assimétrico) e Stephaniinae (1 carpelo, perianto simétricos) (Diels, 1910). 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 alcaloídicos (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 (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* DC., *Dioscoreophyllum* Engl., *Jateorhiza* Miers, *Sphenocentrum* Pierre, *Stephania* Lour, *Tiliacora* Colebr., *Tinospora* Miers e *Triclisia* Benth. (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 20 espécies distribuídas no Norte e Sul das Américas, na África e na Ásia. No Brasil são encontradas dez 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, côndilo 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, consideraram os gêneros *Stephania* e *Cissampelos* como parafiléticos e sugerem um possível agrupamento do gênero *Cyclea* ao 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), warifteina (Cortes *et al.*, 1995), metilwarifteina, laurifolina (Barbosa-Filho *et al.*, 1997), liriodenina e roraimina (Lira *et al.*, 2002) e aporfínicos: cissaglaberrimina, oxobuxifolina, magnoflorina e trilobinina (Barbosa-Filho *et al.*, 1997).

Os alcaloides de *Cissampelos* são citados por diversos autores como sendo os responsáveis por determinadas propriedades medicinais encontradas nestas espécies. Os extratos de *C. pareira* possuem ação anti-inflamatória (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* apresenta ação espasmolítica (Freitas *et al.*, 1996), antianafilática (Thomas *et al.*, 1997), antidepressiva (Almeida *et al.*, 1998), anti-inflamatória (Lima *et al.*, 2001; Alexandre-Moreira *et al.*, 2003) 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.

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

2.2.2 Caracterização das espécies de *Cissampelos* L.

As espécies de *Cissampelos* são, em geral, trepadeiras herbáceas, com uma única espécie arbustiva, *Cissampelos ovalifolia* DC. Possuem folhas alternas com nervação 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 sinandro. As flores femininas são constituídas por 1 sépala, 1 pétala e 1 carpelo com estigma trifido. O fruto é uma drupa, oboval (Rhodes, 1975) (Figura 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 inflorescência masculina e feminina fasciculadas, suas flores masculinas possuem corola pateliforme e sinândrio séssil. É uma espécie com ampla distribuição nos trópicos e subtrópicos da América, Ásia e África, com numerosos sinônimos (Ortiz, 2001).

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

Apresenta caule ereto, 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).

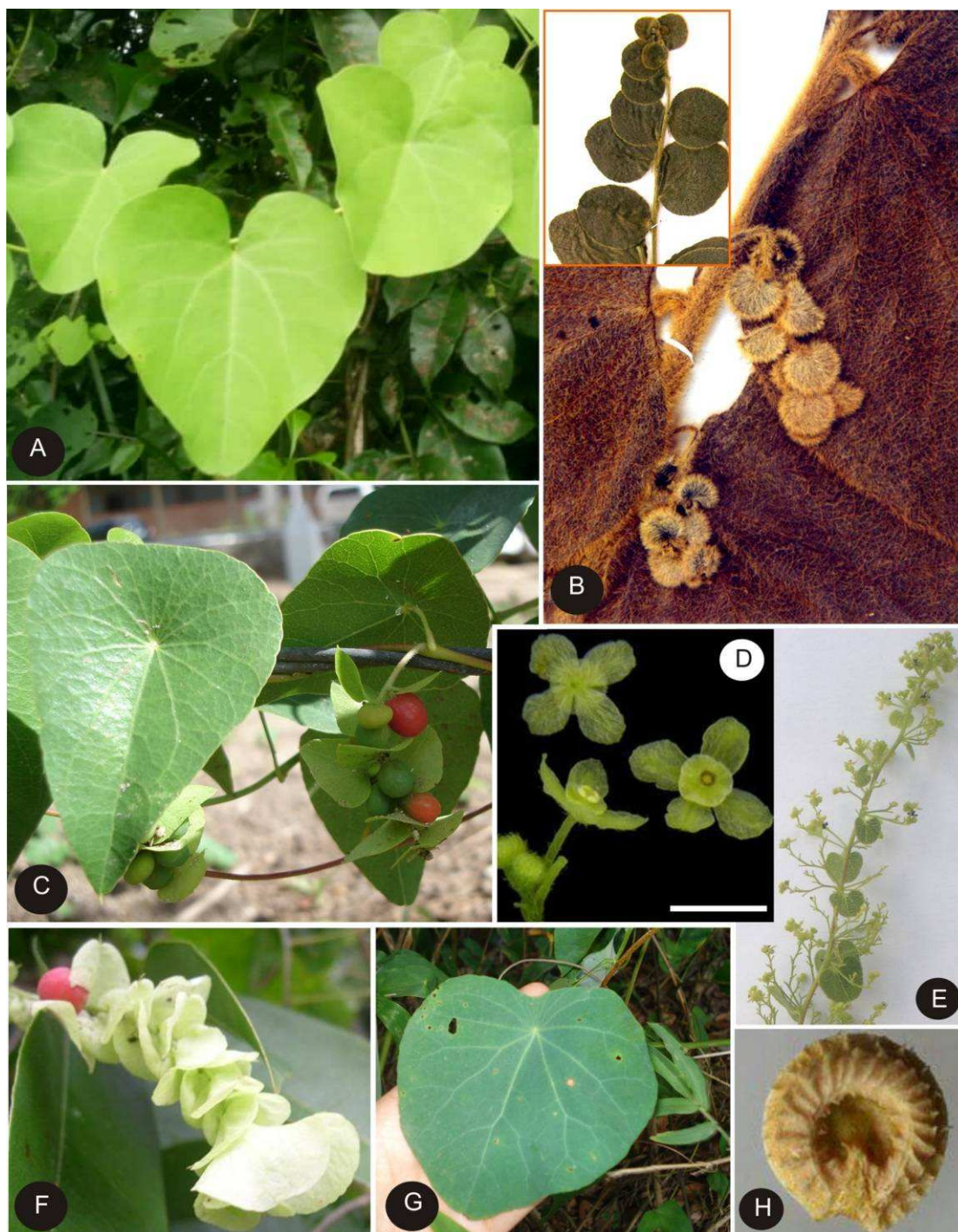


Figura 1 (A-H). Aspectos morfológicos das espécies de *Cissampelos* L. **(A):** *C. andromorpha* (MF Agra, NM Porto, AFM Oliveira 7.132), pecíolo inserido na base da lâmina foliar; **(B):** *C. ovalifolia* (JC Moraes 2.082), detalhe da inflorescência feminina; **(C):** *C. sympodialis* (MF Agra, NM Porto 7.000), folhas com pecíolo peltado excêntrico e fruto tipo drupa oboval; **(D):** *Cissampelos* sp. Flores masculinas com 4 sépalos e 1 pétala conada, barra = 2 mm (fonte: http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm); **(E):** *C. sympodialis* (MF Agra, NM Porto 7.000), inflorescência masculina; **(F):** *C. glaberrima* (MF Agra, NM Porto 7.127), detalhe da inflorescência feminina e fruto; **(G):** *C. glaberrima* (MF Agra, NM Porto 7.131), folha oval a orbicular, com ápice mucronulado e pecíolo peltado; **(H):** *Cissampelos* sp. Endocarpo hipocrepiforme (fonte: http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_images_c.htm).

2.3 Anatomia Vegetal e Quimiotaxonomia: ferramentas utilizadas na validação de drogas e na taxonomia

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). 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 & Andrade, 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 (Menega, 1982; Carlquist, 2007; Jacques & De Franceschi, 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 é comum, podendo ocorrer solitários ou agrupados, em forma de ráfides, estilóides ou areia cristalina (Menega, 1982). 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.* (2001b) que descreveram os caracteres epidérmicos foliares de 29 gêneros de Menispermaceae, De Wet *et al.* (2002) que descreveram caracteres

morfológicos e anatômicos para espécies de *Cissampelos* ocorrentes na África do Sul, Jacques & De Franceschi (2007) que analisaram a ocorrência de variações cambiais em raízes de Menispermaceae e Porto *et al.* (2008) que realizaram uma caracterização anatômica foliar de *C. sympodialis*.

A grande semelhança morfológica entre as espécies de *Cissampelos*, como destacado por Barbosa-Filho *et al.* (1997) 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 (Figura 2).

Os alcaloides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (Cordell, 1981). 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, 1998).

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 & Hanazaki, 2006). Em *Cissampelos* os alcaloides possuem núcleo isoquinolínico e todas as bases descritas na literatura pertencem a sete tipos de esqueleto diferentes: benzilisoquinolínico (BIQ), bisbenzilisoquinolínico (BIS-BIQ), aporfínico (APORFIN), morfinândienônico (MORF), tetrahidroprotoberberínico (PROTOB), tropolisoquinolínico (TROPOL) e azafluorantênico (AZAFLU) (Barbosa-Filho *et al.*, 2000).

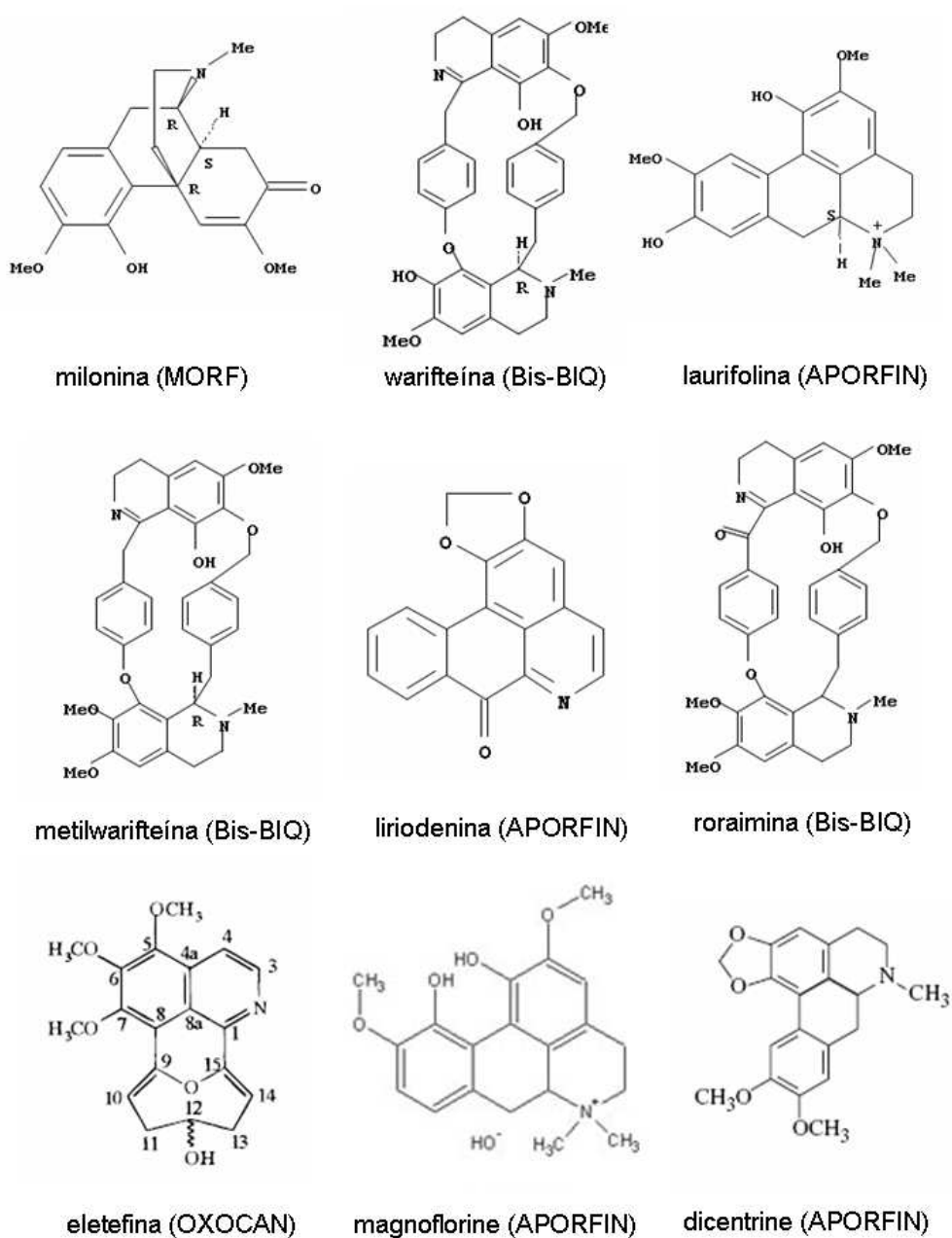


Figura 2. Tipos de alcaloides isoquinolínicos isolados de espécies de *Cissampelos* L.

Referências

- Agra, M.F., Baracho, G.S., Nurit, K., Basílio, I.J.L.D. & Coelho, V.P.M. 2007a. 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. 2007b. Sinopse da flora medicinal do Cariri Paraibano. *Oecologia Brasiliensis* 11: 323-330.
- Agra, M.F., Freitas, P.F. & Barbosa-Filho J.M. 2007c. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 114-140.
- 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., Moraes, L.C.S.L., Rêgo T.J.A.S. & Barros, R.F.M. 2005. Plantas medicinais 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., 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, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., Melo, J.G. & Santos, J.P. 2007a. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 325-354.
- Albuquerque, A.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A. & Amorim, E.L.C. 2007b. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 76-91.
- 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. 1997. 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. pp 54: 1-190. In: Cordell G.A. (ed.). The alkaloids. 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. pp 56-58. 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. 1996. Wood and stem anatomy of Menispermaceae. Aliso 14: 155-170.
- Carlquist, S. 2007. Successive cambia revisited: ontogeny, histology, diversity, and functional significance. Journal of the 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. pp 1055. Nova York, John Wiley.
- Cornélio, M.L.; Barbosa-Filho, J.M., Côrtes, 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. pp 94: 1-135. In: A. Engler (Ed.), *Das Pflanzenreich* IV. Leipzig, Germany, Wilhelm Engelmann.
- Duke, J.A. 2007. Phytochemical and Ethnobotanical Database, USDA-ARSNRGL, 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. (Ed). *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 Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 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*. pp 320. 3ª ed. London, Chapman & Hall.

- Hong, Y., Pan, K., Chen, Z. & Lu, A. 2001a. Phylogeny of the tribe Menispermaceae (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., Gallut, C., Vignes-Lebbe, R., Zaragueta, I. & Bagils, R. 2007. Resolving phylogenetic reconstruction in Menispermaceae (Ranunculales) using fossils and a novel statistical test. *Taxon* 56: 379-392.
- Jacques, F.M.B. & De Franceschi, D. 2007. Menispermaceae wood anatomy and cambial variants. *IAWA Journal* 28: 139-172.
- 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. 2008. 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. pp 402-418. In: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich. The families and genera of vascular plants – dicotyledons 2. Berlin, Germany, Springer-Verlag.
- 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. 1970. 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. pp 1-81. In: Flora Republicae Popularis Sinicae. Beijing, Science Press.
- Mabberley, D.J. 1997. The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants, 2ª ed. pp 858. Cambridge, Cambridge University Press.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C. & Veiga J.R., 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.
- Mennega, A.M.W. 1982. Stem structure of the New World Menispermaceae. Journal of the Arnold Arboretum 63: 145-171.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1957. Anatomy of the dicotyledons. vol. 1. pp 1500. Oxford, UK, Clarendon Press.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons, 2ª ed. v.1. pp 52-62. Oxford, 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.
- NAPRALERT - Natural Products Alert. Disponível em: <<http://www.napralert.org/>>. Acesso em 12 de março de 2008.
- Neuwinger, H.D. 2000. African Traditional Medicine: a Dictionary of Plant Use and Applications. pp 589. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers.
- 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. pp 85: 1432-1442. 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.
- 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.
- Ott, C. 1997. Menispermaceae. Flora of Ecuador 58: 1-81.
- 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.
- Rates, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- 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.
- 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.
- Rosario, S.L., Da-Silva, A.J. & 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* (Menispermaceae) in guinea-pig. *Phytomedicine* 4: 233-238.
- Troupin, G. 1956. Menispermaceae. pp 1-32. In: *Flora of Tropical East Africa*. London, Secretary of State for the Colonies.
- Veiga-Junior, V.F., Pinto, A.C. & Maciel, M.A.M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28: 519-528.
- Wang, W., Wang, H.C. & Chen, Z.D. 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.
- WHO - World Health Organization. 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. vol.1. pp 288. Geneva, WHO Library Cataloguing in Publication Data.
- Wu, C.Y., Lu, A.M., Tang, Y.C., Chen, Z.D. & Li, D.Z. 2003. Pp 371-378. *The Family and Genera of Angiosperms in China: A Comprehensive Analysis*. Beijing, Science Press.

Capítulo

1

ANATOMIA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE *Cissampelos* L. (MENISPERMACEAE) OCORRENTES NO NORDESTE DO BRASIL



© Porto

Artigo a ser submetido ao periódico “*Microscopy Research and Technique*”

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

Niara Moura Porto^{1*}, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo², Antonio Fernando
Morais Oliveira³, Maria de Fátima Agra⁴

1. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil. *e-mail: niaraporto@yahoo.com.br
2. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas, Caixa-Postal: 7472, 50.670-420, 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, 58.051-970, Paraíba, PB, Brasil.

Resumo

O gênero *Cissampelos* L. possui 20 espécies com distribuição tropical e semelhanças morfológicas entre as espécies, tornando difícil suas identificações. Este trabalho apresenta um estudo anatômico comparativo de folhas e caules de *Cissampelos sympodialis*, *Cissampelos ovalifolia*, *Cissampelos glaberrima*, *Cissampelos andromorpha*, *Cissampelos pareira* encontradas no Nordeste brasileiro, realizado com o apoio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. A análise do caule entre os dois hábitos (trepador X arbustivo) mostrou que ambos possuem o mesmo padrão anatômico, porém, destaca-se que os diâmetros de elementos de vasos são menores no arbusto, como observado em *C. ovalifolia*. 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.

Palavras-chave: Anatomia, *Cissampelos*, Plantas Medicinais, Nordeste do Brasil.

Introdução

Menispermaceae Juss. é uma família cosmopolita composta em sua grande maioria por plantas dióicas, trepadeiras, herbáceas a arbustivas e lianas, raramente árvores (Ortiz et al., 2007), composta por cerca de 70 gêneros e 520 espécies (Jacques & Bertolino, 2008). A família ficou reconhecida, principalmente, pelo uso de suas espécies na preparação do “curare” (Krukoff & Barneby, 1970).

Diels (1910) reconheceu oito tribos e a tribo Menispermeae foi dividida em três subtribos. Dados de ITS e cpDNA apóiam o monofiletismo das subtribos 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* L. e *Stephania* Lour. como parafiléticos e sugeriram a necessidade de uma subdivisão infragenérica futura.

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

O gênero *Cissampelos* compreende 20 espécies com distribuição tropical. No Brasil são encontradas dez 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 Menispermaceae (Ortiz et al., 2007; Wang et al., 2007; Hoot et al., 2009) têm indicado *Cissampelos* e *Cyclea* Arn. ex Wight como um clado fortemente monofilético. As espécies de ambos os gêneros são morfologicamente muito similares, diferindo principalmente pela ausência de brácteas foliáceas e a presença de pétalas soldadas em *Cyclea* (Kessler, 1993).

Estudos centrados em espécies de *Cissampelos* são ainda escassos e dizem respeito às áreas de fitoquímica e farmacologia e 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; Jacques & De Franceschi (2007), que analisaram a ocorrência de variações cambiais em raízes de Menispermaceae e 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 *Cissampelos sympodialis*, *Cissampelos glaberrima* A.St.-Hil., *Cissampelos ovalifolia* DC., *Cissampelos pareira* L. e *Cissampelos andromorpha* DC.

Material e Métodos

Coleta de dados - Foram estudadas 12 populações de cinco espécies de *Cissampelos*, sendo três populações de *C. sympodialis*, três de *C. glaberrima*, duas de *C. ovalifolia*, duas de *C. pareira*, duas de *C. andromorpha*. Foram avaliadas amostras de

espécimes secos disponíveis na coleção de referência do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) e do herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), ambos da Universidade Federal da Paraíba. 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 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 (Krukoff & Barneby, 1970; Rhodes, 1962, 1975; Ortiz, 2001) e o apoio de estereomicroscópio binocular, Zeiss. As abreviaturas dos autores dos táxons estão de acordo com Brummitt & Powell (1992). A tabela 2 sumariza todas as espécies analisadas e seus respectivos dados de coleta no período de fevereiro de 2008 a março de 2009.

Análise Anatômica

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). Para observação da epiderme em vista frontal, fragmentos foliares foram fervidos em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético (1:1) (Franklin,

1945) até a dissociação. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada, corado com safranina 50% (Kraus & Arduin, 1997) e montado em lâminas em glicerina 50%.

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.

Os padrões da vascularização foliar foram determinados a partir de lâminas foliares diafanizadas, de acordo com Strittmater (Johansen, 1940), 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 semipermanentes. Para a descrição e classificação dos padrões de nervação utilizaram-se os tipos básicos definidos por Hickey (1979).

Para o estudo da ultra-estrutura da superfície foliar foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) modelo JEOL JSM – 5600. Fragmentos foliares foram fixados por 24 h em glutaraldeído 4% (G.A) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (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 posterior captura de imagem. Para micromorfologia das ceras epicuticulares, fragmentos foliares do terço mediano foram retirados, aderidos a suporte metálico e submetidos à metalização em equipamento para

recobrimento do material com ouro e examinados ao MEV. A classificação dos cristais foram determinados de acordo Barthlott et al. (1998).

Resultados

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

O contorno das paredes anticlinais das células epidérmicas apresentou-se ondeado a sinuoso em ambas as faces na maioria das espécies (Figs. 3A-D; 4A-D). Com exceção de *C. pareira*, que apresentou epiderme com paredes anticlinais poligonais a reta na face adaxial (Fig. 3E) e irregularmente reta a sinuosa na face abaxial (Fig. 4E). A epiderme possui paredes periclinais irregulares e convexas, revestidas por uma cutícula lisa e delgada, em ambas as faces em *C. sympodialis*, *C. andromorpha* e *C. pareira*, enquanto que em *C. glaberrima* e *C. ovalifolia* 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. 4A). 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. 4C, 6B). A análise em MEV confirmou a ausência de tricomas em ambas as faces da lâmina foliar de *C. sympodialis* (Figs. 5A, 6C). Nas demais espécies os tricomas unisseriados estão distribuídos sobre a superfície foliar ou restrito as nervuras principais. Em *C. pareira* (Figs. 5F, 6F), *C. glaberrima* (Figs. 5B, 6A) e *C. andromorpha* apresentam indumento pubérulo a piloso (Figs. 5C, 6D) enquanto que *C. ovalifolia* é tomentoso (Figs. 5E, 6E).

A microscopia eletrônica de varredura revelou uma variação da micromorfologia das ceras epicuticulares nas 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 (Figs. 7A-B). *C. ovalifolia* apresentou cristais depositados nos tricomas (Fig. 7C) e em *C. andromorpha* quase não se observou depósitos de cera (Fig. 7D). Quanto aos arranjos ultra-estruturais, a cera de *C. ovalifolia* e *C. sympodialis* (Fig. 7B) apresentou-se em grânulos e com camadas fissuradas, enquanto que em *C. pareira* (Fig. 7F), *C. andromorpha* (Fig. 7D) e *C. glaberrima* (Fig. 7E) a cera apresenta-se em forma de túbulos. Na superfície abaxial variações foram observadas quanto à morfologia de ceras epicuticulares. Em *C. glaberrima* os cristais de cera formam túbulos e grânulos (Fig. 7E) e em *C. pareira* aparecem túbulos aglomerados e isolados (Figs. 7F-H).

O padrão de nervação foliar caracterizou-se como actinódromo-broquidódromo para todas as espécies, com as nervuras secundárias formando uma série de arcos próximos ao bordo da lâmina (Figs. 8A-C, 9D-E). 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 nervuras intersecundárias, contudo em *C. sympodialis* e *C. glaberrima* elas aparecem delgadas. As nervuras terciárias são do tipo percurrente alternada, enquanto que as nervuras quaternárias apresentam-se em dois tipos: reticulada regular poligonal em *C. glaberrima* (Fig. 8A), *C. sympodialis* (Fig. 8C) e *C. ovalifolia* (Fig. 9D); percurrente alternada para as demais espécies, como observado em *C. pareira* (Fig. 8B). As nervuras terciárias e de ordem superior determinam aréolas imperfeitas, de formato irregular, podendo apresentar terminações simples, lineares e curvas com 2-3 ramificações para todas as espécies, como

visualizado em *C. ovalifolia* (Fig. 8D). A venação marginal é fimbriada (Fig. 8A, C; 9D, E), como visualizado em *C. glaberrima*.

O mesofilo em secção transversal é dorsiventral (Figs. 10A-F), com epiderme unisseriada em ambas as faces, entretanto, em *C. ovalifolia* é ocasionalmente biestratificada na face abaxial. Os feixes vasculares colaterais são de pequeno porte, distribuídos ao longo de sua extensão, envolvidos por uma endoderme (Figs. 10A, D, E). Em *C. sympodialis* (Fig. 10B) e *C. ovalifolia* (Fig. 10C) a endoderme é formada por células esclerificadas.

O bordo foliar, em corte transversal, apresenta a forma circular em *C. glaberrima* (Fig. 11A), revoluta em *C. pareira* (Fig. 11B) e *C. ovalifolia* (Fig. 11C) e rotunda em *C. sympodialis* (Fig. 11D) e *C. andromorpha*.

A nervura mediana, no plano transversal, pode ser convexa nas duas faces em *C. glaberrima* (Fig. 12A); acuminada na face adaxial e convexa na abaxial em *C. pareira* (Fig. 12C) ou exibir contorno levemente acuminado a plano na face adaxial e convexo na face abaxial, como observado para *C. andromorpha* (Fig. 12D). 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 (Figs. 13A-E). 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 (Fig. 13F). 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 delgada na maioria das espécies, contudo apresenta-se espessa em *C. ovalifolia* (Fig. 14A) e *C. glaberrima* (Fig. 14E). O córtex é formado por colênquima do tipo lacunar, subjacente à epiderme por parênquima interno, semelhante ao apresentado por *C. sympodialis* (Fig. 15B). Um anel esclerenquimático

circunda os cordões vasculares na porção mediana (Figs. 14A-E), não evidenciado nas porções apical e basal (Figs. 15A, C-F). 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 cordões vasculares estão separados por células parenquimáticas, com floema primário seguido do câmbio vascular e do xilema com elementos de vasos dispostos radialmente (Fig. 14F).

O caule possui contorno cilíndrico apresenta-se em estágio inicial de crescimento secundário (Figs. 16A-E). Está constituído por epiderme uniestratificada, clorofilada e recoberta por cutícula espessada em *C. ovalifolia*, *C. pareira*, *C. glaberrima* e *C. andromorpha*; em *C. sympodialis* constitui-se delgada. Em *C. ovalifolia* ocorre tricomas simples, unisseriados (Fig. 16B), enquanto nas demais espécies os tricomas apresentam-se raros e esparsos. O colênquima adjacente à epiderme é do tipo lacunar, 2-3 estratificado como em *C. sympodialis* (Fig. 16A) e em *C. ovalifolia* é uniestratificado ou ausente (Fig. 16B). O parênquima está situado abaixo de uma faixa colenquimática, delimitando o cilindro vascular.

O sistema vascular é organizado em cordões vasculares colaterais (Fig. 17A), tipicamente eustelico, formado por 9-13 feixes colaterais, circundados por uma bainha esclerenquimática contínua, em *C. ovalifolia* observa-se o espessamento desta bainha. O periciclo plurisseriado apresenta-se em fase de diferenciação (Fig. 17B). Após a diferenciação, é caracterizado externamente por camadas de fibras e internamente por células parenquimatosas em torno do tecido floemático. Observa-se a diferenciação do protofloema e protoxilema (Fig. 17C). 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, como observado em *C. andromorpha* (Fig. 17E). O floema está representado

por elementos do tubo crivado, células companheiras e parênquima floemático (Fig. 17F), podendo ocorrer idioblastos cristalíferos.

Nos cordões vasculares observa-se o início de atividade cambial. É possível perceber a instalação do crescimento secundário por meio da formação, ainda em diferenciação, do xilema secundário e fibras do protoxilema, como observado em *C. sympodialis* (Fig. 18A). 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. Com o desenvolvimento em progresso, ocorre a diferenciação das camadas mais externas do periciclo pela deposição de parede secundária e lignificação, isto é, ocorre a diferenciação das fibras pericíclicas (Fig. 18B). São observadas as células axiais do xilema e floema produzidas pelo câmbio de origem procambial e as células radiais floemáticas e xilemáticas, produzidas pelo câmbio de origem pericíclica. Dessa maneira, forma-se uma configuração em que os elementos axiais ficam separados entre si por raios largos (Figs. 18C-D).

A medula consiste de células parenquimáticas isodiamétricas na porção central e células parenquimáticas alongadas delimitando lateralmente os feixes vasculares. Ocorre a presença de amido (Fig. 18F); em *C. ovalifolia*, *C. glaberrima* e *C. andromorpha* a medula possui células esclerificadas, enquanto as demais espécies tais células são parenquimatosas. Foram observados idioblastos com cristais prismáticos na região cortical e próximos aos feixes vasculares (Fig. 18E).

Discussão

As espécies de *Cissampelos* estudadas apresentaram padrões de desenvolvimento anatômicos muito similares em ambas às partes analisadas (folha e caule).

Segundo Barthlott et al. (1998), cera epicuticular formando cristais como placas ou plaquetas encontra-se amplamente distribuídas 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 a superfície foliar.

A anatomia foliar das espécies de *Cissampelos* aqui tratadas, com relação ao mesófilo (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, descreveram similaridades anatômicas para cerca de 50 espécies, representantes das tribos Anomospermeae, 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 Menispermeae, como *Hypserpa*, *Menispermim*, *Diploclisia*, *Stephania*, *Cocculus* e *Cyclea*, este considerado como o gênero filogenicamente mais relacionado com *Cissampelos*.

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 arbustivo, mostrou 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 & Fisher, 1991).

A formação de câmbios sucessivos é relatada para alguns gêneros (*Disciphania*, *Abuta*, *Anomospermum*, *Chondodendron*, *Menispermum*) de Menispermaceae (Metcalf & Chalk, 1979; Carlquist, 2007). 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. Solereder (1908) fornece uma lista com espécies sem câmbios sucessivos: *Anamirta*, *Cissampelos*, *Cocculus*, *Coscinium*, *Fateorhiza*, *Menispermum*, e *Tinospora*. Estudos realizados por De Wet et al. (2002), demonstram o mesmo padrão anatômico em outras espécies de *Cissampelos*, corroborando com os dados expostos.

Uma das características anatômicas típicas de algumas trepadeiras é a presença de raios largos (Carlquist, 1975, 1991; Fahn et al., 1990). O armazenamento e o transporte de substâncias são funções dos raios consideradas como uma das mais importantes (Van Bel, 1990; Lev-Yadun & Aloni, 1995). Neste trabalho, observamos a ocorrência de largos raios formados pelo câmbio de origem pericíclica em todas as espécies, independentemente do hábito.

Nas plantas herbáceas, as derivadas do câmbio interfascicular são tipicamente parenquimáticas, embora frequentemente lignificadas (Philipson et al., 1971). Este padrão anatômico foi o mesmo encontrado nas espécies de *Cissampelos* estudadas, independentemente do hábito. 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 (Ewers & Fisher, 1989; Putz & Holbrook, 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 actinódroma-

broquidodroma e o caule de *C. ovalifolia* repete o padrão anatômico das trepadeiras herbáceas. Contudo, 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 morfologia das 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 a M. F. Agra (PQ); à Dulce G. Oliveira (LTF) pelo apoio técnico; Rafael Padilha, pelo apoio técnico à microscopia eletrônica de varredura.

Referências

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz J Pharmacogn* 17: 114-140.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz J Pharmacogn* 18: 472-508.
- 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.
- Bass P, Schweingruber FH. 1987. Ecological trends in the wood anatomy of trees, shrubs and climbers from Europe. *IAWA Bull* 8: 245-274.
- Brummitt RK, Powell CE. 1992. *Authors of Plant Names*. Kew: Royal Botanical Gardens, pp 732.

- Carlquist S. 1975. Ecological strategies of xylem evolution. California, Berkeley: University of California Press.
- 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: The biology of vines. Putz FE & Mooney HA, editors. Cambridge University Press, Cambridge, pp 53–71.
- Carlquist S. 2007. Successive cambia revisited: ontogeny, histology, diversity, and functional significance. *J Tor Bot Soc* 134: 301–332.
- 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.
- Diels L. 1910. Menispermaceae. In: Engler A, editor. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany *Das Pflanzenreich*, 4: 94.
- Duke JA. 2007. Phytochemical and Ethnobotanical Database, USDA-ARSNGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. February 2009. Disponível: <<http://www.ars-grin.gov/duke/>>. Acesso em 12 de março de 2008.
- Ewers FW, Fisher JB. 1989. Variation in vessel length and diameter in stems of six tropical and subtropical lianas. *Am J Bot* 76: 1452-1459.
- Ewers FW, Fisher JB. 1991. Why vines have narrow stems: Histological trends in *Bauhinia* (Fabaceae). *Oecologia* 88: 233-237.
- Fahn A. 1990. Plant anatomy. 4 ed. Oxford: Pergamon.
- Franklin GL. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nat* 155(3924): 51.

- Hickey LJ. 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Anatomy of the dicotyledons. Metcalfe CR, Chalk L, editors, 2 ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 25-39.
- Hong YP, Pan KY, Chen ZD, Lu AM. 2001. Characters of leaf epidermis and their systematic significance in Menispermaceae. *Acta Bot Sin* 43: 615-623.
- Hoot SB, Zautke H, Harris DJ, Crane PR, Neves SS. 2009. Phylogenetic patterns in Menispermaceae based on multiple chloroplast sequence data. *Syst Bot* 34: 44-56.
- Jacques FMB, De Franceschi D. 2007. Menispermaceae wood anatomy and cambial variants. *IAWA J* 28: 139-172.
- Jacques FMB, Bertolino P. 2008. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Plant Syst Evol*. doi 10.1007/s00606-008-0038-7.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. Bombay: Tata McGraw-Hill Book Company.
- Kessler PJA. 1993. Menispermaceae. In: The families and genera of vascular plants—dicotyledons 2. Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V. editors. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kraus J, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Edur, Seropédia.
- Krukoff BA, Barneby RC. 1970. Supplementary notes on American Menispermaceae-VI. *Mem New York Bot Gard* 20: 1-70.
- Lev-Yadun S, Aloni R. 1995. Differentiation of the ray system in woody plants. *Bot Rev* 61: 45-84.
- Metcalfe CR, Chalk L. 1957. *Anatomy of the dicotyledons*. v 1. Oxford: Clarendon Press.
- Metcalfe CR, Chalk L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. v 1. Oxford: Clarendon Press.
- Neuwinger HD. 2000. *African Traditional Medicine: a Dictionary of Plant Use and Applications*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.

- Ortiz RDC. 2001. Menispermaceae. In: Flora de Nicaragua. Missouri Botanic Garden, Systematic Botany Monographs 85: 1432-1442.
- Ortiz RDC, Kellogg RA, Van der Werff H. 2007. Molecular phylogeny of the moonseed family (Menispermaceae): Implications for morphological diversification. *Am J Bot* 94: 1425-1438.
- Philipson WR, Ward JM, Butterfield BG. 1971. The vascular cambium: its development and activity. London: Chapman and Hall.
- Porto NM, Basílio IJLD, Agra MF. 2008. Pharmacobotanical study of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Braz J Pharmacogn* 18: 102-107.
- Putz EF, Holbrook NM. 1991. Biomechanical studies of vines. In: Biology of vines. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rajput KS, Rao KS. 2003. Cambial variant and xylem structure in the stem of *Cocculus hirsutus* (Menispermaceae). *IAWA J* 24: 411-420.
- Rhodes DG. 1962. Menispermaceae. In: Flora of Panama IV, fascicle V. Duke JA, editor *Ann Mo Bot Gard* v 49, pp. 137-255.
- Rhodes DG. 1975. A revision of the genus *Cissampelos*. *Phytol* 30: 415-484.
- Smith FH, Smith EC. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbia*. *Am J Bot* 29: 464-471.
- Solereder H. 1908. Systematic anatomy of the Dicotyledons. v 1 and 2. Oxford: Claredon Press.
- Van Bel AJE. 1990. Medullary bundles in relation to the primary vascular system in Chenopodiaceae and Amaranthaceae. *Bot Gaz* 78: 175-199.
- 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 HP. 1979. The plant surface (mainly leaf). In: Anatomy of the dicotyledons. Metcalfe CR, Chalk L, editors, Clarendon Press, Oxford, pp. 97-165.

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

Espécie	Procedência	Coletor/ número	Coordenadas
<i>C. sympodialis</i> Eichl.	João Pessoa, Paraíba ¹	MF Agra, NM Porto 7.000	07°57' / 34°53''
	Triunfo, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.128	07°52'46.8" / 38°05'20.9"
	Recife, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.129	08°05'22.29" / 34°95'05.67"
<i>C. glaberrima</i> A.St-Hil.	João Pessoa, Paraíba	MF Agra, NM Porto 7.131	07°08'10.71" / 34°51'41.14"
	Buritirana, Maranhão ²	MF Agra, NM Porto 7.068	05°59'80.05" / 47°01'65.06"
	Igarassu, Pernambuco	MF Agra, NM Porto 7.127	07°49.607' / 35°00.432'
<i>C. ovalifolia</i> DC.	Areia, Paraíba	JC Moraes 2.082	Material herborizado
	Garanhuns, Pernambuco	M Oliveira 544	Material herborizado
<i>C. pareira</i> L.	Campina Grande, Paraíba	MF Agra et al. 1.996	Material herborizado
	Gravatá, Pernambuco	M Oliveira 2.658	Material herborizado
<i>C. andromorpha</i> DC.	Igarassu, Pernambuco	MF Agra, NM Porto, AFM Oliveira 7.132	07°47.6' / 35°01.119'
	Igarassu, Pernambuco	GJ Bezerra 54.508	07°47.6' / 35°01.119'

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

2 Espécie coletada em Buritirana, Maranhão.

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 (região mediana)		
	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 da epiderme: 0 – ausente, 1 – presente. Papilas nas faces adaxial e abaxial da epiderme: 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.

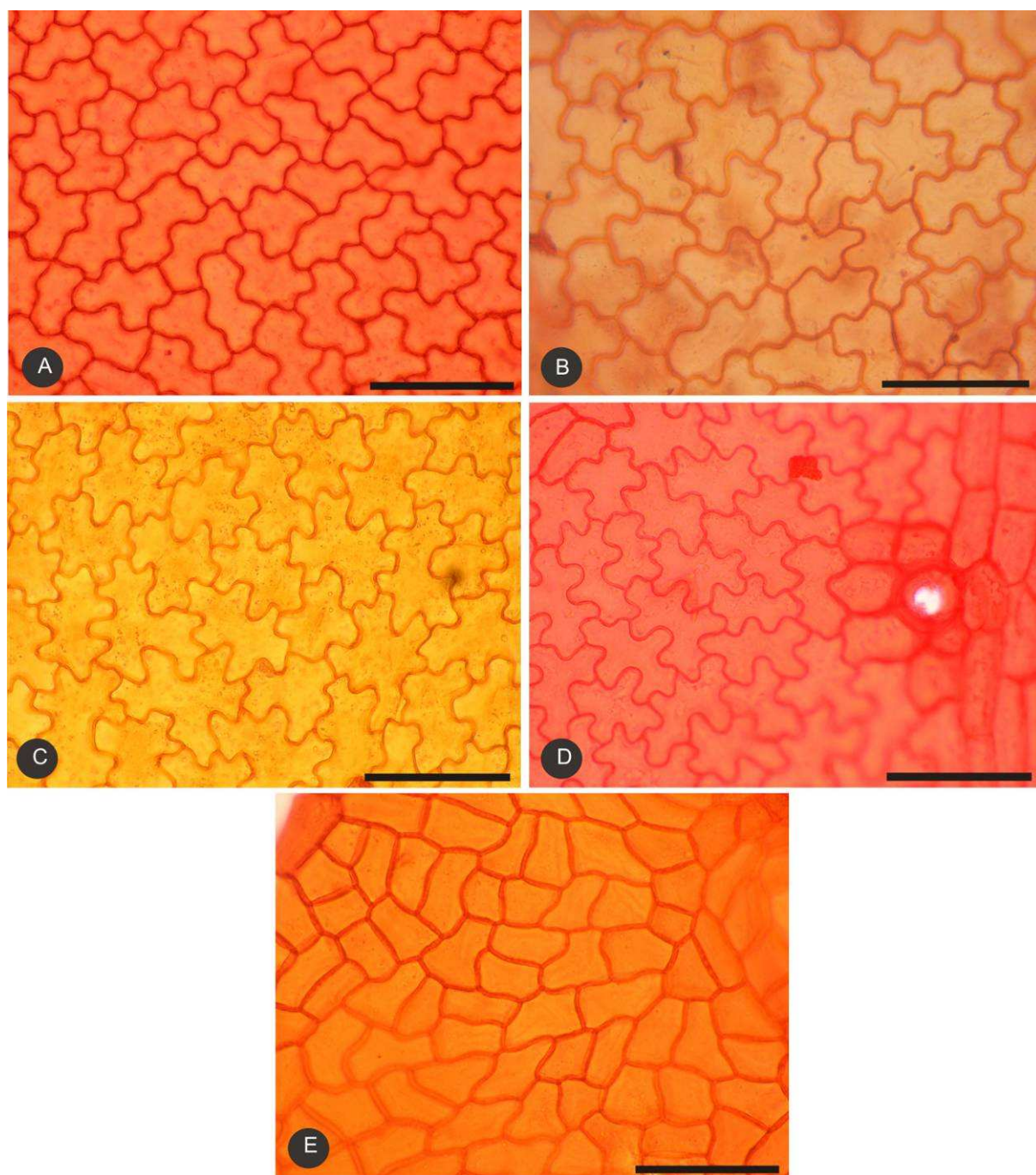
Figura 3 (A-E). Epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

Figura 3 (A-E). Epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: Células epidérmicas com paredes anticlinais ondeadas a sinuosas. (A) *C. sympodialis*; (B) *C. andromorpha*; (C) *C. glaberrima*; (D) *C. ovalifolia*; (E) Células epidérmicas com paredes poligonais a retas em *C. pareira* (Barra: A-E = 100 μ m).

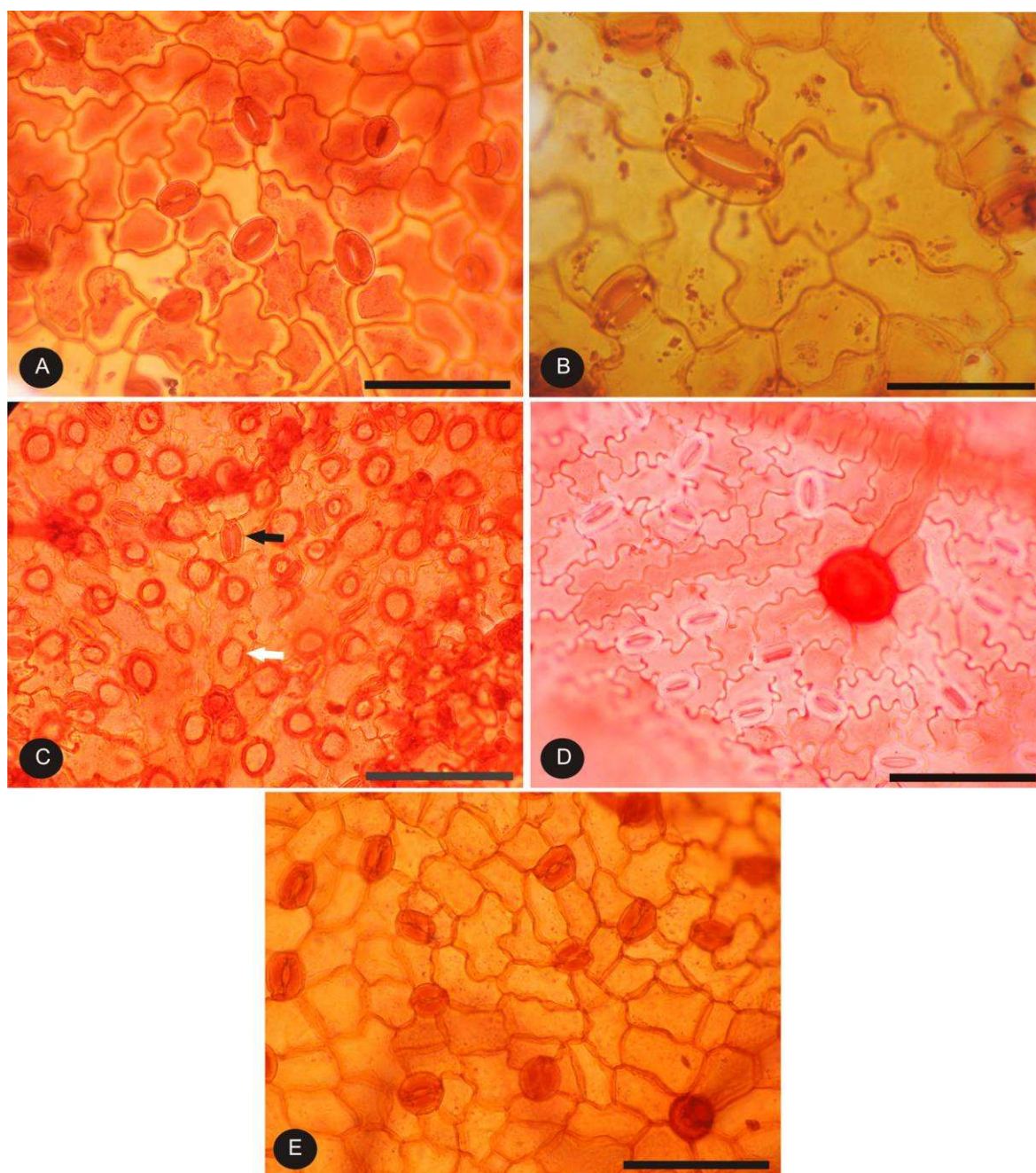
Figura 4 (A-E). Epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

Figura 4 (A-E). Epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: Células epidérmicas com paredes anticlinais ondeadas a sinuosas. (A) *C. sympodialis*; (B) *C. andromorpha*; (C) *C. glaberrima*; (D) *C. ovalifolia*; (E) Células epidérmicas com paredes poligonais a retas em *C. pareira* (Seta branca = papilas, seta preta = estômato; Barra: A, C, D, E = 100 μm ; B = 150 μm).

Figura 5 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

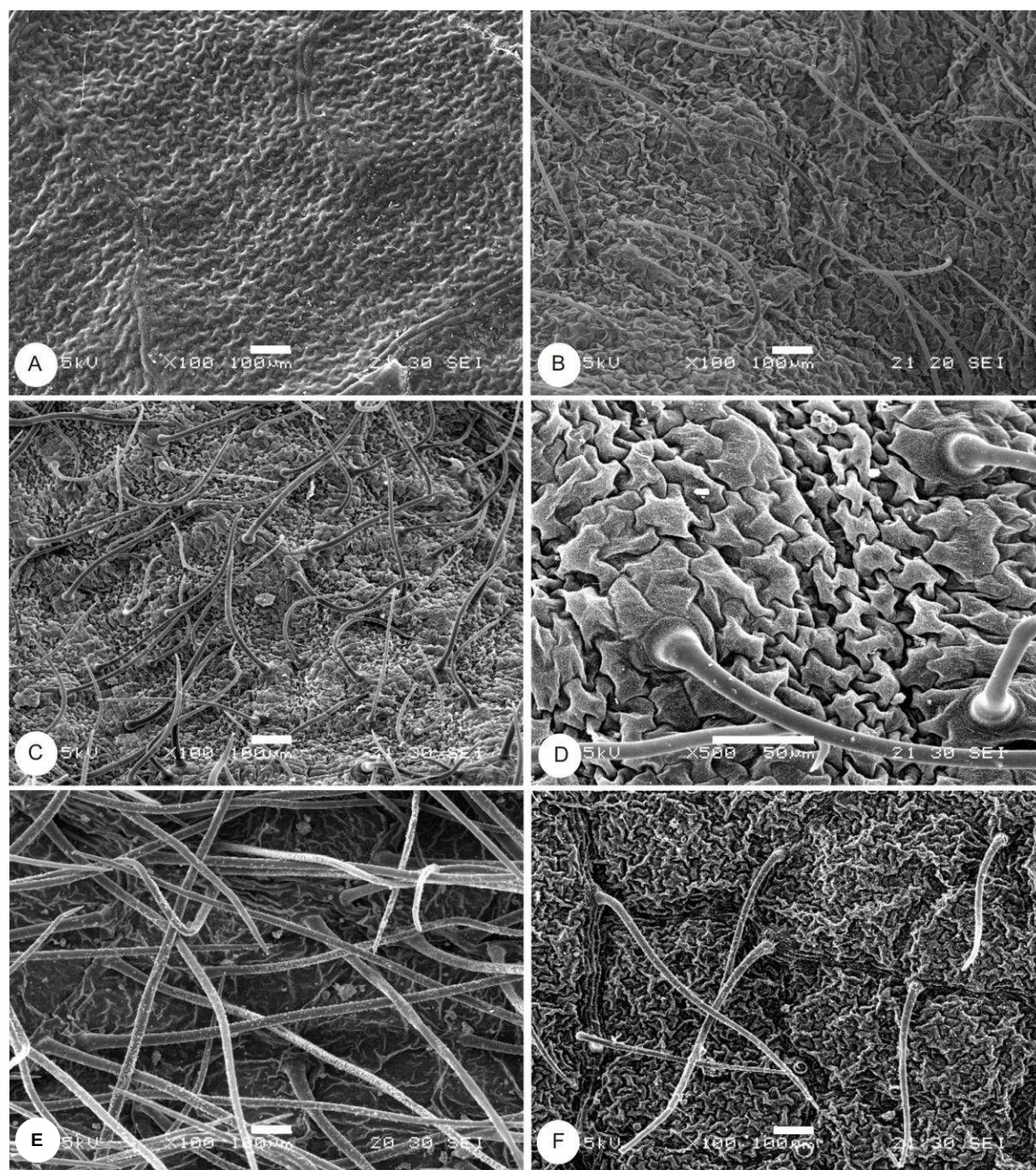


Figura 5 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) Ausência de tricomas na epiderme de *C. sympodialis*; (B) *C. glaberrima* com indumento púberulo; (C) Presença de tricomas unisseriados curtos em *C. andromorpha*; (D) Detalhe da parede das células epidérmicas com contorno ondeado em *C. andromorpha*; (E) Epiderme densamente recoberta por tricomas em *C. ovalifolia*; (F) Epiderme com paredes anticlinais poligonais a retas em *C. pareira*.

Figura 6 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

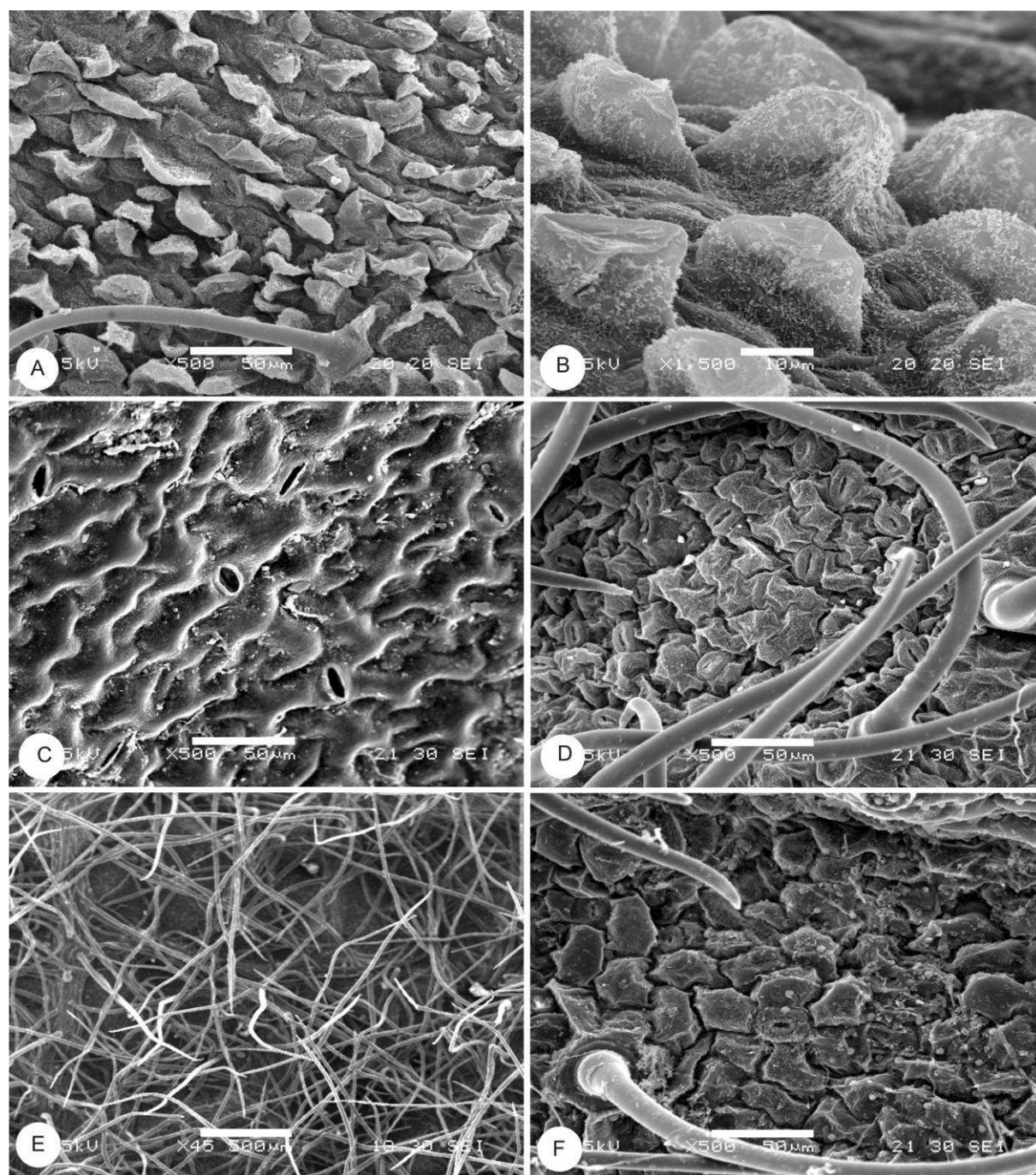


Figura 6 (A-F). Micrografia eletrônica de varredura da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) Papilas na face abaxial de *C. glaberrima*; (B) Detalhe do formato esférico das papilas em *C. glaberrima*; (C) Ausência de tricomas na lâmina foliar em *C. sympodialis*; (D) Células epidérmicas com parede anticlinal ondeada em *C. andromorpha*; (E) Epiderme densamente recoberta com tricomas unisseriados em *C. ovalifolia*; (F) Células epidérmicas com parede anticlinal reta em *C. pareira*.

Figura 7 (A-G). Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme abaxial da lâmina foliar de *Cissampelos* L.

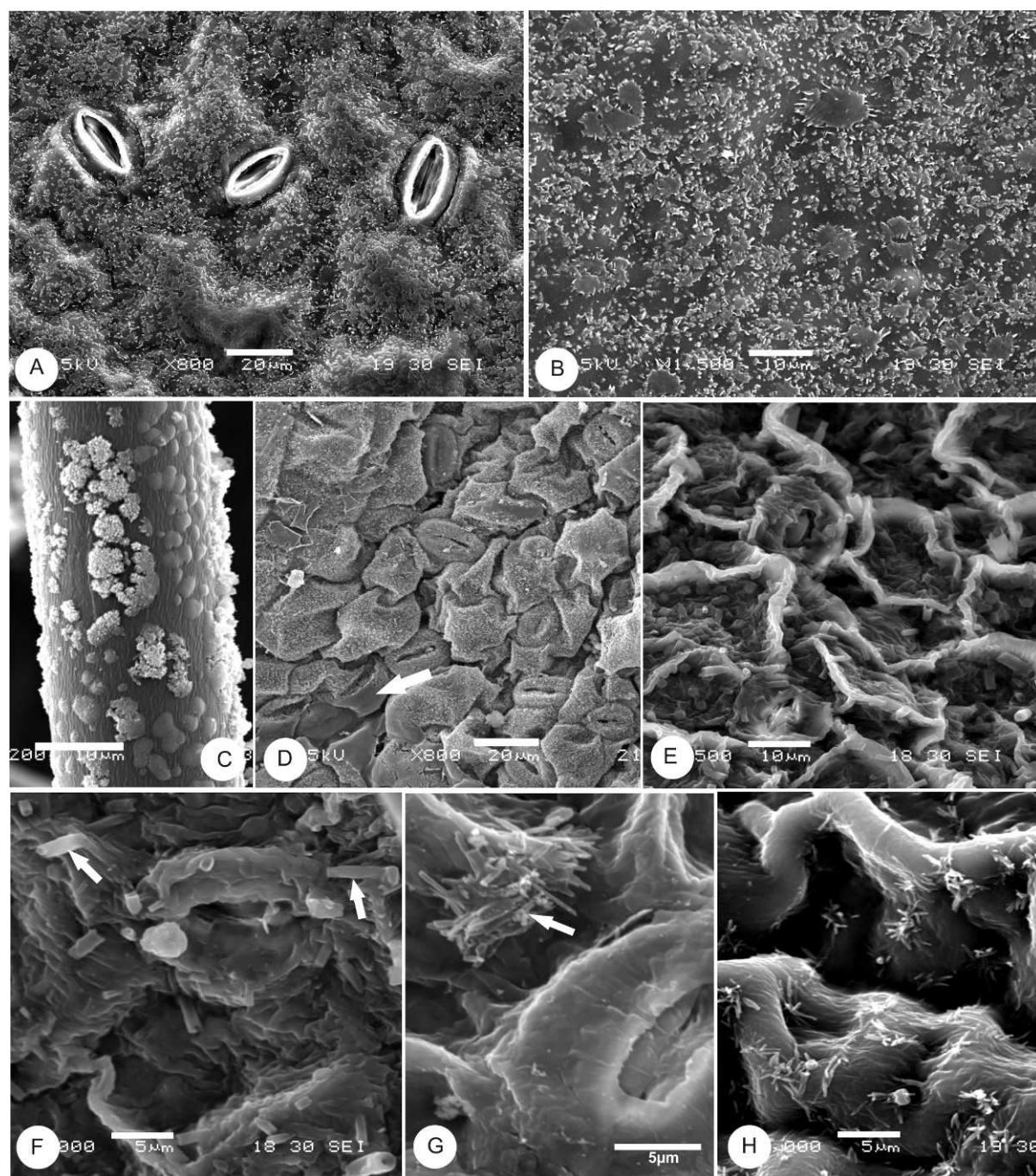


Figura 7 (A-G). Ultraestrutura de ceras epicuticulares da epiderme da lâmina foliar de *Cissampelos* L.: (A) *C. sympodialis* mostrando cristais distribuídos de forma densa sobre a epiderme na face abaxial; (B) Detalhe da cera em forma de grânulos e camadas fissuradas em *C. sympodialis* na face adaxial; (C) Cera em forma de grânulos depositada sobre tricomas em *C. ovalifolia*; (D) Detalhe de camadas de cera epicuticular na epiderme de *C. andromorpha* na face abaxial (seta); (E) *C. glaberrima* com cristais de cera em forma de túbulos na face abaxial; (F) Ultraestrutura de cera em forma de túbulos em *C. pareira* na face abaxial (seta); (G) Cera epicuticular depositada sobre estômatos em *C. pareira* na face abaxial (seta); (H) Cristais em formam túbulos aglomerados em *C. pareira* na face adaxial.

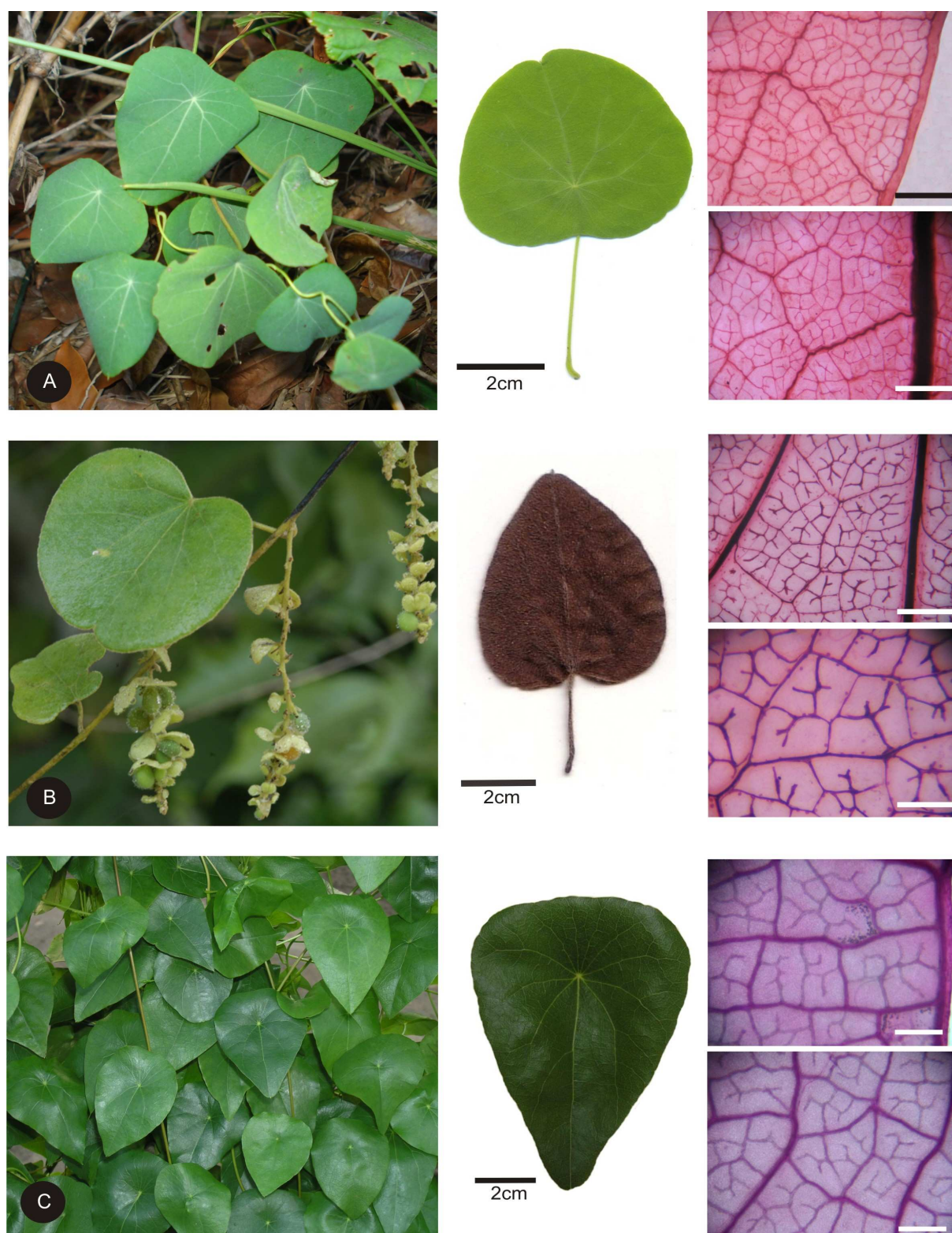
Figura 8 (A-C). Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de *Cissampelos* L.

Figura 8 (A-C). Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de *Cissampelos* L.: (A) nervuras quartenárias do tipo poligonal reticulada em *C. glaberrima* e margem fimbriada; (B) nervuras quartenárias do tipo pecurrente alternada em *C. pareira*; (C) *C. sympodialis*, apresenta margem fimbriada, as aréolas são imperfeitas e apresentam formato irregular, com terminações simples, lineares ou curvadas, 2-3 ramificações (Barra: A, B, C = 100 μ m).

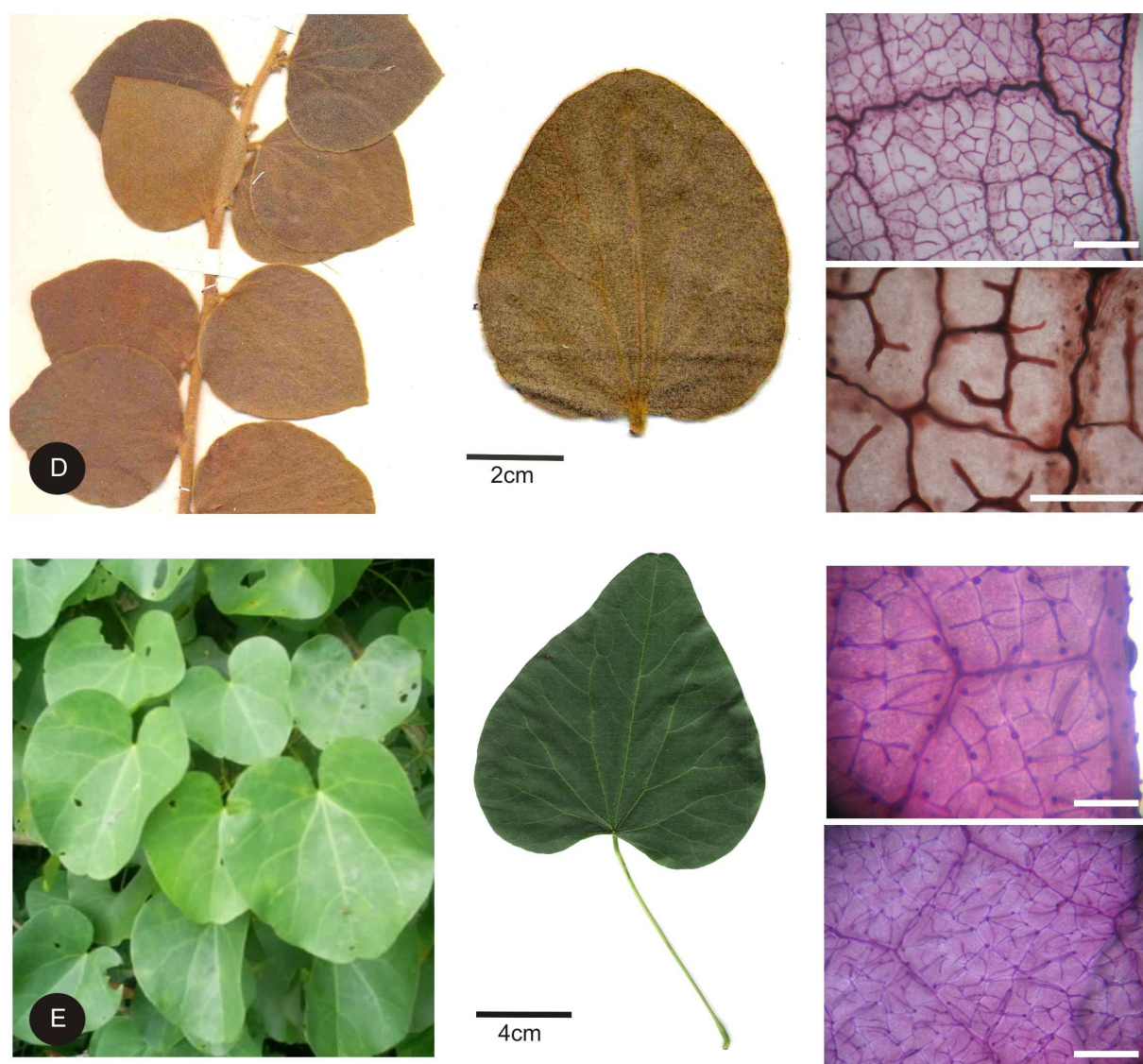
Figura 9 (D-E). Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de *Cissampelos* L.

Figura 9 (D-E). Nervação foliar do tipo actinódromo-broquidódromo de *Cissampelos* L.: (D) venação última marginal fimbriada em *C. ovalifolia*; (E) *C. andromorpha* possui margem fimbriada (Barra: D, E =100 μ m).

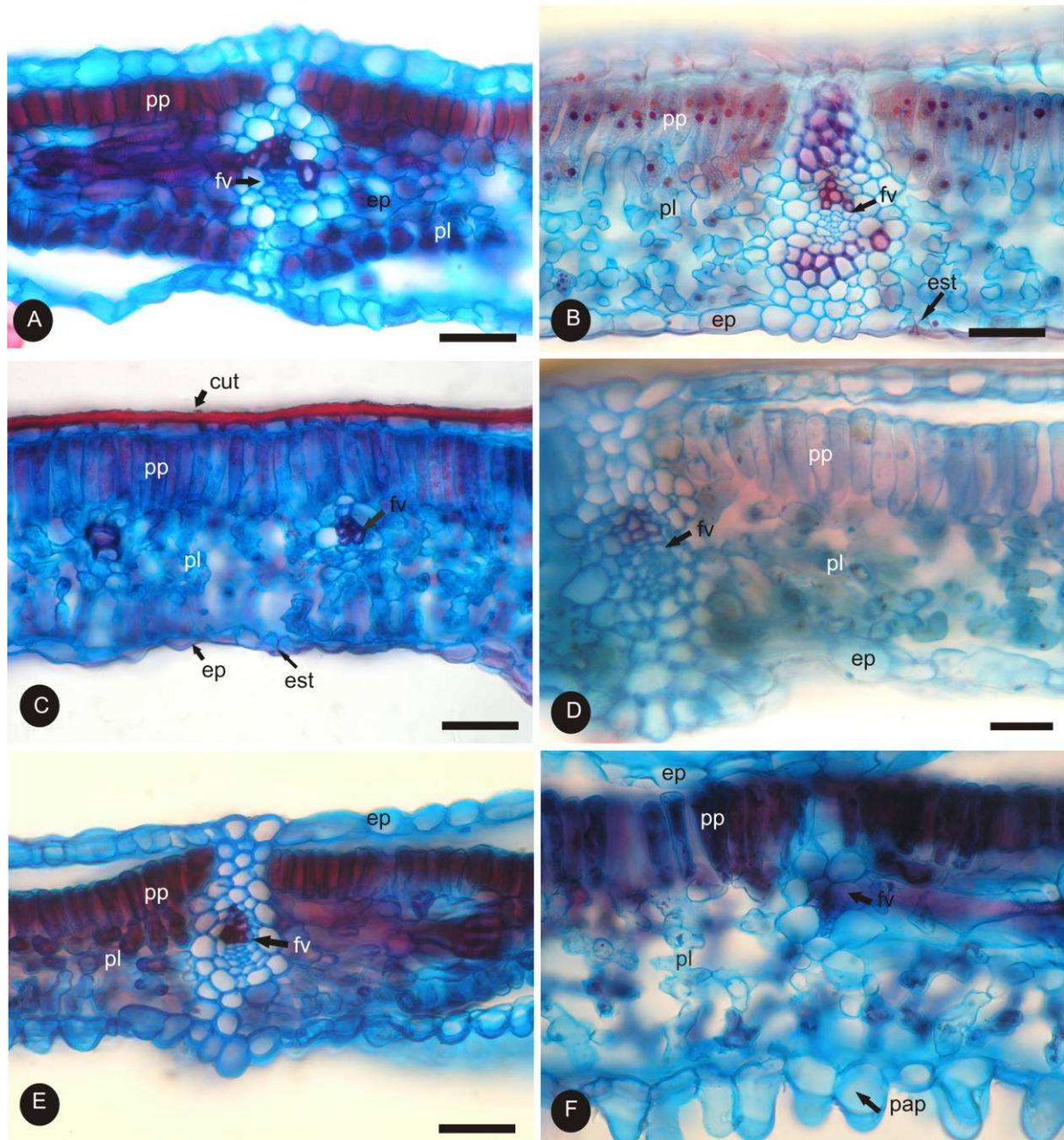
Figura 10 (A-F). Secção transversal do mesofilo dorsiventral de *Cissampelos* L.

Figura 10 (A-F) Secção transversal do mesofilo dorsiventral de *Cissampelos* L.: (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: cut: cutícula, ep: epiderme, est: estômato, fv: feixe vascular, pp: parênquima paliçádico, pl: parênquima lacunoso, pap: papila (Barra: A-E = 50 µm; F = 100X).

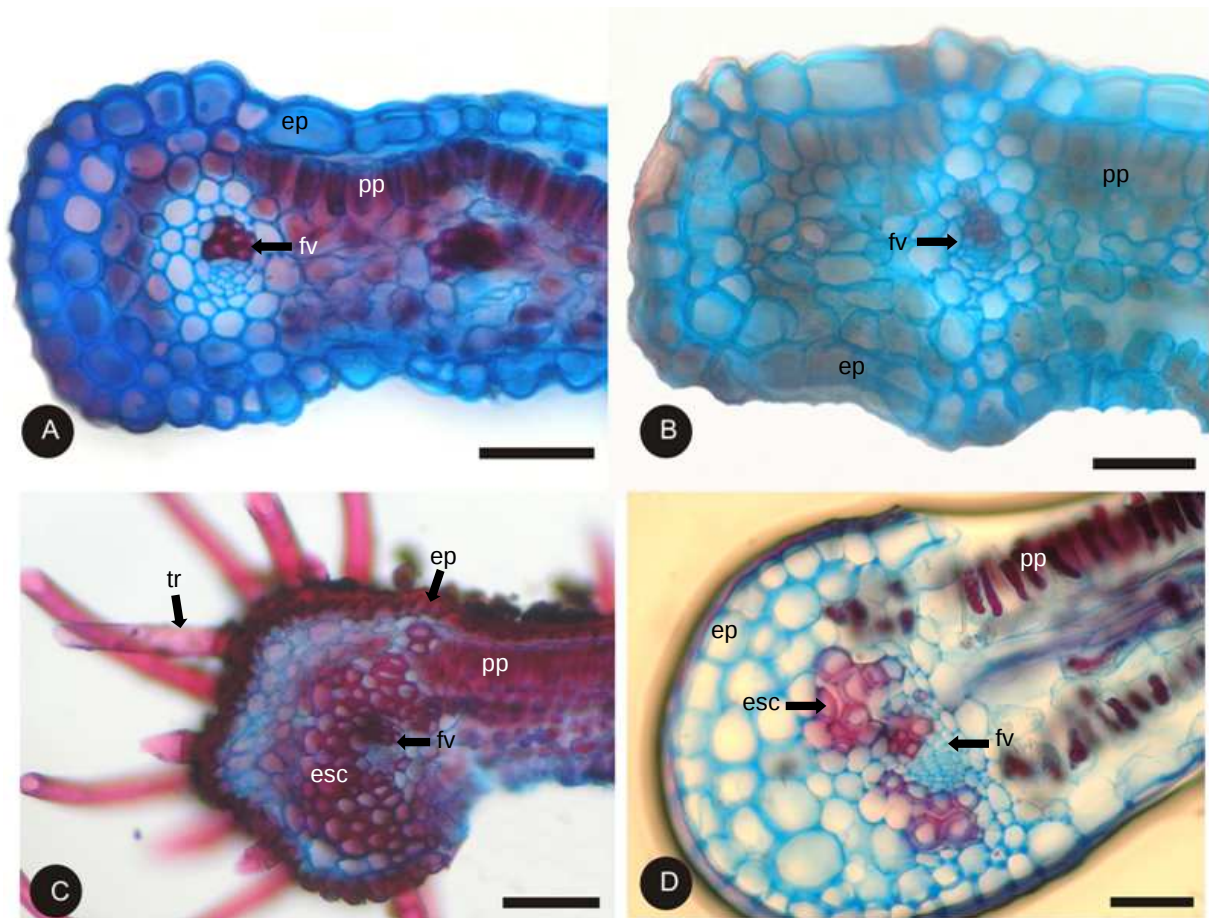
Figura 11 (A-D). Secção transversal do bordo de *Cissampelos* L.

Figura 11 (A-D). Secção transversal do bordo de *Cissampelos* L.: (A) *C. glaberrima* possui bordo circular; (B) *C. pareira* com bordo revoluto; (C) *C. ovalifolia* possui bordo revoluto, o feixe vascular está envolvido por células esclerenquimáticas formando um arco; (D) *C. sympodialis* apresenta bordo rotundo. Legenda: ep: epiderme, esc: esclerênquima, fv: feixe vascular, pp: parênquima paliçádico, tr: tricoma (Barra: A, B, D = 50 μ m; C = 100 μ m).

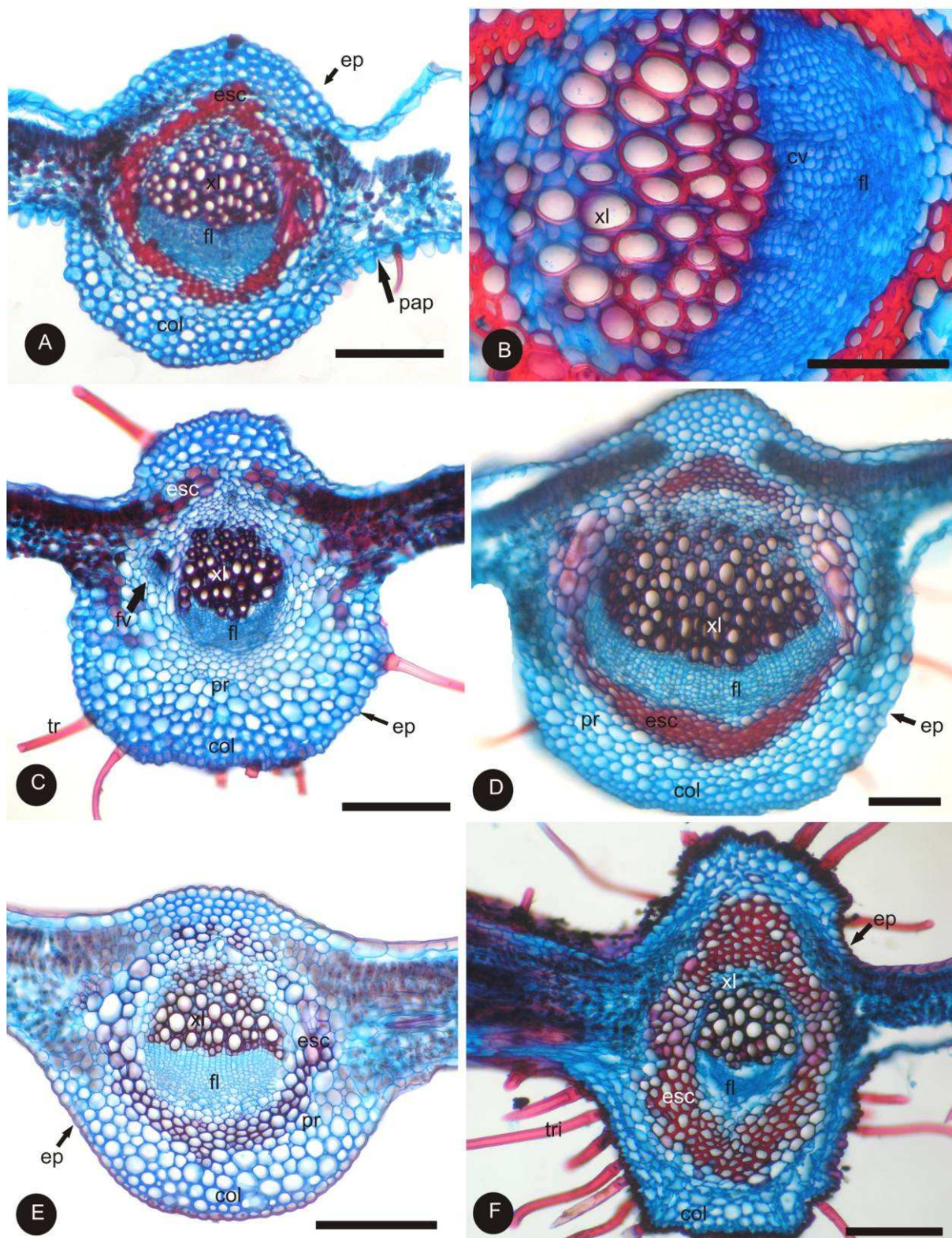
Figura 12 (A-F). Secção transversal da nervura mediana de espécies de *Cissampelos* L.

Figura 12 (A-F). Secção transversal da nervura mediana de *Cissampelos* L.: (A) *C. glaberrima*; (B) Detalhe do feixe vascular colateral de *C. glaberrima*; (C) *C. pareira*; (D) *C. andromorpha*; (E) *C. sympodialis*; (F) *C. ovalifolia*; Legenda: col: colênquima, cv: câmbio vascular, ep: epiderme, esc: esclerênquima, fl: floema, fv: feixe vascular, pap: papila, pr: parênquima, tr: tricoma, xl: xilema (Barra: A, B, E = 150 μ m; C= 300 μ m; D, F = 100 μ m).

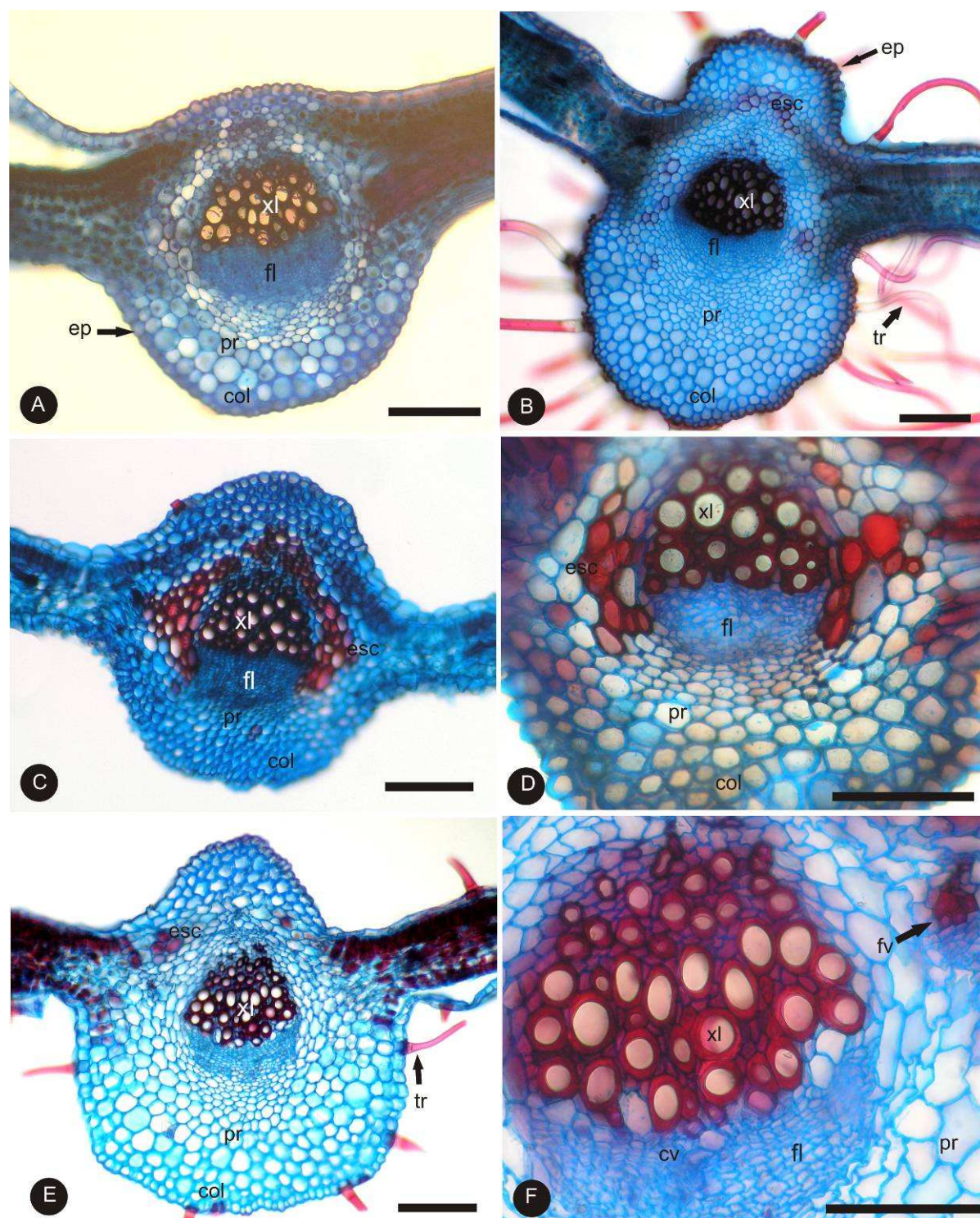
Figura 13 (A-F). Secção transversal da nervura basal de *Cissampelos* L.

Figura 13 (A-F). Secção transversal da nervura basal de *Cissampelos* L.: (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. andromorpha* evidenciando feixe vascular colateral diminuto. Legenda: col: colênquima, cv: câmbio vascular, ep: epiderme, esc: esclerênquima, fl: floema, fv: feixe vascular, pr: parênquima, tr: tricoma, xl: xilema (Barra: A, B, E = 150 μ m; C= 300 μ m; D, F = 100 μ m).

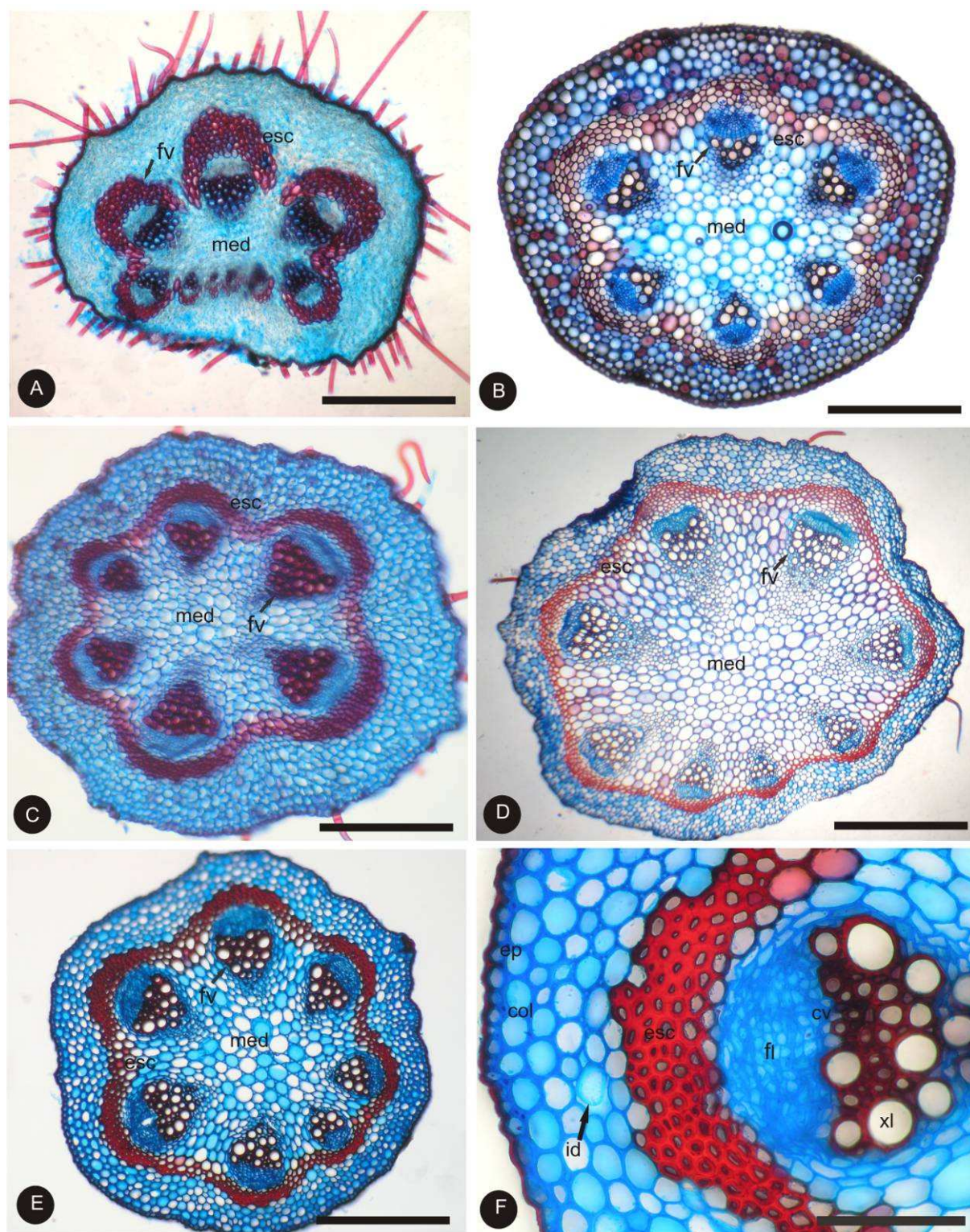
Figura 14 (A-F). Secção transversal do pecíolo mediano de *Cissampelos* L.

Figura 14 (A-F). Secção transversal do pecíolo mediano de *Cissampelos* L.: (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: col: colênquima, cv: câmbio vascular, ep: epiderme, esc: esclerênquima, fl: floema, fv: feixe vascular, id: idioblasto, med: medula, xl: xilema (Barra: A-E = 300 μm ; F = 100 μm).

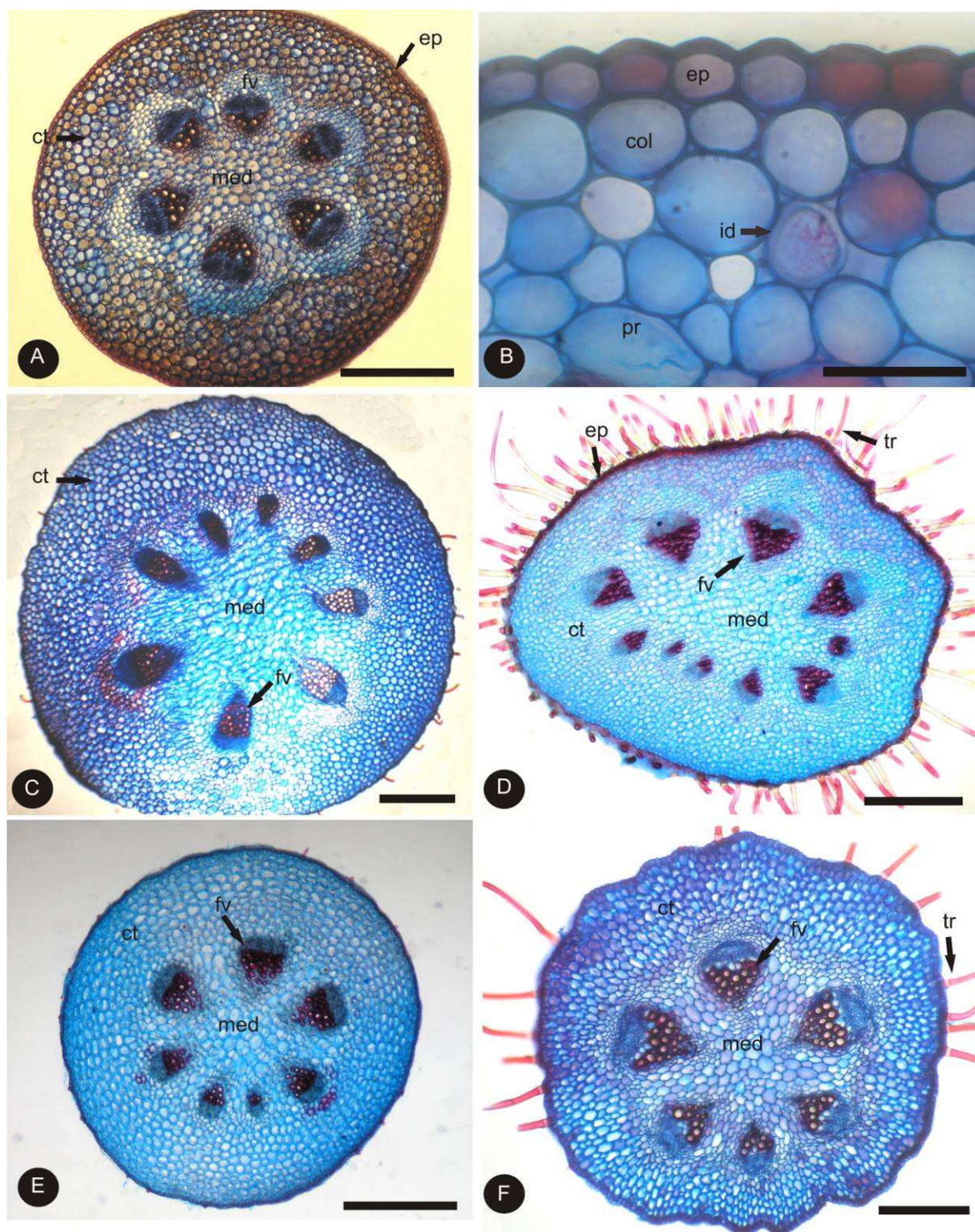
Figura 15 (A-F). Secção transversal do pecíolo basal de *Cissampelos* L.

Figura 15 (A-F). Secção transversal do pecíolo basal de *Cissampelos* L.: (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: col: colênquima, ct: córtex, ep: epiderme, fv: feixe vascular, id: idioblasto, med: medula, pr: parênquima, tr: tricoma (Barra: A, C, D, E = 500 µm; B = 100 µm).

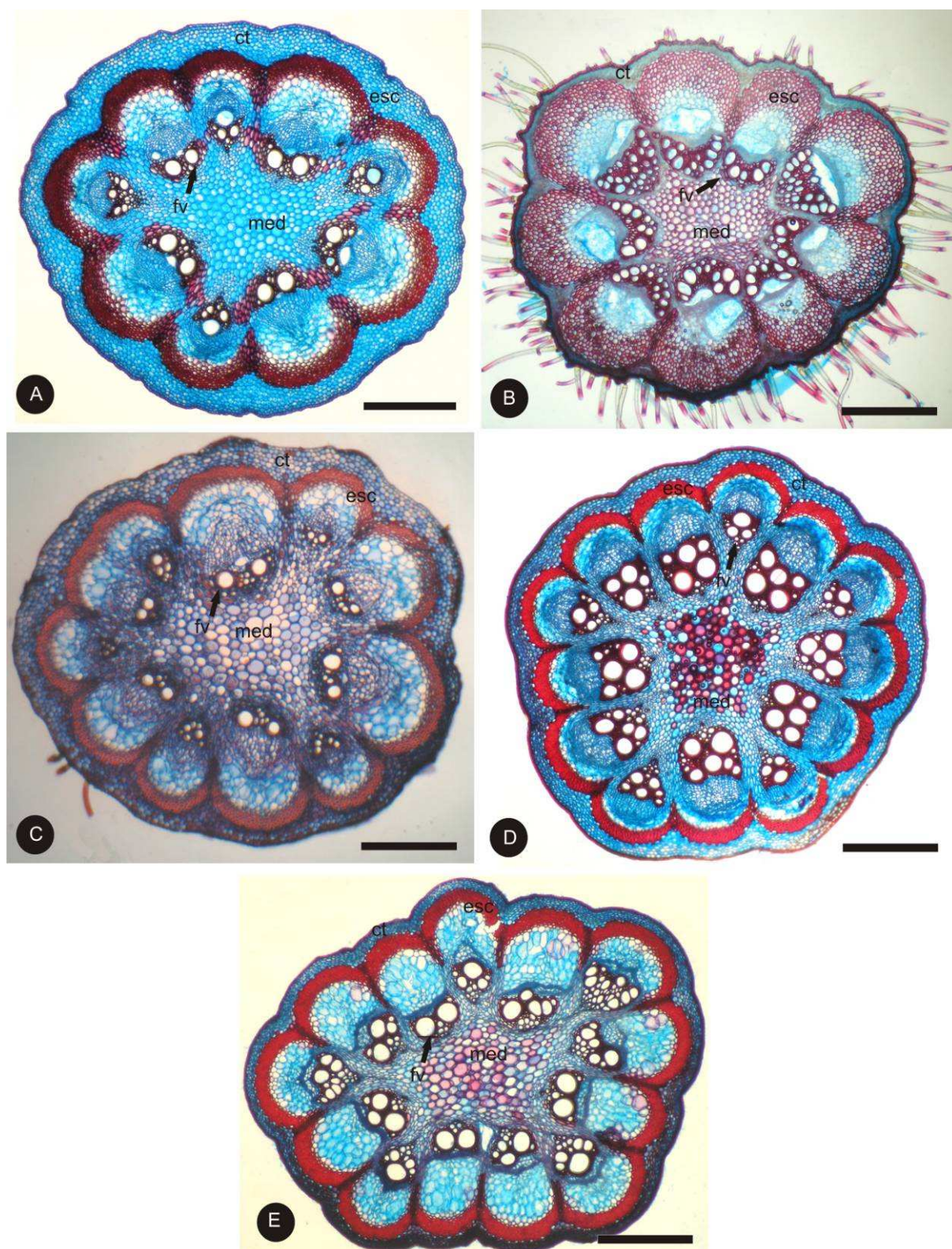
Figura 16 (A-E). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.

Figura 16 (A-E). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.: (A) *C. sympodialis*; (B) *C. ovalifolia*; (C) *C. andromorpha*; (D) *C. glaberrima*; (E) *C. pareira*;

Legenda: ct: córtex, esc: esclerênquima, fv: feixe vascular, med: medula (Barra: A-E = 500 μ m).

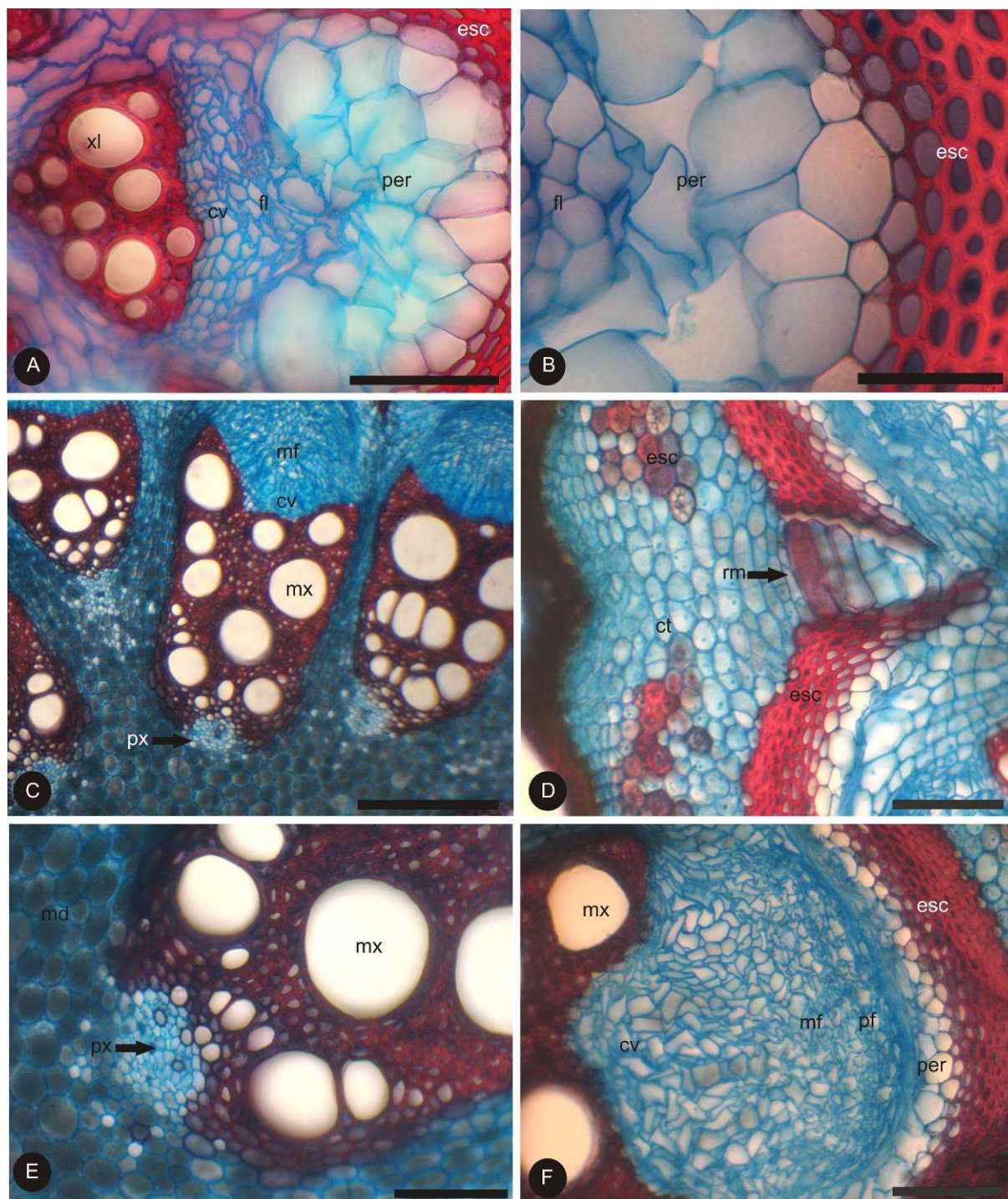
Figura 17 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.

Figura 17 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.: (A) Detalhe do feixe vascular em *C. pareira*; (B-F) *C. andromorpha*. (B) Detalhe da região pericíclica, observe as divisões que ocorrem nas células pericíclicas parenquimáticas; (C) Diferenciação das fibras do protoxilema; (D) Formação de novos cordões vasculares na região dos sulcos, entre as porções do periciclo fibroso e posteriormente nas regiões adjacentes, presença de esclereídes na região cortical; (E) Elementos de vaso do xilema secundário em diferenciação; células parenquimáticas da medula contendo amiloplastos; (F) Floema condutor (MF) e floema não condutor (PF), este último formado pela porção inicial não condutora e pela porção colapsada (seta preta). Legenda: cv: câmbio vascular, ct: córtex, esc: esclerênquima, escl: esclereídes, fl: floema, md: medula, mf: metafloema, mx: metaxilema, per: periciclo, px: protoxilema, rm: raio medular, xl: xilema (Barra: C = 300 μm ; A, B, D, E, F = 100 μm).

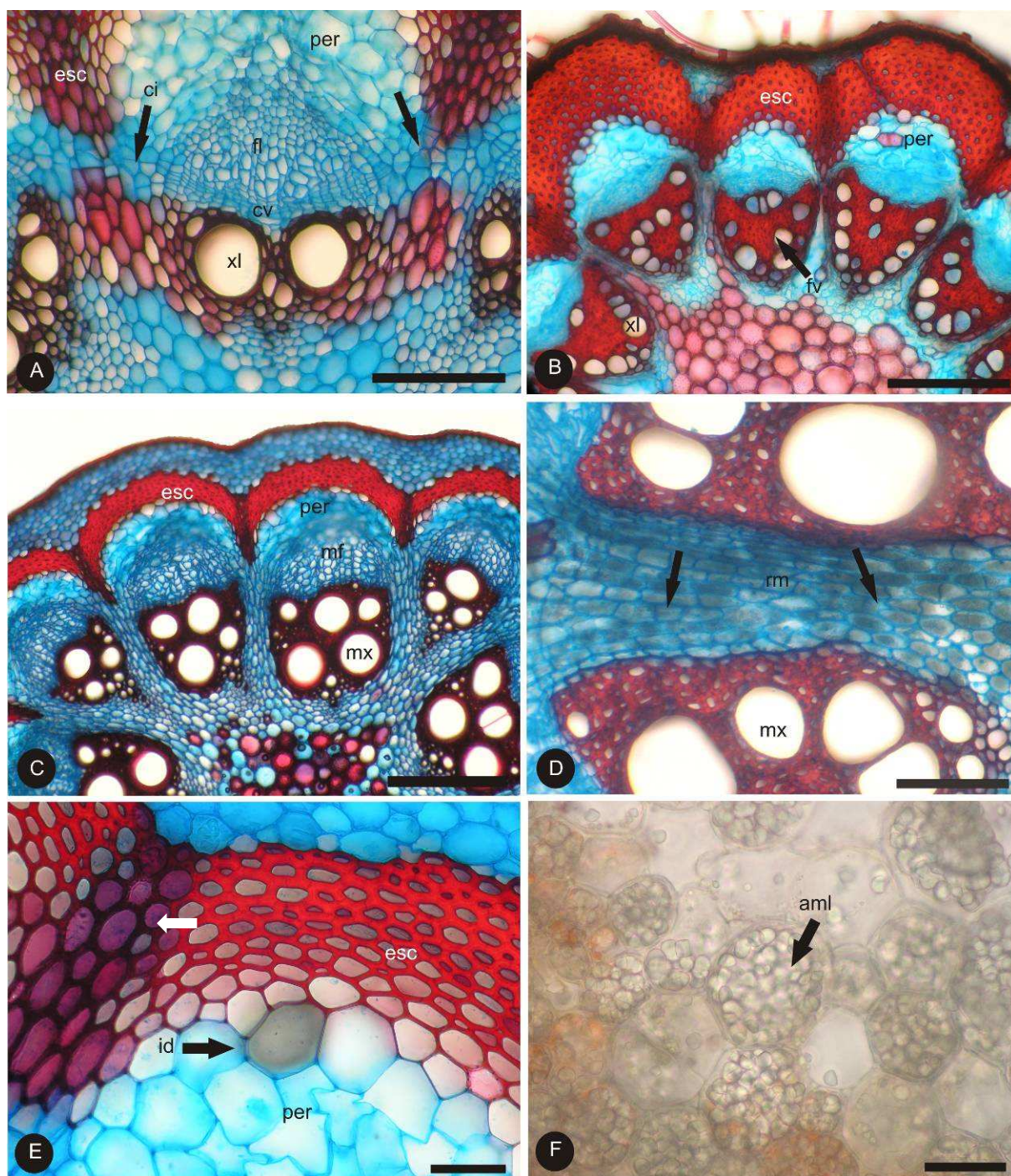
Figura 18 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.

Figura 18 (A-F). Secção transversal de caule de espécies de *Cissampelos* L.: (A) Detalhe do câmbio interfascicular em *C. sympodialis*; (B) Detalhe da região cortical em *C. ovalifolia* com espessamento do anel esclerenquimático envolvendo o sistema vascular e presença de poucas células parenquimáticas formando o córtex; (C-D) *C. glaberrima*. (C) Configuração do caule em crescimento secundário com grupos de células axiais separados por raios medulares largos; (D) Observe os raios medulares separando os cordões vasculares; (E) *C. sympodialis*: Processo de diferenciação e lignificação de células da região interfascicular (seta branca), presença de idioblastos na região pericíclica; (F) Detalhe de células parenquimáticas contendo amiloplastos em *C. glaberrima*. Legenda: aml: amiloplastos, ci: câmbio interfascicular, cv: câmbio vascular, esc: esclerênquima, fl: floema, fv: feixe vascular, id: idioblastos, mf: metafloema, mx: metaxilema, per: periciclo, xl: xilema (Barra: A = 300 µm; C = 400 µm; B, D = 100 µm; E, F = 50 µm).

Capítulo

2

CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DE TRÊS ESPÉCIES DE *Cissampelos* L. (MENISPERMACEAE) UTILIZADAS COMO MEDICINAIS NO NORDESTE DO BRASIL



© Porto

Artigo a ser submetido a “*Pharmaceutical Biology*”

**Caracterização Histoquímica e Cromatográfica de Três Espécies de *Cissampelos*
(Menispermaceae) Utilizadas como Medicinais no Nordeste do Brasil**

Niara Moura Porto^{1*}, Maria de Fátima Agra², Emerson Peter da Silva Falcão³, Antonio
Fernando Moraes Oliveira⁴

1. Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.
2. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Caixa Postal 5009, 58.051-970, Paraíba, PB, Brasil.
3. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Núcleo de Nutrição CAV/UFPE, 55.608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.
4. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 50.670-901 - Recife, PE, Brasil.

Resumo

Cissampelos sympodialis Eichl. (Menispermaceae), conhecida popularmente como “milona e abuteira” no Nordeste do Brasil, sendo utilizada na medicina tradicional no tratamento de doenças respiratórias. Neste trabalho realizou-se a caracterização cromatográfica (CCD e CLAE) e histoquímica (MO) de *C. sympodialis* e outras duas espécies morfológicamente semelhantes: *C. glaberrima* A.St.-Hil. e *C. andromorpha* DC. A análise do extrato etanólico em CLAE evidenciou a presença de alcaloides nas três espécies. A presença de warifteina foi constatada somente nos extratos de folhas e caule de *C. sympodialis*, confirmado por dados obtidos em CCD. A análise histoquímica corroborou com os dados

*Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, 50670-901, Recife, PE, Brasil. Tel: +55-81-2126-8352, Fax: +55-81-2126-7803, e-mail: niaraporto@yahoo.com.br

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 três espécies de *Cissampelos* permitiu o estabelecimento de parâmetros que serão úteis em testes de autenticidade de drogas constituídas a partir dessas espécies.

Palavras-chave: 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 cerca de 70 gêneros, dos quais *Cissampelos* L. está representado por 20 espécies distribuídas no Norte e Sul das Américas, na África e na Ásia. No Brasil há registros de dez espécies distribuídas 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 (quimiossistemático), 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) (Fig. 19), 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 caracterizem, diferenciem e autenticem 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).

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 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_4OH 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 (Barbosa-Filho et al., 1997).

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^{-1} em etanol de cada extrato. Os extratos foram cromatografados em placas de gel de sílica 60 F_{254} (Merck) no sistema clorofórmio/metanol (17:3 v/v) e padrão de warifteina a 1 mg.mL^{-1} 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 a temperatura do forno ajustada a 30 °C. A fase móvel utilizada para as condições analíticas descritas foi MeOH/ H_2O / ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), segundo Legaz & Vicente (1983).

A quantificação da warifteina nas espécies em estudo foi realizada através de uma amostra padrão deste alcaloide. Uma solução estoque de warifteina a 1 mg.mL^{-1} em metanol espectroscópico foi diluída sucessivamente originando nove concentrações que foram mantidas a 4 °C e armazenadas até as análises. As amostras de warifteina foram injetadas no cromatógrafo (15 μL) em triplicata e a média das áreas dos picos cromatográficos foi utilizada para a construção da curva de calibração. As frações alcaloídicas (folha e caule) das espécies

foram pesadas (1mg) e diluídas em metanol na concentração 1mg.mL^{-1} 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). Os testes histoquímicos aplicados às secções transversais do caule e folhas nas três espécies de *Cissampelos* estudadas demonstraram reação positiva para alcaloides, apresentando coloração castanha avermelhada nas células secretoras (Figs. 20A-J).

As estruturas secretoras são registradas para vários gêneros de Menispermaceae como *Cyclae*, *Diplocclisia*, *Stephania* e *Cissampelos* (Metcalfe & 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*, não sendo visualizado 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. 20F, H). Em *C. andromorpha* o parênquima encontra-se em fase de esclerificação, onde estão incluídos abundantes grupos de células pétreas, as esclereides contendo alcaloides (Fig. 20J). Idioblastos ocorrem em torno do floema secundário de vários feixes colaterais dispostos em círculo e envolvidos por um anel esclerenquimático (Fig. 20I). A medula é constituída por células parenquimáticas contendo grânulos de amido (Figs. 20A, 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. 20G).

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. 20E). 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. 21A, 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 relata 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. Porém, Fischer et al. (2004), utilizando metodologia semelhante à empregada neste estudo, identificaram frações com resultados positivos para alcaloides nessa espécie. Estudos químicos realizados com *C. andromorpha*, no entanto, são raros.

A ocorrência de warifteina (R_f 0,72) foi confirmada somente nos extratos foliares e caulinares de *C. sympodialis*. Além de *C. sympodialis*, warifteina 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 alcaloides 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 21. 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 comparada às demais. O alcaloide warifteina apresentou R_f próximo a 0,72, com fluorescência levemente azulada sob luz UV 254 nm (Fig. 21A) e fluorescência amarelo-avermelhada, quando revelado sob luz UV 366 nm (Fig. 21B). 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*.

A curva de calibração para a warifteina estabelecida com as nove concentrações pelo método dos mínimos quadrados forneceu a equação da reta $y = 0,0038x + 0,0092$ (Fig. 22). A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9987$, valor que comprova a linearidade do método (Fig. 23). O cromatograma obtido pela cromatografia líquida mostra a detecção da warifteina após 5,38 min. de análise (Fig. 24).

Os picos nos cromatogramas obtidos foram comparados com o tempo de retenção da warifteina (Figs. 24A-C). A presença deste alcaloide foi confirmada novamente nos extratos de *C. sympodialis*. Também foi confirmado pela CLAE que a warifteina 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 warifteina em *C. glaberrima* e *C. andromorpha* não descredencia 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: Appearzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM, eds. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: UFV, 179-203.

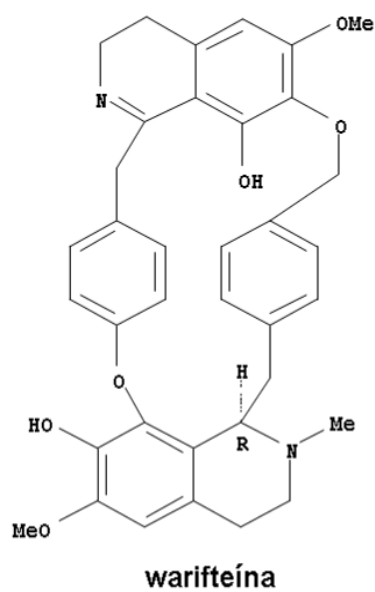
- Cortes SF, Alencar JL, Thomas G, Barbosa-Filho JM. (1995). Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Phytother Res*, 9, 579-583.
- De Wet H, Tilney PM, Van Wyk BE. (2002). Vegetative morphology 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 warifteine, 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. (1983). Endogenous inactivators of arginase decarboxylase and agmatine amidinohydrolase. In: *Evernia prunastri* 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.

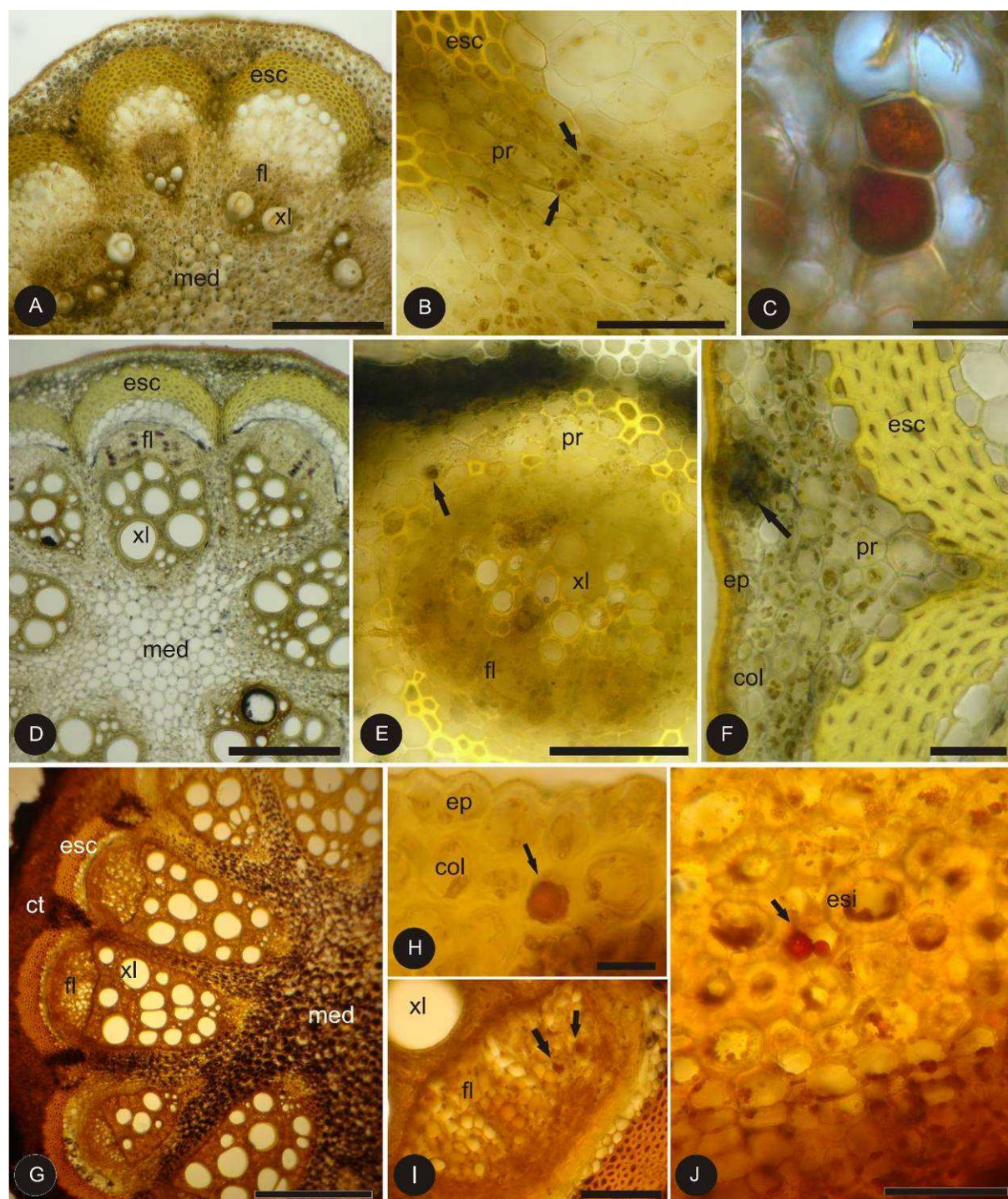
Tabela 4. Procedência, número do voucher e coordenadas das espécies de *Cissampelos* analisadas.

Espécie	Local de coleta	Voucher	Coordenadas
<i>C. sympodialis</i>	- Horto de plantas medicinais	MF Agra, NM Porto 7.000	07°57' / 34°53''
	Delby Fernandes de Medeiros (LTF – UFPB)		
	- Campus da UFPE	MF Agra, NM Porto 7.129	08°05'22.29" / 34°95'05.67"
<i>C. andromorpha</i>	- Usina São José, Igarassu – PE	MF Agra, NM Porto, AFM Oliveira 7.132	07°47.6' / 35°01.119'
	- Usina São José – PE	MF Agra, NM Porto 7.068,	07°49.607' / 35°00.432'
<i>C. glaberrima</i>	- João Pessoa – PB	MF Agra, NM Porto 7.127	07°08'10.71" / 34°51'41.14''
	- Buritirana – MA	MF Agra, NM Porto 7.131	05°59'80.05" / 47°01'65.06"

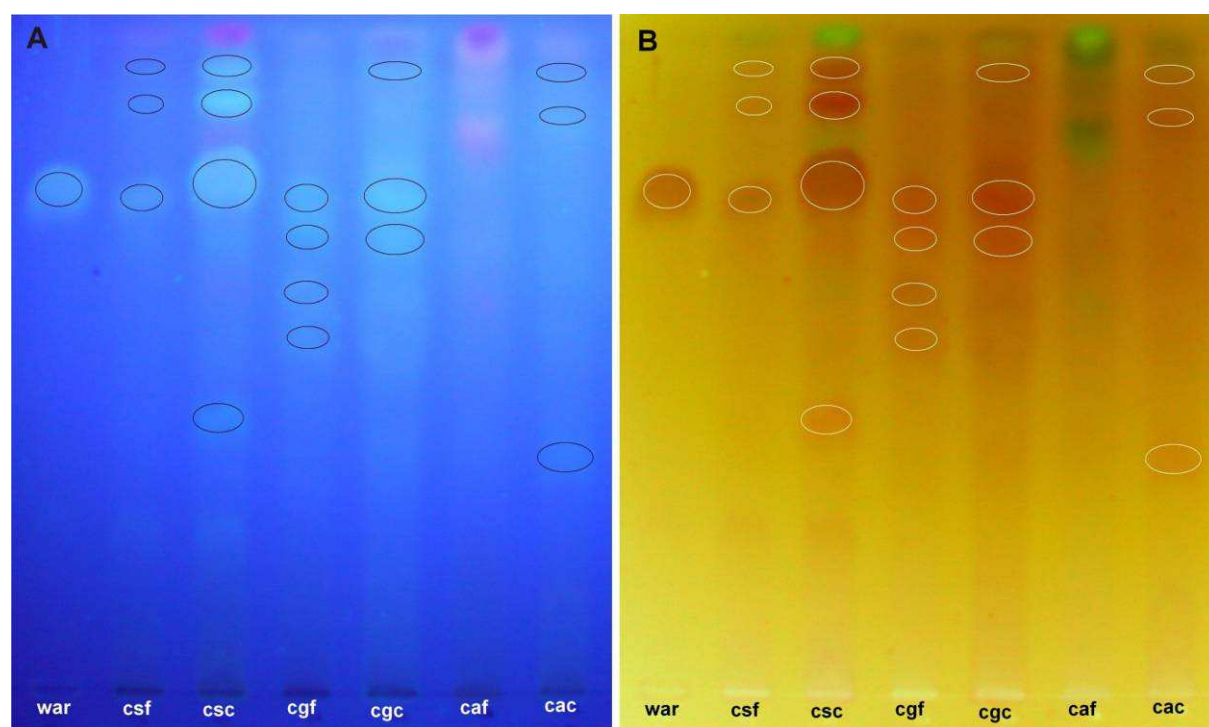
Figura 19 Alcaloide warifteína.



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

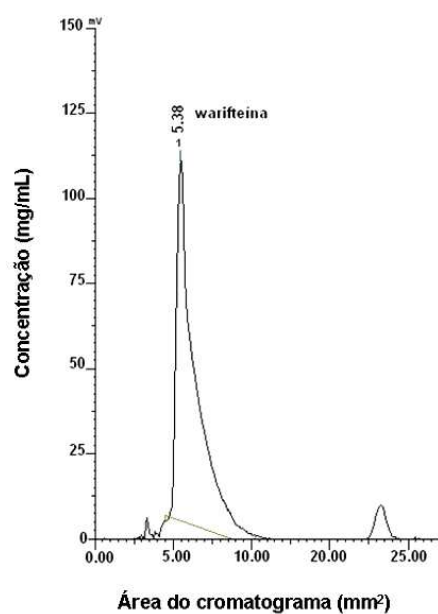
Figura 20 (A-J) Anatomia e histoquímica de *Cissampelos*.

Legenda: Anatomia e histoquímica de *Cissampelos*. A-C: *Cissampelos 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 esclereides com alcaloides (escala 100 μm). Legenda: ct: córtex; ep: epiderme; fl: floema; xl: xilema, md: medula; pr: parênquima; col: colênquima; esi: esclereide.

Figura 21 (A-B) Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de *Cissampelos*.

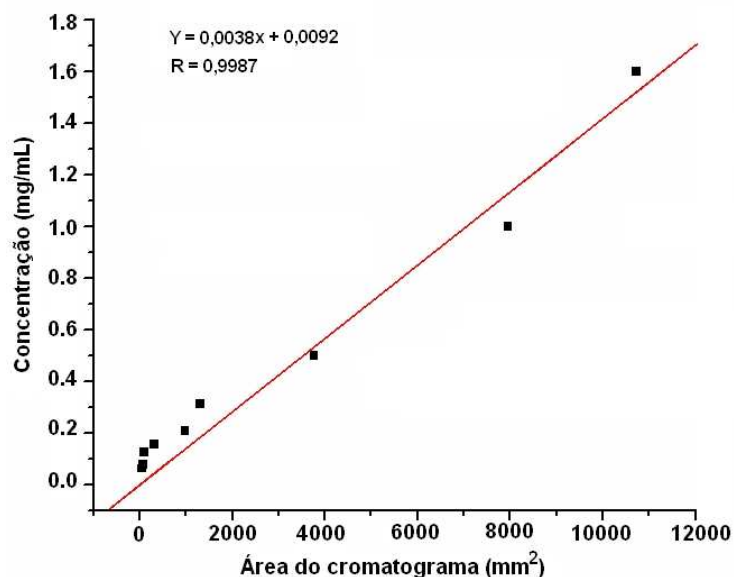
Legenda: Cromatograma (CCD) das frações de alcaloides de *Cissampelos* visualizada em UV a 366 nm (A) e borrifadas com Dragendorff (B). Manchas alcaloídicas destacadas nas cromatoplasas. Legenda: warf: padrão warifteina; csf: extrato foliar de *C. sympodialis*; csc: extrato caulinar de *C. sympodialis*; 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 22 Cromatograma (CLAE) do padrão warifteina.

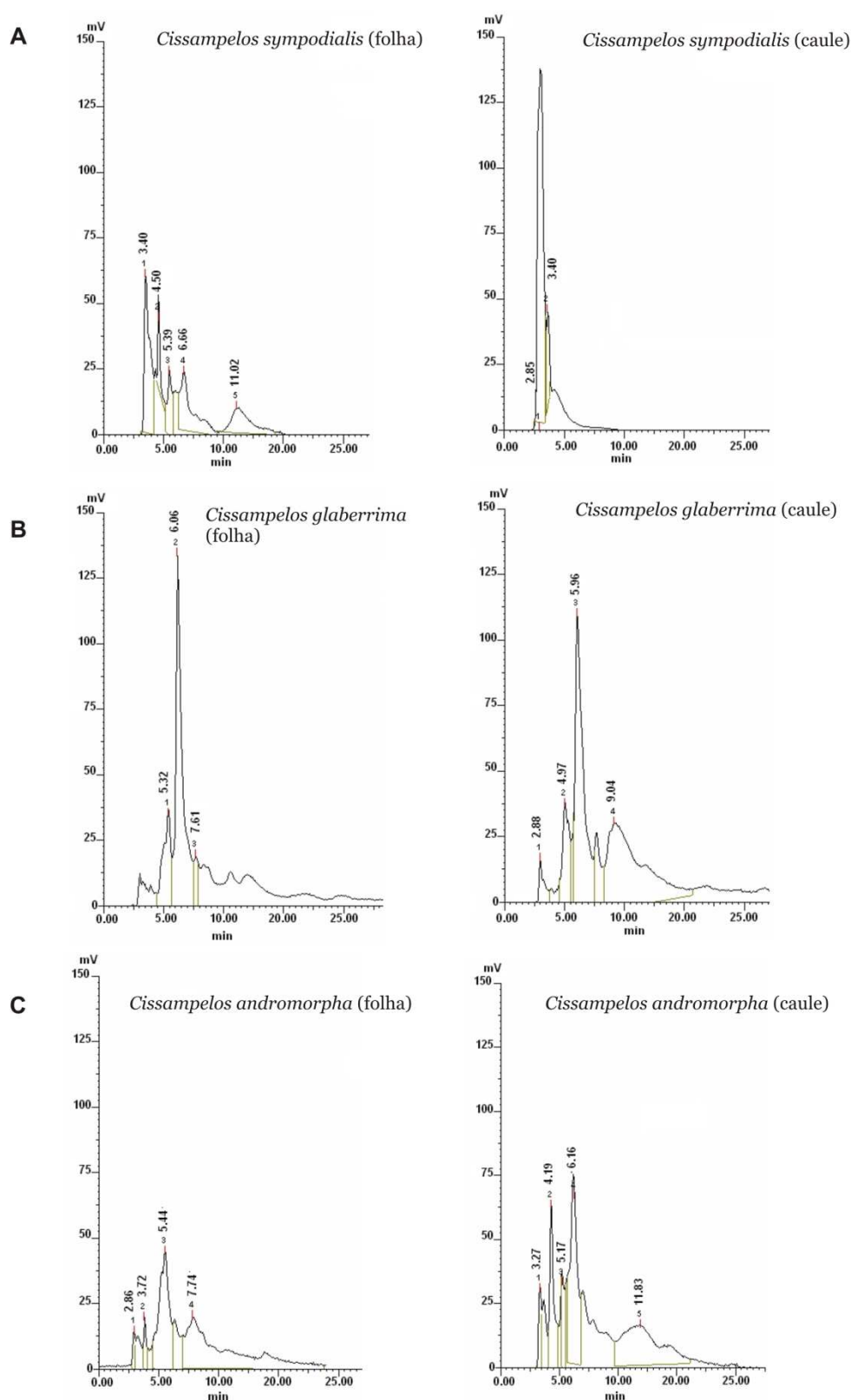


Legenda: Cromatograma (CLAE) do padrão warifteina (1,0 mg.mL⁻¹) em MeOH/H₂O/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), a λ 277nm. Número corresponde ao tempo de retenção.

Figura 23 Gráfico da linearidade da warifteina.



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

Figura 24 (A-C) Cromatogramas (CLAE) das espécies de *Cissampelos*.

Legenda: Cromatogramas (CLAE) das espécies de *Cissampelos* na concentração 1,0 mg.mL⁻¹, com fase móvel MeOH/H₂O/ácido acético (80:9,5:0,5 v/v), a λ 277 nm. Números correspondem ao tempo de retenção.

CONCLUSÕES

Os caracteres epidérmicos foliares apresentaram um papel importante na diagnose das espécies em estudo, oferecendo assim valiosas informações 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 como mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colaterais circundados por um anel esclerenquimático, exceto características tais como: 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 de *C. sympodialis*, *C. glaberrima* e *C. andromorpha*, com o estabelecimento das condições cromatográficas, permitiu caracterizar drogas vegetais obtidas 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 warifteina foi identificado apenas em *C. sympodialis* podendo ser utilizado como um marcador químico.

Palavras-Chave: 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, *Cissampelos ovalifolia* DC., is a shrub erect perennial. In Brazil, eight species are found, and five occur in the Northeast region. Of these, one specie *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.

Key Words: Menispermaceae, *Cissampelos*, plant anatomy, phytochemistry.

ANEXOS

Normas

ANEXO A

Microscopy Research and Technique

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley InterScience journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Copyright Transfer Agreement](#)
- [Permission Request Form](#)

Instructions To Authors

[Online Submission and Peer Review](#)

[Wiley's Journal Styles and EndNote](#)

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate. Microscopy Research and Technique is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/mrt>.

Authors are encouraged to check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, then create a new account. Once you have logged in, you will be presented with the Main Menu and a link to your Author Center. Enter your Author Center to submit your manuscript.

Submit manuscript and all figures as separate files. You do not need to mail any paper copies of your manuscript. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com.

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS CONSIDERED FOR PUBLICATION

In addition to Original Research Articles and Review Articles, *Microscopy Research and Technique* is now accepting submissions for its new rapid publication format, "MRT Letters."

1. Original Research Articles. An abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion sections are required. The literature review should be succinct. There are no restrictions on the number of pages or figures.

2. Review Articles in which a specific field is reviewed through an exhaustive literature survey. An abstract is required. A Materials and Methods section and a Results section are not required. There are

no restrictions on the number of pages or figures. Review articles are usually invited, but submitted review articles will be considered.

3. MRT Letters will be placed at the front of each issue and will be reserved for important results and breakthroughs in any area of microscopy that need to be published rapidly. These short papers, no longer than 3 typeset pages, will use the same structure as the longer original research articles. MRT Letters should be sent directly to an associate editor in your field to facilitate its review within a week. Authors submitting letters deemed unsuited for the MRT Letters section may be invited to submit a longer original research article.

All manuscripts, whether invited or regular submissions, are peer reviewed.

MANUSCRIPT PREPARATION

General Instructions.

The author needs to submit the names, addresses, and e-mail addresses of 5 scientists who can impartially review their manuscript.

Number all manuscript pages consecutively, beginning with the title page. The manuscript should have a uniform style and be submitted in the correct journal format, carefully proofed for grammar, spelling, and punctuation. It should consist of subdivisions in the following sequence.

1. Title page
2. Abstract
3. Text
4. Acknowledgments
5. References
6. Footnotes
7. Tables
8. Figure legends

Note: Start each subdivision on a new page.

Title Page. The first page of the manuscript should include:

- Title of paper
- Full name of author(s)
- Institutional affiliation and complete mailing address
- A running title not to exceed 45 letters and spaces
- Individual, address, and telephone number to whom correspondence concerning the manuscript should be sent

Key Words. Key words (not used in the title) should be included and should not exceed 85 characters and spaces.

Abstract. Submit an abstract of 250 words or less that will serve in lieu of a concluding summary. The abstract must be written in complete sentences and succinctly state the objectives, experimental design

of the paper, principal observations, and conclusions; and be intelligible without reference to the rest of the paper.

Text. The text should be presented in the following order: INTRODUCTION; MATERIALS AND METHODS; RESULTS; DISCUSSION.

References

Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote

EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style.

Download Reference Style for this Journal: If you already use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

How to Order: To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, go to www.interscience.wiley.com/jendnotes

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com , or visit www.endnote.com/support .

In the text, references to the literature should be made by author's name followed by year of publication arranged by alphabetical order first, then by year of publication:

... studies by Briggs (1975) reveal.

... earlier reports (Anderson and Stevens, 1977; Mahler, 1976; 1977).

When references are made to more than one paper by the same author, published in the same year, they are to be designated in the text as (Hinck et al., 1994a, b) and in the reference list as follows:

Hinck L, Nathke I, Papkoff J, Nelson W. 1994a. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 125:1327-1340.

Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J. 1994b. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol* 124: 729-741.

References are to be arranged alphabetically in the following style: Author's name (or names), year of publication, complete article title, abbreviated journal title, volume, and inclusive pages as follows:

Journal article

King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. 1998. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 390:537-551.

Book

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

Book chapter

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. 1998. Receptor fusion proteins and analysis. In: Receptor Localization. Ariano MA, editor. Wiley-Liss, New York, pp 75-90.

Footnotes. Number footnotes to the text with consecutive arabic numerals. The corresponding reference numbers must be clearly indicated in the text. Additional references to the identical footnote must be numbered with the next consecutive number; for example:

¹ Material used for this experiment was

² Provided by . . .

Type footnotes to a table directly beneath the table and number them 1, 2, 3, etc. They must not be numbered in sequence with text footnotes.

Tables. All tables must be cited in the text and have titles. Number them consecutively with arabic numerals. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Since tabular material is expensive to reproduce, it should be simple and uncomplicated, with as few vertical and horizontal rules as possible.

Digital Illustrations

Authors are encouraged to submit color illustrations when the color conveys essential scientific information. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. A charge of \$500.00 per page will be billed to the authors to cover the cost of print publication. One or more pages of complimentary color may be granted by the Editor.

Scaling, cropping, and rotating should be performed in the originating application. We recommend Adobe Photoshop for generating pixel-based graphics and either Adobe Illustrator or Macromedia's Freehand for generating vector-based graphics. Black and white (B/W) line art is either pixel based (typically generated by scanning the image) or vector based (generated using a drawing program such as Freehand or Illustrator). Pixel-based artwork should be supplied in TIFF format and at a resolution of not less than 1,000 dots per square inch (dpi). Vector-based artwork should be supplied as EPS files. B/W halftones should be supplied in TIFF format. The halftone should be provided at the proper resolution. The finished resolution should be at least 300 dpi. Color artwork should be provided as an EPS or TIFF file. Files should be converted from RGB to CMYK. The finished resolution should be at least 300 dpi. Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, ONG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to Rapid Inspector at <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zwi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

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://mobot.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 IC₅₀ ED₅₀, LD₅₀, 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"¹. 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>).

¹ 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.