

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UFVJM**

AVENTINO HUMBERTO FONSECA

**ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE ALCALOIDES
BISBENZILISOQUINOLÍNICOS DE *CISSAMPELOS SYMPODIALIS* COM
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

DIAMANTINA - MG

2019

AVENTINO HUMBERTO FONSECA

**ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE ALCALOIDES
BISBENZILISOQUINOLÍNICOS DE *CISSAMPELOS SYMPODIALIS* COM
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Biociências e Biotecnologia Aplicadas às Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Taízia Dutra Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

DIAMANTINA- MG

2019

F676i Fonseca, Aventino Humberto.
Isolamento biomonitorado de alcaloides
bisbenzilisoquinolínicos de *Cissampelos sympodialis* com
atividade antiviral / Aventino Humberto Fonseca, 2019.
81 p. : il.

Orientadora: Taízia Dutra Silva
Coorientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. *Cissampelos sympodialis*. 2. Vírus da Dengue. 3. Vírus
Zika. 4. Atividade antiviral. 5. Alcaloides
bisbenzilisoquinolínicos. I. Silva, Taízia Dutra. II. Oliveira,
Eduardo de Jesus. III. Título. IV. Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.3

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa – CRB6/2972

AVENTINO HUMBERTO FONSECA

**ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE ALCALOIDES
BISBENZILISOQUINOLÍNICOS DE *CISSAMPELOS SYMPDIALIS* COM
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRE
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

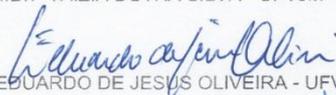
Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Taízia Dutra
Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo de
Jesus Oliveira

Data da aprovação : 30/08/2019



Prof.Dr.^a TAÍZIA DUTRA SILVA - UFVJM



Prof.Dr. EDUARDO DE JESUS OLIVEIRA - UFVJM



Prof.Dr. ALVARO DUTRA DE CARVALHO JUNIOR - UFVJM



Prof.Dr.^a KELLY CRISTINA KATO - UFVJM

DIAMANTINA

“A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade.”

Nikola Tesla

*"O mundo é um lugar perigoso de se viver,
não por causa daqueles que fazem o mal,
mas sim por causa daqueles que observam
e deixam o mal acontecer."*

Albert Einstein

Dedico esta conquista a DEUS, a minha mãe e aos meus oito irmãos, por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **DEUS**, obrigado Senhor pelo dom da vida, por seu amor sempre presente, por ter me guiado, iluminado e protegido durante estes dois anos de mestrado, sustentando-me nos momentos de dificuldade. Agradeço-te sempre, pois sem Ti nada disso seria possível.

Aos meus queridos pais, Fernando que já não está entre nós, Geralda pelo amor, incentivo e por não medir esforço para me ajudar. Aos meus irmãos Deco, Antônio Marcus, Fernando, Rejane, Kelly, Eliscatia, Tereza e Diunizio pelo carinho e preocupação. Eu não chegaria até aqui se não tivesse vocês, minha base!

Aos meus avós Tereza e Aventino pelas orações, por fornecer a moradia em Diamantina e pelas palavras de conforto.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Departamento de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por tudo que me permitiram viver durante este caminho.

A minha orientadora, Dra. Taízia Dutra Silva e a meu Co-orientador Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, pelos ensinamentos e atenção dada à minha orientação. Foram 2 anos de muito aprendizado e conhecimento.

Aos meus colegas de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e do laboratório.

A banca examinadora pela dedicação e contribuição neste trabalho. Muito obrigada!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado e fizeram parte dessa etapa da minha vida, o meu sincero obrigado.

RESUMO

Cissampelos sympodialis (Menispermaceae) é uma espécie popularmente conhecida como milona usada na medicina popular para o tratamento de várias condições, especialmente aquelas relacionadas a doenças respiratórias. Vários alcaloides bisbenzilisquinolínicos já foram anteriormente isolados desta espécie. Neste trabalho, foi utilizado um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa para obter subfrações da Fração de Alcaloides Terciários Totais (FATTrz) preparada a partir dos rizomas da espécie e para isolar warifteína a partir da FAT. Seis subfrações e a warifteína isolada foram testadas frente ao sorotipo II do Vírus da Dengue (DENV-2) e frente à cepa do vírus da Zika (ZIKV) circulante no Brasil. Foi utilizada uma linhagem de células epiteliais (Vero) para avaliar a citotoxicidade e selecionar concentrações a serem testadas das amostras contra DENV-2 e ZIKV. O efeito antiviral das amostras foi comparado ao do ribosídeo da 6-metilmercaptapurina (6MMP_r), um análogo nucleosídeo com atividade antiviral recentemente caracterizada. Todas as subfrações da FAT demonstraram um efeito antiviral contra DENV-2 e ZIKV, mas o pico cromatográfico 6 em particular demonstrou uma atividade antiviral promissora frente a DENV-2 com concentração inibitória (IC₅₀) de 3,3 µM e concentração citotóxica média (CC₅₀) de 35,44 µM, apresentando índice de seletividade (IS) de 10,74, enquanto a warifteína demonstrou potente efeito antiviral frente ao ZIKV, com uma IC₅₀ de 2,2 µM e CC₅₀ de 150,3 µM, com um IS de 68,3. O pico 6 foi posteriormente identificado como metilwarifteína.

Palavras-chave: *Cissampelos sympodialis*; Vírus da Dengue; Vírus Zika; Atividade antiviral; Alcaloides Bisbenzilisquinolínicos.

ABSTRACT

Cissampelos sympodialis (Menispermaceae) is popularly known as milona and is used in Brazil for the treatment of several diseases, mainly related to respiratory conditions. A number of bisbenzylisoquinoline alkaloids have been previously isolated from the species. In this work, preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to obtain subfractions of the tertiary alkaloid fraction (TAF) prepared from the rhizomes, and to isolate warifteine from TAF. Six TAF subfractions in addition to warifteine were tested against serotype II Dengue virus (DENV-2) and against the epidemic Zika virus (ZIKV) strain circulating in Brazil. We used an epithelial (Vero) cell line to evaluate the cytotoxicity and select concentrations to be tested of the samples against DENV and ZIKV. The antiviral effect of samples was compared to that of 6-methylmercaptapurine riboside (6MMP_r), a nucleoside analog with recently characterized antiviral activity. All TAF subfractions were active against DENV and ZIKV, but peak 6 in particular showed a promising antiviral effect against DENV with inhibitory concentration (IC₅₀) of 3.3 μM and a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of 35.44 μM, with a selectivity index (IS) of 10.74, while warifteine showed a marked antiviral effect against ZIKV, with an IC₅₀ of 2.2 μM and CC₅₀ of 150.3 μM, with a IS of 68.3. Peak 6 was later identified as methylwarifteine.

Keywords: *Cissampelos sympodialis*; Dengue virus; Zika virus; Antiviral activity; Bisbenzylisoquinoline alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos dos frutos e folhas da <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl, no horto do centro de biotecnologia	20
Figura 2: Face adaxial da folha (1) e face abaxial (2)	21
Figura 3: Estrutura viral madura (A-C) e imatura (D-E), característica dos flavivírus	28
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de replicação dos flavivírus	29
Figura 5: Prevalência do vírus da dengue no mundo	30
Figura 6: Prova do laço para determinação de fragilidade capilar	31
Figura 7: Erupção cutânea em um paciente com infecção por zika	33
Figura 8: Fluxograma representativo da obtenção da FATTrz	46
Figura 9: Cromatograma representativo da separação por CLAE preparativa da FATTrz	47
Figura 10: Foto da estação de extração em fase sólida de fase reversa utilizada neste trabalho	48
Figura 11: Amostras, recuperadas por meio de EFS, referentes aos picos cromatográficos subfração 1-6, esquerda -direita.	49
Figura 12: Imagem ilustrativa do rotaevaporador utilizado neste trabalho	49
Figura 13: Amostras secas referente aos 6 picos (subfrações) cromatográfico	50
Figuras 14: Cromatograma referente ao pico 1 previamente isolado por CLAE-prep.	51
Figura 15: Cromatograma referente ao pico 2 previamente isolado por CLAE-prep.	51
Figura 15.1: Eluição isocrática recromatografia pico 2	52
Figura 16: Cromatograma referente ao pico 3 previamente isolado por CLAE-prep.	52
Figura 17: Cromatograma referente ao pico 4 previamente isolado por CLAE-prep.	53
	10

Figura 18: Cromatograma referente ao pico 5 previamente isolado por CLAE-prep.	53
Figura 19: Cromatograma referente ao pico 6 previamente isolado por CLAE-prep.	53
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H da subfração 5	54
Figura 21: Estrutura química da warifteína	55
Figura 22: Espectro de RMN de ¹ H da subfração 6	56
Figura 23: Estrutura química da metilwarifteína	57
Figura 24: Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com compostos isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> extrato bruto, FATTrz	60
Figura 25: Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com as subfrações 1-6 isoladas da FATTrz	60
Figura 26: Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da FATTrz	61
Figura 27: Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com diferentes concentrações da subfração 6 (metilwarifteína) isolada da FATTrz	62
Figura 28: Análise da redução do título viral da ZKV após o tratamento com amostras obtidas da <i>Cissampelos sympodialis</i> : extrato bruto, FATTrz	63
Figura 29: Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com os picos (subfrações) 1-6 isolados da Milona	64
Figura 30: Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com alcaloide warifteína isolado da FATTrz	65
Figura 31: Redução do efeito citopático característico do vírus da DENV-2 após tratamento com a subfração 6 (metilwarifteína) isolada da FATTrz	67
Figura 32: Redução do efeito citopático característico do vírus da DENV-2 após tratamento com warifteína isolada da FATTrz	68

Figura 33: Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após o tratamento com a warifteína isolada da FATTrz

69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica da <i>Cissampelos sympodialis</i>	21
Tabela 2: Principais alcaloides isolados da <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl com atividades biológicas relatadas	23
Tabela 3: Comparação entre os dados de RMN de ^1H da warifteína obtidos na literatura com aqueles da subfração 5	55
Tabela 4: Comparação entre os dados de RMN de ^1H da metilwarifteína obtidos na literatura com aqueles da subfração 6	57
Tabela 5: Dados de citotoxicidade do extrato bruto, FATTrz e subfrações, relacionado a 50% e 80% de viabilidade celular conforme determinado pelo ensaio MTT em células Vero	59
Tabela 6: Valores de IC_{50} e IS para warifteína e para subfração 6 frente a infecção de células Vero por DENV-2	63
Tabela 7: Valores de IC_{50} e IS para warifteína frente a infecção de células Vero com ZKV	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6MMPr - 6-methylmercaptapurine riboside (ribosídeo de 6-metilmercaptapurina).

CC₂₀ – Concentração do composto relacionado a 80% de viabilidade celular.

CC₅₀ – Concentração citotóxica média (concentração da substância que resulta em 50% de viabilidade celular).

CLAE-prep – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa.

CMNT – Concentração máxima não tóxica.

DENV – Vírus da Dengue.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DO – Densidade óptica.

EC₅₀ – Concentração efetiva média (concentração que resulta em 50% do efeito).

ECP – Efeito citopático.

EEBrz – Extrato etanólico bruto dos rizomas.

EETOH – Extrato etanólico.

EFS – Extração em fase sólida.

FATTrz – Fração de Alcaloides Terciários totais dos rizomas de *Cissampelos sympodialis*

GP 160 – Glicoproteína 160.

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida.

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

HSV-1 – Vírus da Herpes Simplex tipo 1.

IC₅₀ - Concentração inibitória média.

IS – Índice de seletividade.

MOI – Multiplicidade de infecção.

MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol, 2-il)-2,5-difeniltetrazólio].

m-WAR – metil-warifteína

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate buffered saline (Salina tamponada com fosfato)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

ROT – Rota-evaporador

SVS – Secretaria de vigilância e saúde

TCID₅₀ – 50% Tissue Culture Infective Dose (Dose Infectiva Média em Cultura de Tecido)

VZV – Zostervírus

WAR – Warifteína

ZKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. <i>Cissampelos sympodialis</i>	20
2.1.1. Alcalóides de <i>C. sympodialis</i> e atividades biológicas.....	21
2.2. Vírus da Dengue e Zika	27
2.2.1. Vírus da Dengue.....	30
2.2.2. Vírus da Zika.....	32
2.3. Atividade antiviral de alcaloides bisbenzilisquinolínicos e extratos de espécies do gênero <i>Cissampelos</i>	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Substâncias e reagentes.....	37
4.2. Material Vegetal	37
4.2.1. Obtenção dos alcaloides bisbenzilisquinolínicos das raízes de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl	37
4.2.2. Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes da planta	37
4.2.3. Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl	38
4.2.4. Isolamento de alcaloides bisbenzilisquinolínicos de <i>C. sympodialis</i> Eichl. por Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-prep).....	38
4.2.5. Concentração em fase Sólida	39
4.2.6. Análise das amostras coletadas do isolamento CLAE-prep.....	39
4.2.7. Repurificação das amostras analisadas	40
4.2.8. Caracterização das amostras.....	40
4.3. Ensaio de Citotoxicidade e Ensaio Antivirais	40
4.3.1. Células e Vírus	40
4.3.2. Ensaio de Citotoxicidade	41
4.3.3. Screening Antiviral	42
4.3.4. Avaliação da Atividade Antiviral.....	43

4.4. Análise Estatística.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. <i>Cissampelos sympodialis</i> processo de obtenção da FATTrz.....	45
5.2. Separação da FATTrz via CLAE-prep	46
5.3. Concentração em Fase Sólida	47
5.4. Secagem das amostras.....	49
5.5. Análise das amostras via CLAE	50
5.6. Caracterização via RMN.....	54
6. Ensaios Biológicos.....	58
6.1. Ensaios de citotoxicidade.....	58
6.2. Análise da Atividade Antiviral (Redução do Título Viral).....	59
6.2.1. Análise da Redução do Título Viral Frente ao DENV-2	59
6.2.2. Análise da Redução do Título Viral Frente ao ZKV	63
6.3. Análise de Redução do Efeito Citopático	65
6.3.1. Análise de Redução do Efeito Citopático Promovido por DENV-2.....	65
6.3.2. Análise de Redução do Efeito Citopático Promovido por ZKV	68
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Cissampelos sympodialis Eichl é uma angiosperma eudicotiledônea da família Menispermaceae endêmica no Brasil, presente nas regiões nordeste e sudeste, desde o estado de Ceará até o estado de Minas Gerais, conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha de onça” e “abuteira”. Possui seu habitat em áreas abertas de solo argiloso. Suas folhas e raízes são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças do trato respiratório, reumatismos e artrite (Barbosa-Filho *et al.*, 1997; Agra *et al.*, 2007).

Do ponto de vista químico, a *Cissampelos sympodialis* possui vários alcaloides isoquinolínicos já isolados, dentre eles, destacam-se a milonina (De Freitas *et al.*, 1995), warifteína (De F. Cörtes *et al.*, 1995), metilwarifteína e laurifolina (Barbosa-Filho *et al.*, 1997), liriodenina e roraimina (De Lira *et al.*, 2002). Alguns destes alcaloides possuem importantes atividades farmacológicas, com vários estudos realizados, como ação espasmolítica e efeito citotóxico, atribuídas a warifteína e a milonina (De Freitas *et al.*, 1996; Melo *et al.*, 2003), anti-anafilática (Thomas *et al.*, 1997), anti-inflamatória (Lima *et al.*, 2001). Esta última relacionada a diminuição da função de macrófagos (Alexandre-Moreira *et al.*, 2003) e na inibição da migração de neutrófilos (Lima *et al.*, 2014). Apesar destas variadas atividades farmacológicas o grande foco no estudo desta espécie tem sido a sua ação no tratamento de asma em vários modelos experimentais desta patologia (Alexandre-Moreira *et al.*, 2003; Cerqueira-Lima *et al.*, 2010; Bezerra-Santos *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2013).

Apesar do foco das pesquisas terem até o momento se concentrado no efeito imunomodulador e anti-asma da espécie e de seus constituintes, vários alcaloides isoquinolínicos e, especialmente, bisbenzilisoquinolínicos têm demonstrado importante efeito antimicrobiano e efeito antiviral. Podemos destacar o efeito sobre o vírus HIV-1 da fangchinolina (Wan *et al.*, 2012), o efeito sobre o vírus herpes simplex (HSV-1) de 13 alcaloides bisbenzilisoquinolínicos isolados de *Staphania sepharantha* (Nawawi *et al.*, 1999), o efeito sobre o vírus Influenza do alcaloide bisbenzilisoquinolínico isotetrandrina isolado da *Mahonia bealei* (Zeng *et al.*, 2006).

Mais recentemente, espécies do gênero *Cissampelos* com atividade antiviral foram identificadas, incluindo a *Cissampelos pareira*, com atividade para os quatro sorotipos da dengue (Sood *et al.*, 2015) e a própria *Cissampelos sympodialis*, cujo extrato aquoso das folhas apresentou atividade contra Dengue tipo 2 (Leite *et al.*, 2016).

Essa variedade de atividades biológicas e, principalmente, o potencial antiviral dos alcaloides bisbenzilisoquinolínicos ressalta a importância de se investigar e buscar substâncias com atividade antiviral na fração de alcaloides das raízes da espécie *Cissampelos sympodialis*. Desta forma, neste trabalho a fração de alcaloides terciários totais dos rizomas (FATTrz) desta espécie foi isolada e separada em subfrações por meio da técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-prep) e as mesmas foram submetidas a testes de atividade antiviral frente aos vírus dengue subtipo 2 (DENV-2) e Zika vírus (ZKV).

A escolha dos vírus da Dengue e Zika se justifica pela relevância destas arboviroses para a saúde humana, ambas transmitidas pelo mesmo vetor, *Aedes aegypti* que possui sua ocorrência em países de climas tropicais e subtropicais, além de serem doenças negligenciadas e graves. O vírus DENV possui quatro sorotipos e representa um grande problema de saúde pública, com um efeito social e econômico substancial, especialmente em um país da extensão geográfica do Brasil, com elevado número de casos e elevada morbimortalidade (Guzman e Harris, 2015). Já as infecções por ZKV têm sido associadas ao aborto espontâneo, microcefalia congênita via transmissão materno-fetal, uma condição congênita cerebral potencialmente fatal e a distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barre (Aziz *et al.*, 2017). Nenhuma destas condições possui tratamento antiviral definitivo eficaz até o presente momento.

Portanto, a execução do estudo está inserida dentro da necessidade de se buscar alternativas ou futuras possibilidades de tratamento para essas doenças ditas negligenciadas, visto que ocorrem em regiões de clima tropical e subtropical, locais mais propícios à adaptação do vetor e, comumente em países ditos em desenvolvimento, os quais são desprovidos do interesse de investimento por parte das indústrias farmacêuticas devido ao reduzido potencial de retorno lucrativo para as mesmas (Decit, 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Cissampelos sympodialis*

A *C. sympodialis* é uma planta que apresenta seu habitat nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, do Ceará a Minas Gerais. É uma trepadeira frequentemente encontrada em áreas abertas como subarbustos em solo argiloso, mede de 80 – 100 cm de comprimento, apresenta seus frutos na cor vermelho alaranjado quando maduro (Figura 1) e medindo cerca de 1,0 – 1,5 cm de diâmetro (Eichler, 1887).



Figura 1. Fotos dos frutos e folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl., no horto do Centro de Biotecnologia (UFPB).

A espécie apresenta folhas alternas, pecioladas, peltadas, com lâmina medindo aproximadamente 2,0 – 6,0 x 1,5 – 6,5 cm (Figura 2), possuindo a forma oval ou deltoide, com suas faces adaxial e abaxial entre verde brilhante escuro e verde claro opaco, apresentando entre 7 – 11 nervuras (Agra *et al.*, 2008).

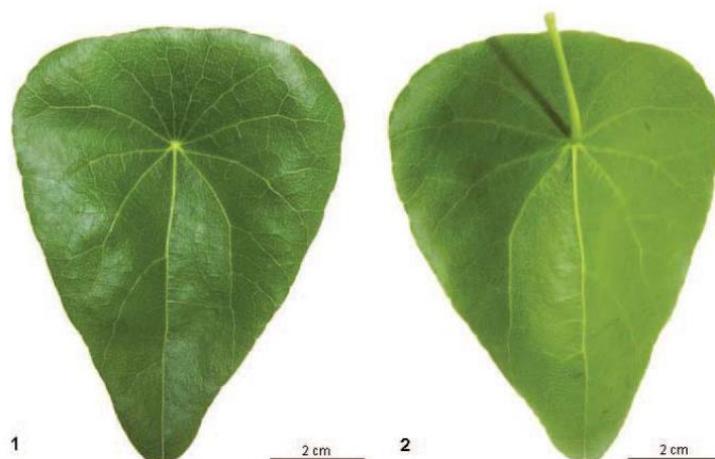


Figura 2. Face adaxial da folha (1) e face abaxial (2).(Agra *et al.*, 2008)

O gênero *Cissampelos* está compreendido entre 19 espécies, das quais 9 são recorrentes no Brasil, sendo três espécies predominantes na Paraíba: *C. sympodialis*, *C. glaberrima* e *C. ovalifolia* e, segundo Barbosa-Filho e colaboradores (1997), as duas primeiras são as mais estudadas devido a maior disponibilidade (Barbosa-Filho *et al.*, 1997). A espécie *C. sympodialis* apresenta a seguinte organização taxonômica (Tabela 1):

Tabela 1. Classificação taxonômica da *Cissampelos sympodialis*.

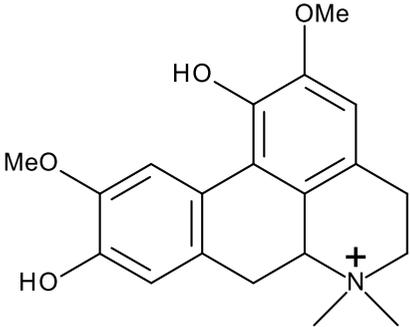
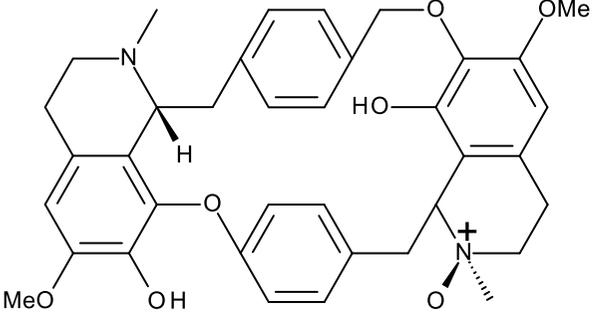
REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUB - CLASSE	Magnoliidae
ORDEM	Ranunculales
FAMÍLIA	Menispermaceae
GÊNERO	<i>Cissampelos</i>
ESPÉCIE	<i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl

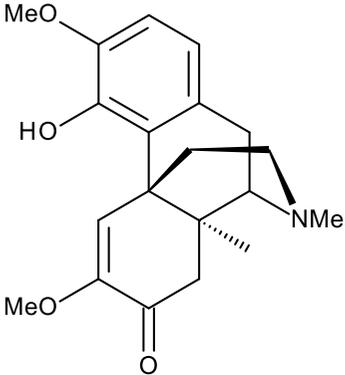
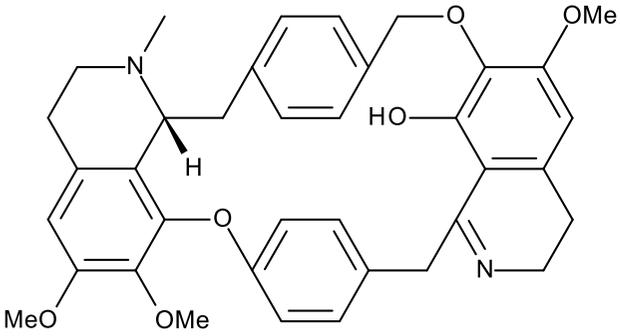
2.1.1. Alcalóides de *C. sympodialis* e atividades biológicas

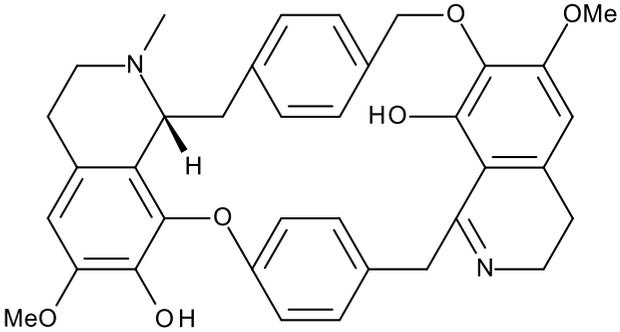
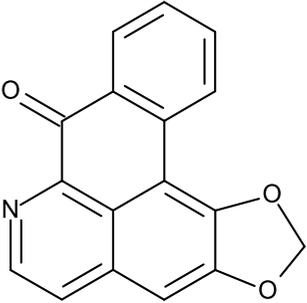
Dentre os estudos já realizados com a *C. sympodialis*, vários alcalóides foram isolados, principalmente dos rizomas e das folhas. Destes, merecem destaque aqueles derivados do núcleo isoquinolínico, entre eles os bisbenzisoquinolínicos, warifteína (WAR) e metilwarifteína (m-WAR) (Alencar, 1994; Cortes *et al.*, 1995; De Freitas *et al.*, 1996; Barbosa-Filho

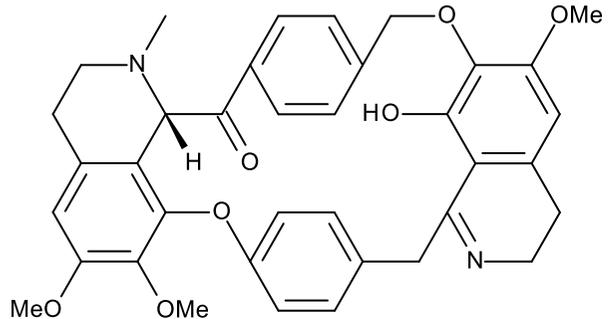
et al., 1997). Nas folhas encontramos um alcaloide de núcleo incomum para Menispermaceae, o morfinâmico milonina (De Freitas *et al.*, 1996), o benzilisoquinolínico, coclaurina (De Lira *et al.*, 2002), e nos rizomas, os bisbenzilisoquinolínicos simpodialina β -N-óxido (Alencar, 1994), roraimina (De Lira *et al.*, 2002) e os epímeros des-7'-metilroraimina e epi-des-7'-O-metilroraimina (Marinho *et al.*, 2013), além dos aporfínicos, laurifolina (Alencar, 1994) e liriodenina (De Lira *et al.*, 2002). Destes alcaloides o que ocorre em maior concentração (cerca de 1% do peso do extrato etanólico bruto dos rizomas) é a WAR (Barbosa-Filho *et al.*, 1997). Na Tabela 2 está descrito um resumo das principais atividades biológicas relacionadas aos alcaloides já isolados da espécie, suas estruturas e as referências bibliográficas relacionadas mais importantes.

Tabela 2. Principais alcaloides isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl com atividades biológicas relatadas.

Alcaloide/Estrutura química	Atividade biológica	Parte da planta
 <p>Laurifolina (Alencar, 1994)</p>	<p>Pode atuar como agente antiretroviral promissor uma vez que inibiu consideravelmente o vírus da transcriptase reversa de mieloblastose em aves (Jucá, 1998)</p>	<p>Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.</p>
 <p>Simpodialina-β-N-óxido (Alencar, 1994)</p>	<p>Não relatada</p>	<p>Presente nos rizomas da <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl</p>

 <p>Milonina (De Freitas <i>et al.</i>, 1995)</p>	<ul style="list-style-type: none"> . Efeito hipotensor e vasorelaxante em ratos normotensos (Cavalcante <i>et al.</i>, 2011). . Efeito espasmolítico (De Freitas <i>et al.</i>, 1996; Melo <i>et al.</i>, 2003). . Efeito citotóxico em cultura de hepatócitos e fibroblastos V79 (Melo <i>et al.</i>, 2003) . Pode contribuir para os efeitos antialérgicos do extrato de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (Bezerra-Santos <i>et al.</i>, 2012) 	<p>Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.</p>
 <p>Metil-warifteína (Barbosa-Filho <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Mostrou atividade inibitória significativa e reprodutível contra células de carcinoma em cultura de células da nasofaringe (Kupchan e Fujita, 1965; Cortes <i>et al.</i>, 1995)</p>	<p>Presente nas folhas e rizomas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl</p>

 <p>Warifteína (Barbosa-Filho <i>et al.</i>, 1997)</p>	<ul style="list-style-type: none"> . Mostrou atividade espasmolítica, efeito relaxante tanto tecido de músculo liso vascular quanto no não vascular (Cortes <i>et al.</i>, 1995; De Freitas <i>et al.</i>, 1996; Melo <i>et al.</i>, 2003). . Apresentou citotoxicidade em linhagem de fibroblastos (V79); inibição da degranulação de mastócitos e da liberação de histamina (Melo <i>et al.</i>, 2003). . Ação anti-alérgica (Bezerra-Santos <i>et al.</i>, 2006) . Inibe seletivamente a atividade de AMPc fosfodiesterase (Thomas <i>et al.</i>, 1997). . Induz o relaxamento muscular pela inibição de canais de cálcio e modificação dos estoques intracelulares de cálcio sensíveis a noradrenalina (De Freitas, 1994; Cortes <i>et al.</i>, 1995). 	<p>Presentes nas folhas e rizomas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl</p>
 <p>Liriodenina (De Lira <i>et al.</i>, 2002)</p>	<ul style="list-style-type: none"> . Várias atividades farmacológicas, como antitumoral, antibacteriana, antifúngica e trypanocida, bem como anti-Alzheimer (Liu <i>et al.</i>, 2010). . Atividade larvicida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Feitosa, 2009). 	<p>Presente nas folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl</p>

 <p>Roraimina (De Lira <i>et al.</i>, 2002)</p>	<p>Pode contribuir para os efeitos anti-alérgicos do extrato de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl (Bezerra-Santos <i>et al.</i>, 2012).</p>	<p>Presente nos rizomas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl</p>
--	--	---

2.2. Vírus da Dengue e Zika

Os vírus da Dengue e Zika são vírus da família flaviviridae e possuem o RNA como ácido nucleico. São ambos exemplos de arbovírus, que é um termo usado para os vírus que se transmitem aos homens através de insetos (mosquito) infectados. Apresentam muitas barreiras para acumular mutações como consequência da dupla replicação, tanto em hospedeiros mamíferos como invertebrados, conduzindo assim a uma fixação relativamente lenta de mutações (Ribeiro *et al.*, 2017).

A preferência de infecção por parte dos flavivírus é por tropismo tecidual, tendo sua forma de contágio preferencialmente em células ou tecidos específicos, assim categorizando o seu padrão de infecção (Boldescu *et al.*, 2017). Para o vírus da Zika, por exemplo, há um tropismo relativo para células do tecido neural, ocular, testicular e placentário (Shaily e Upadhy, 2019). Desta forma, este vírus pode causar numerosas patologias neurológicas, podendo ocasionar convulsões, mielite, encefalite e em casos mais graves dano cerebral permanente e paralisia (Selvey *et al.*, 2016; Boldescu *et al.*, 2017). Por outro lado, a DENV não se enquadra como uma infecção neurotrópica, pois a sua viabilidade se dá devido a interação com receptores de superfície celular (Acosta *et al.*, 2009).

A proliferação viral na célula hospedeira ocorre com processamento do genoma em proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (Proteína C); a proteína de membrana (Proteína M) que se origina a partir de uma proteína pré-membrana (prM); a glicoproteína do envelope (Proteína E) e sete proteínas não estruturais (Rice *et al.*, 1985). O ciclo de replicação viral ocorre inicialmente com a formação de partículas virais imaturas, formadas pelo complexo de proteína pré-membrana e da proteína do envelope e nesse complexo ocorrem alterações que permitem que as partículas amadureçam, ou seja, que levem à montagem completa do vírion conferindo-lhe então a capacidade infectiva.

E os vírus DENV e ZKV apresentando homologia proteica entre 45 e 55% com características estruturais essenciais incluindo o envelope (E) até o próprio capsídeo (C) bem como também o precursor de membrana (prM). Contudo as infecções causadas por esses vírus induz anticorpos contra essas proteínas bem como também contra proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5, conseqüentemente sendo observado reatividade imunológica considerável entre esses vírus, portanto existindo sim técnica sorológica para diagnóstico como por exemplo a ELISA (Zaidi *et al.*, 2019)

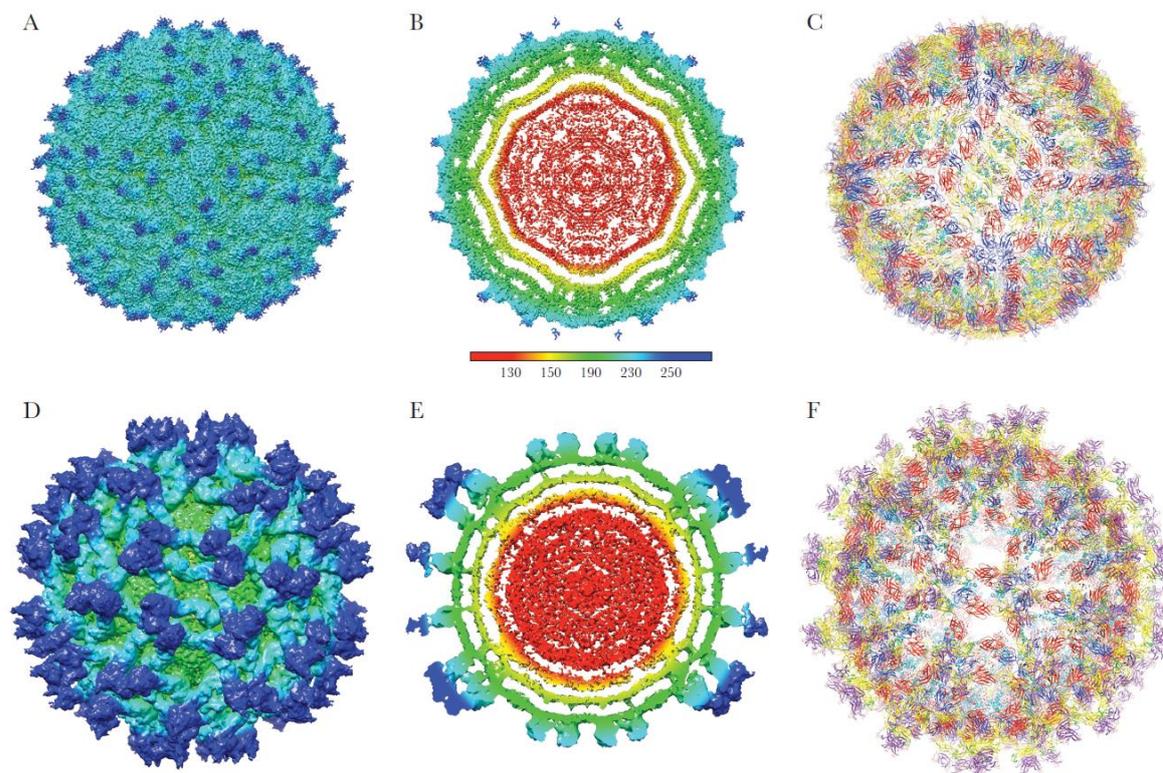


Figura 3. Estrutura viral madura (A-C) e imatura (D-E), característica dos flavivírus. FONTE (Sirohi e Kuhn, 2017)

A estrutura da partícula viral dos flavivírus é exemplificada pelo esquema mostrado na Figura 3, a qual apresenta partículas virais imaturas (D-F) e partículas virais maduras (A-C), conforme evidenciado por estudos de cristalografia de raios-X (Sirohi e Kuhn, 2017). A partícula viral madura do vírus Zika possui 50 nm de diâmetro e 180 cópias das proteínas E e M inseridas na membrana viral. A Figura 3 apresenta também as partículas virais em sessão transversal (B e E). Nas apresentações C e F destacam-se a geometria icosaédrica da partícula viral e as cores representam diferentes proteínas do capsídeo e envelopes virais.

A entrada do flavivírus no meio intracelular (Figura 4) ocorre através de endocitose intermediada pela proteína clatrina que é produzida pela célula eucarionte como mecanismo de defesa através do processo digestivo exercido pelos lisossomos. Nesse processo ocorre uma mudança de pH que irá favorecer o rearranjo entre o envelope viral e a membrana endossômica, promovendo a liberação do genoma viral RNA no citoplasma, que irá a partir daí, completar o seu ciclo através do domínio metabólico da célula eucarionte, utilizando de seu maquinário

energético e material para montagem de suas cópias, completando assim seu ciclo lisogênico ou lítico (Botting e Kuhn, 2012; Hu e Sun, 2019).

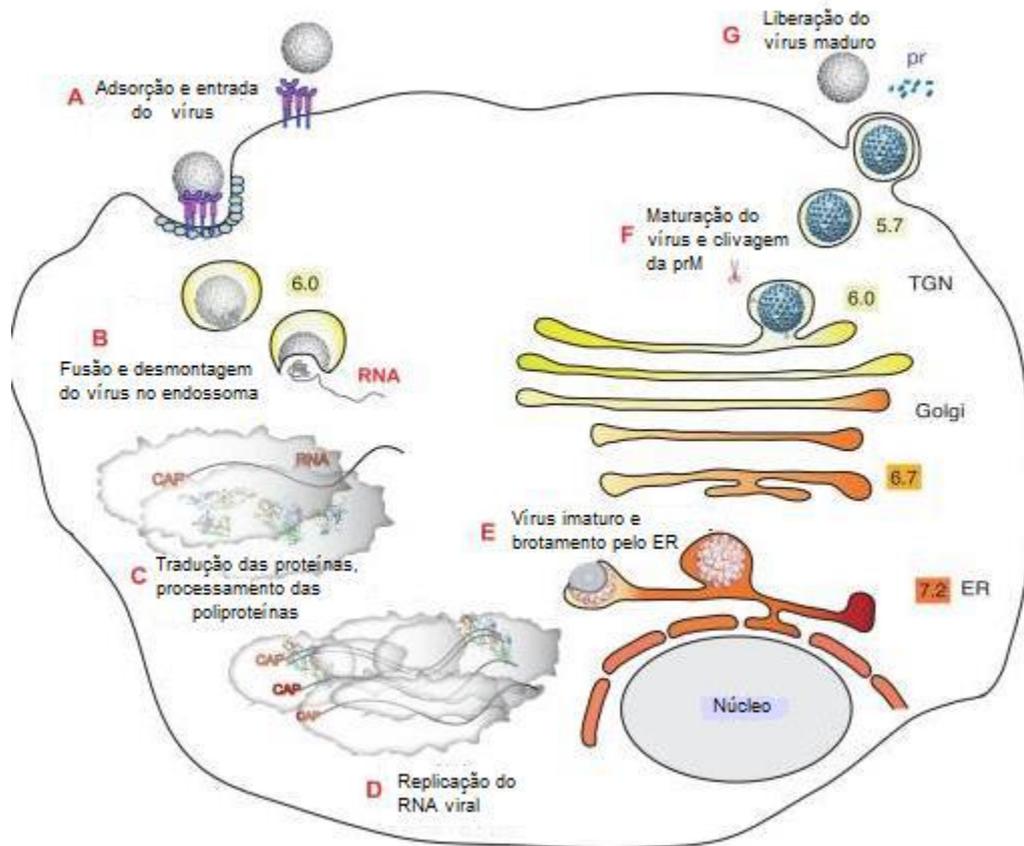


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de replicação dos flavivírus. **A.** Os virions se ligam as moléculas e receptores de superfície celular e são internalizados por endocitose. **B.** A acidificação do endossoma, permite a desmontagem do vírus, liberando o RNA no citoplasma. **C.** O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. **D.** As proteínas não estruturais replicam o RNA do genoma. **E.** A montagem do vírus ocorre na membrana do retículo endoplasmático (ER), sendo a proteína do capsídeo e o RNA viral envolvidos pela membrana do ER e glicoproteínas para formar partículas imaturas do vírus. **F.** As partículas virais imaturas são transportadas para o aparelho de Golgi. No pH baixo do trans-Golgi, ocorre a maturação do vírus, através da clivagem mediada por furina da prM a M. **G.** O vírus é liberado do citoplasma. FONTE ADAPTADA: (Hu e Sun, 2019)

2.2.1. Vírus da Dengue

O Vírus da Dengue foi isolado pela primeira vez no Havai em 1944 (*Sukhralia et al., 2019*) e no final do século 20 e início do século 21 ocorreu uma rápida difusão espacial com um aumento geográfico de seus vetores pertencentes ao gênero *Aedes*. Isso devido ao fato do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* não terem passado por métodos efetivos de controle e também pela falta de vacinas ou tratamentos antivirais (*Barrrows et al., 2018*).

O DENV atualmente circula em regiões tropicais e subtropicais em todo mundo (Figura 5), tendo como seu principal vetor o *A. aegypti* e como vetor secundário, o *A. albopictus*. É relatada a existência de quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 com manifestações clínicas semelhantes e presentes em países tropicais e subtropicais da Terra (*Acosta et al., 2008*).

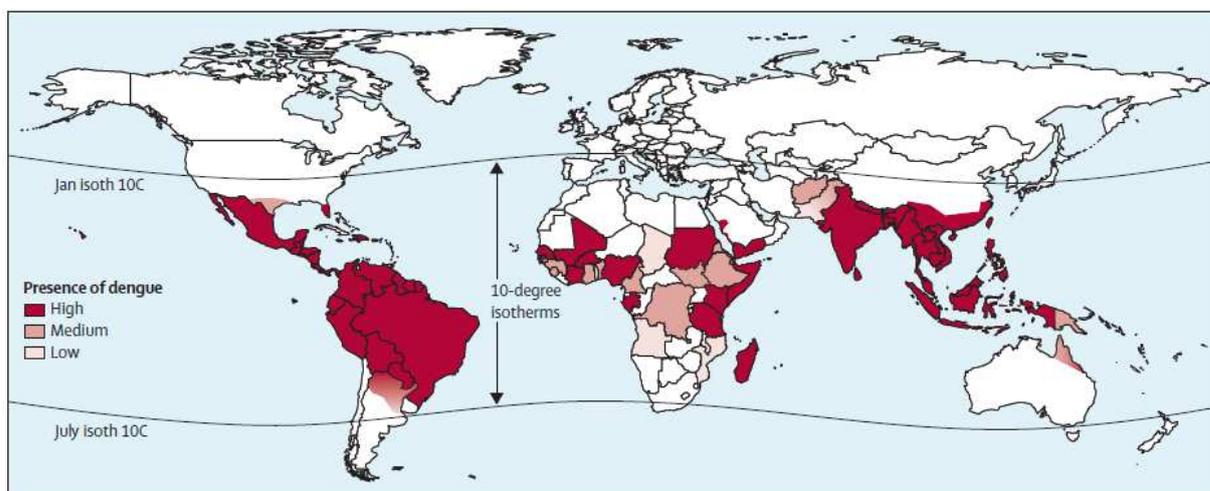


Figura 5. Prevalência do vírus da Dengue no mundo. FONTE ADAPTADA: (*Guzman e Harris, 2015*).

Dos seus quatro sorotipos, o DENV-2 é considerado o sorotipo mais virulento. Além da forma de transmissão mais comum através do inseto vetor, o vírus pode também ser transmitido verticalmente na gravidez e via transfusão sanguínea (*Patterson et al., 2016b*). É uma das doenças mais infecciosas e mais frequentes do Brasil e um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Segundo estimativa da OMS, cerca de 80 milhões de pessoas são infectadas anualmente, com cerca de 550 mil hospitalizações e 20 mil óbitos (*Costa et al., 2011*).

Indivíduos infectados pela DENV apresentam disponibilidade de transmissão por volta de 4 a 5 dias chegando num tempo máximo de 12 dias, enquanto que no caso dos pacientes acometidos pelo Zika vírus, a transmissão ocorre no máximo por 5 dias (Prevention., 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a gama de desfechos clínicos causados pela infecção por DENV em: casos assintomáticos (dengue sem sinais de alarme) e casos sintomáticos, com alguns sinais de alarme. Os sinais de alarme incluem petéquias, sangramento gengival, dor abdominal intensa e contínua e hipotermia. A dengue com sinais de alarme pode evoluir para uma doença com distúrbios hemodinâmicos importantes resultando em febre hemorrágica, choque hipovolêmico e morte. Recentemente, uma vacina atenuada nomeada Dengvaxia–Sanofi Pasteur foi licenciada para prevenção da doença, porém a mesma ainda não está amplamente distribuída para a população (Coudeville *et al.*, 2016). A vacina desenvolvida confere proteção cruzada aos quatro sorotipos da DENV (García *et al.*, 2017).

A Figura 6 ilustra um teste diagnóstico simples e muito utilizado para identificar o subgrupo de pacientes com diagnóstico clínico de Dengue que possuem maior risco de evolução para a forma hemorrágica grave da doença. O teste consiste em insuflar o manguito do esfigmomanômetro no braço do paciente, manter uma pressão sustentada como um torniquete, enquanto observa-se a formação de petéquias em uma área de 2,5 cm² no antebraço do paciente. O teste do laço é considerado positivo quando mais de 20 petéquias são assim observadas (Patterson *et al.*, 2016b).



Figura 6. Prova do laço para determinação de fragilidade capilar. Fonte: (Patterson *et al.*, 2016b).

Embora o teste do laço não possua sensibilidade e especificidade para diferenciar a Dengue de outras condições, o mesmo serve para se implementar tratamento e monitoramento mais cuidadoso.

Por enquanto, o combate mais eficaz na prevenção dessa e outras arboviroses é o combate ao mosquito transmissor. Porém, o controle e erradicação da Dengue através do combate ao vetor tem se tornado cada vez mais difícil devido ao seu crescimento nas áreas urbanas e também ao grande aumento nas viagens domésticas e internacionais, dentre outros fatores (Gould *et al.*, 2017).

2.2.2. Vírus da Zika

O vírus da Zika é um flavivírus que está intimamente relacionado estruturalmente com o da Dengue, tendo o seu primeiro isolamento em um macaco na floresta Kiika, na Uganda, em 1947. O vírus foi, durante muito tempo, reconhecido por causar apenas uma infecção assintomática ou uma febre leve em humanos. Por esta razão e por causar pouca preocupação a medicina, foi esquecido por décadas. Antes de se emergir para o hemisfério ocidental, em março de 2015, a Zika era relativamente desconhecida, fora em pequenos surtos na África e sudeste da Ásia, quando ocorreu um grande surto, no qual cerca de 73% da população de uma pequena ilha do pacífico Yape foi acometida pelo Zika, de acordo com dados sorológicos (Patterson *et al.*, 2016b). Entretanto, entre 2007-2016 o vírus se espalhou do oriente para o ocidente, cruzando o Pacífico, resultando na epidemia de 2015-2016 nas Américas. Durante esta epidemia, a correlação entre exposição ao vírus Zika e casos de microcefalia congênita recebeu significativa atenção da mídia e, então, a partir de fevereiro de 2016, a infecção por este vírus foi declarada oficialmente pela OMS, como uma preocupação emergente de grande importância para a saúde pública internacional (Aziz *et al.*, 2017).

O vírus da Zika é transmitido pela picada do mesmo vetor da Dengue, o *Aedes aegypti*, embora alguns estudos realizados no Brasil indicam que o Zika também pode ser transmitido pelo mosquito *Culex quinquefasciatus* (Guedes *et al.*, 2017). Apesar do mecanismo primário de transmissão ser através do mosquito infectado, há casos no Brasil de transmissão entre parceiros possivelmente durante o estágio de viremia e infecções relacionadas a transfusão. O vírus também foi isolada na urina, saliva e leite materno de indivíduos infectados, embora nenhuma

dessas fontes tenham sido relatadas como meios transmissores potenciais até a data (Patterson *et al.*, 2016b).

O processo de viremia pode se desenvolver como uma doença rápida com sintomas de febre, conjuntivite não purulenta, erupção cutânea maculopapular que se caracteriza por pequenas manchas projetadas na pele (Figura 7), artrite, cefaleia e vômitos (Patterson *et al.*, 2016b).



Figura 7. Erupção cutânea em um paciente com infecção por Zika. FONTE: (Patterson *et al.*, 2016a)

O desenvolvimento de terapias antivirais e a criação de vacinas contra o Zika são pontos importantes para o controle da infecção, principalmente entre os grupos de maior risco como mulheres grávidas (Fernandez e Diamond, 2017). A forma mais comum de tratamento acompanha a forma atual indicada para a Dengue a qual consiste em repouso prolongado, ingestão de muito líquido (soro reidratante) e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) para alívio da dor e febre, exceto o ácido acetilsalicílico e outros com efeito sobre a agregação plaquetária, sendo o mais indicado o paracetamol (Aziz *et al.*, 2017).

2.3. Atividade antiviral de alcaloides bisbenzilisquinolinicos e extratos da família Menispermaceae e das espécies do gênero *Cissampelos*

Devido a necessidade por tratamentos alternativos ou de formas para atenuar o sofrimento diante de doenças negligenciadas, países em desenvolvimento têm buscado substâncias bioativas a partir de plantas medicinais. É o que se observa na medicina tradicional Indiana e Chinesa, as quais possuem um rico repertório de espécies que são usadas, muitas vezes, para o tratamento de doenças com sintomas e manifestações clínicas semelhantes aos da infecção por DENV. Para isso, uma abordagem de triagem guiada por bioensaio para explorar o bio-recurso fitoterápico e identificar plantas com atividade inibitória frente aos quatro sorotipos do DENV foi realizada utilizando linhagens de células Vero de rim de macaco e de hepatoma humano como meio de cultura. Dentre as espécies avaliadas, uma das que apresentou maior atividade foi a *Cissampelos pareira*, com uma $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. O extrato metanólico desta espécie inibiu a replicação viral em culturas de células e protegeu camundongos contra a infecção, sem apresentar efeitos tóxicos em ratos (Sood *et al.*, 2015).

Além de Dengue e Zika, substâncias derivadas de plantas possuem importância frente a outras doenças virais. O HIV, Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida é responsável por uma epidemia global e de acordo com as últimas estatísticas fornecidas pelo programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV, estima-se que 33,3 milhões de pessoas vivem com o HIV e que este tenha causado 1,8 milhões de óbitos em 2009. Desde o surgimento deste retrovírus, terapias vêm sendo desenvolvidas para o controle da replicação viral e a consequente progressão da doença. Tendo em vista que o envelope viral é de fundamental importância para fixação na membrana celular do hospedeiro e posterior infecção por parte do vírus, o processamento de proteínas envolvidas em sua síntese como a poliproteína inativa (gp160) dentre outras podem ser um alvo atraente para suprimir uma infecção pelo HIV-1. Nesse contexto, as plantas entram com fundamental importância como fonte de novos medicamentos pelo fato de oferecerem uma variedade de compostos, dentre os quais alguns já foram identificados como inibidores de diferentes estágios do ciclo de replicação do HIV e encontram-se em diferentes estágios de testes clínicos.

Em um estudo realizado por Wan e colaboradores (2012), foi descrito um alcaloide bisbenzilisquinolínico, a fangchinolina, que é derivada de uma planta herbácea pertencente à família Menispermaceae originária da China e de Taiwan, a *Stephania tetrandra*. Esta

substância demonstrou a propriedade de inibir a propagação do HIV-1 ao atingir o envelope em um estágio tardio do ciclo de replicação viral, sendo assim identificada como um novo agente anti-HIV por uma triagem baseada em células de compostos derivados de fitoterápicos Chineses. Porém, a fangchinolina exibiu um índice terapêutico relativamente baixo no ensaio *in vitro* anti-HIV, indicando uma utilidade terapêutica relativamente limitada. No entanto, estudos mais aprofundados de relação estrutura/atividade podem ajudar a resolver esse problema, visto que a fangchinolina possui muitos análogos que ocorrem naturalmente. A tetrandrina, um análogo estreitamente relacionado, exerceu um perfil anti-HIV-1 similar e tais análogos podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais (Wan *et al.*, 2012).

Em 1960 foi autorizado a utilização do primeiro antiviral, a idoxuridina, para tratamento de herpes, com o avanço na eficácia e segurança. Após 20 anos foi descoberto o aciclovir, que foi aprovado como inibidor específico da replicação do vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1), Herpes simples tipo 2 (HSV-2) e da varicela zostervírus (VZV). Recentemente, foram desenvolvidos vários análogos nucleosídeos como agentes anti-herpéticos, mas a limitação terapêutica desses análogos de nucleosídeos inclui o desenvolvimento de resistência por parte de algumas cepas através da mutação de genes virais, portanto sendo necessário a busca por novos tipos de agentes antivirais que tenham uma eficácia em uma gama mais ampla de cepas virais. A atividade para Herpes simples HSV-1 da espécie *Stephania cepharantha*, uma planta medicinal Chinesa, foi encontrada por meio de uma triagem de 30 plantas. Tendo em vista essa propriedade biológica, o extrato de seus tubérculos (raízes), foi submetido ao isolamento no qual foram obtidos um total de 49 alcaloides, dos quais 17 foram ativos para HSV-1, incluindo 13 bisbenzilisoquinolínicos (Nawawi *et al.*, 1999).

O Instituto Botânico do Sul da China tem em registro mais de 50 espécies do gênero *Mahonia* (Berberidaceae), no qual as folhas, raízes e caules tem sido, há muito tempo, utilizadas na medicina popular por possuírem capacidade desintoxicante. Algumas espécies do gênero *Mahonia* possuem alguns alcaloides que foram extraídos, incluindo oxiacantina, berbamina, columbamina, isoterandrina, jatrorrizina, palmatina e berberina, que apresentam propriedades farmacológicas. Nos experimentos *in vitro* realizados pelos pesquisadores, demonstrou-se a propriedade anti-influenza das raízes de *M. bealei*, que está intimamente relacionada com os alcaloides. Posteriormente, identificaram a isotetrandrina, um alcaloide bisbenzyloquinolínico, como o responsável pela atividade anti-influenza (Zeng *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar fracionamento biomonitorado da fração de alcaloides totais de *Cissampelos sympodialis Eichl* com vistas no isolamento de substâncias com atividade antiviral para DENV e ZKV.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Preparar o extrato etanólico bruto, a FAT e as subfrações da FAT dos rizomas da espécie *Cissampelos sympodialis Eichl*;
- ✓ purificar os alcalóides via CLAE-prep;
- ✓ caracterização dos alcaloides purificados relacionados como subfração 5 e 6 por meio de técnica espectroscópica;
- ✓ submeter as frações isoladas a testes de atividade antiviral frente a DENV e ZKV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Substâncias e reagentes

Para realização da marcha de isolamento de alcaloides para *Cissampelos sympodialis* Eichl foram utilizados como solventes: etanol 96° (Toscano); etanol (Merck); água destilada; água purificada (Direct-Q® 5UV); ácido clorídrico, HCl a 3%; (Merck); hidróxido de amônio, NH₄OH, (Merck); clorofórmio, (Vetec); metanol grau HPLC (JTBaker); sulfato de sódio anidro, NaSO₄, (Merck).

4.2. Material Vegetal

4.2.1. Obtenção dos alcaloides bisbenzilisquinolínicos das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl

Os rizomas de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) utilizadas neste trabalho foram coletadas no horto das dependências do Programa Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em João Pessoa, em maio de 2015. A escolha das raízes para uso deu-se em função da maior quantidade dos componentes desejados estarem presentes nessa parte da planta (Barbosa-Filho *et al.*, 1997). A identificação botânica foi realizada pela botânica Prof. Dra. Maria de Fátima Agra e uma amostra encontra-se depositada no herbário Lauro Pires Xavier da UFPB com o código Agra 1456.

4.2.2. Obtenção do extrato etanólico bruto das raízes da planta

As raízes frescas de *Cissampelos sympodialis* Eichl foram secas em estufa com ar circulante a 40 °C e trituradas. Em seguida, submeteu-se o pó seco (1668 g) a uma série de macerações sucessivas, com um intervalo de 72 h entre cada uma das macerações, perfazendo um total de dez. O solvente de extração utilizado foi o etanol 70% com adição de hidróxido de amônio para alcalinização do meio, procedendo-se a primeira extração adicionando-se inicialmente a amônia (cerca de 250 mL) ao pó seco, passando-se 24 h para então adicionar o

etanol (1750 mL). Aguardou-se por mais 48 h para retirada do líquido extraído. Esse processo foi repetido por nove vezes, de acordo com a observação de teste de Dragendorff fracamente positivo. Uma última extração foi realizada procedendo-se a agitação da massa da planta juntamente com os solventes em sonicador (Ultra Cleaner® 1400), por um período de 30 minutos, porém esse procedimento não contribuiu para melhora do processo extrativo, visto não ter ocorrido alteração na coloração do líquido extraído. Dessa forma, considerou-se finalizada a etapa de obtenção do extrato etanólico (EEtOH) de *Cissampelos sympodialis* Eichl. A solução de EEtOH obtida foi evaporada a pressão reduzida em rotaevaporador (Fisatom, 801) a 60 °C resultando em um extrato etanólico bruto das raízes (EEBrz) concentrado de coloração castanha (111,1 g, 6,7% m/m em relação ao peso das raízes secas), odor levemente adocicado e consistência de uma massa firme. O mesmo foi submetido à uma marcha para isolamento da fração de alcaloides terciários totais (FATT-rz).

4.2.3. Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl

O isolamento da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl a partir do EEBrz (111,1 g) consistiu em adicionar à massa do mesmo, uma solução de ácido clorídrico a 3% (400 mL) sob agitação mecânica até a obtenção de faixa de pH 2,0-3,0. Seguiu-se a filtração da solução ácida em funil de Buchner com celite, a qual foi submetida a várias extrações com clorofórmio (cerca de 100 mL a cada extração) por 5 vezes, objetivando remover principalmente as graxas e outras impurezas apolares. A fase clorofórmica foi reservada. Com a fase aquosa ácida, realizou-se a basificação da mesma com hidróxido de amônio sob agitação mecânica (agitador mecânico IKA T25 digital ultra Turrax) até obtenção de pH 9,0, quando procedeu-se a extração exaustiva com clorofórmio até que a reação para alcaloides com reagente de Dragendorff não mais fosse positiva. Descartou-se a fase aquosa básica e realizou-se a lavagem da fase clorofórmica com água, secando-se com sulfato de sódio anidro e, em seguida, filtrou-se e evaporou-se a mesma em rota evaporador a 60 °C, obtendo-se, assim, a FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl (15,84 g, 14,26 % em relação ao peso do EEBrz).

4.2.4. Isolamento de alcaloides bisbenziloquinolínicos de *C. sympodialis* Eichl. por Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-prep)

Para isolar os alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, foram realizadas corridas cromatográficas em equipamento de Cromatografia a Líquida de alta Eficiência com as seguintes especificações: CBM-20A Prominence Communications Bus Module UFLC Shimadzu, DGU-20A5 Prominence Degasser Shimadzu, bombas LC-6AD, SPD-M20A Prominence Diod Array Detector Shimadzu, CTO-20^a Prominence Column Oven Shimadzu, utilizando uma coluna preparativa de fase reversa PREP-ODS(H)KIT C₁₈, (250 x 20 mm D, Shim-pack). As condições cromatográficas consistiram no gradiente de 0-7 min (65 %), 8-15 min (70%), 16-28 min (80%) de fase móvel composta por metanol e água, ambos basificados com solução de hidróxido de amônio para pH 8,0; comprimento de onda de detecção de 278 nm; fluxo de 12,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. O isolamento foi realizado injetando-se 2 mL da FATT-rz de *Cissampelos sympodialis* Eichl., na concentração de 10 mg/mL, preparada em uma mistura de metanol e água na proporção de 65:35. Os picos obtidos foram, então, coletados separadamente.

4.2.5. Concentração em fase Sólida

O solvente das subfrações coletadas através de CLAE-prep foi removido usando um método de extração em fase sólida (SPE), com cartuchos de SPE Supelclean (1g/6mL da Supelco, Sigma-Aldrich, Brazil). Antes da aplicação da amostra, os cartuchos foram condicionados com 20 mL de metanol (4x5mL), seguido de 20 mL de água (4x5mL), usando para isso uma estação de extração à vácuo (vacuum manifold). Cada subfração coletada foi previamente diluída com água até a concentração de metanol ter sido reduzida a 10% (v/v) ou menos de forma a prevenir a eluição prematura dos alcaloides (sample breakthrough). Os cartuchos foram então purgados até estarem secos através da aplicação do vácuo. Finalmente, as amostras foram eluídas em frascos Falcon usando 4x5 mL de metanol. As amostras foram transferidas para balão de fundo redondo e o metanol foi evaporado até *secura* usando um evaporador rotatório sob pressão reduzida.

4.2.6. Análise das amostras coletadas do isolamento CLAE-prep

Para analisar as seis amostras coletadas por meio da CLAE-prep, foram utilizadas corridas no mesmo equipamento da etapa anterior, porém no modo analítico, utilizando uma

coluna analítica de fase reversa da marca PHENOMENEX® (CL Coluna Luna 5 µM C18, 250 x 4,5 mm). As condições cromatográficas consistiram em eluição isocrática: (65%), (67%), (70%), (75%), (78%) e (80%) de fase móvel de metanol e água (ambos basificados, pH 8,0); detecção por UV em 278 nm; fluxo de 1,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. A análise foi realizada a partir da injeção de 20 µL de cada uma das seis amostras em uma diluição de 1:10 em metanol e água (65:35) a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

4.2.7. Repurificação das amostras analisadas

Para repurificação, caso necessária, foram utilizadas corridas no mesmo equipamento CLAE, utilizando uma coluna semi-preparativa de fase reversa da marca PHENOMENEX® (Coluna Luna 5 µ C18, 250x10 mm). As condições cromatográficas para a repurificação consistiram em eluição isocrática: (20%) de fase móvel composta por metanol e água (pH 8,0); detecção por UV em 278 nm; fluxo de 5,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. A análise foi realizada a partir da injeção de 1 mL das amostras (5 mg/mL) que não se apresentou pura.

4.2.8. Caracterização das amostras

O alcaloide referente ao pico cromatográfico 5 e 6 foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H em espectrômetro da marca BRUKER FOURIER ® 300 MHz, em clorofórmio deuterado. Os espectros foram obtidos no LABVALE desta universidade. Os deslocamentos químicos foram referenciados ao sinal do TMS (tetrametilsilano) com escala em ppm.

4.3 Ensaio de Citotoxicidade e Ensaio Antivirais

4.3.1 Células e Vírus

Os estudos de atividade antiviral foram conduzidos em parceria com o grupo de Pesquisa do Prof. Dr. Lindomar Pena, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fiocruz, PE, em Recife. As células Vero, linhagem de rim de macaco verde africano, foram

cultivadas em meio DMEM, contendo 10% de SFB, penicilina, estreptomicina e anfotericina B nas concentrações de 100 U/mL, 100 e 2,5 µg/mL, respectivamente. As cepas do vírus representando os quatro sorotipos do DENV e ZKV encontram-se disponíveis no Departamento de Virologia da Fiocruz/PE. A cepa do ZKV utilizada foi isolada a partir do sangue de um paciente com doença exantemática no Estado de Pernambuco e é denominada ZKV/H. sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1). O vírus já foi titulado e possui o título de $3,4 \times 10^7$ unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (pfu/mL). Os estoques virais dos quatro sorotipos do DENV e do ZKV foram produzidos em células Vero. Para isso, 1 mL da suspensão viral foi inoculado em garrafas de cultura (75 cm²) contendo células confluentes. Após 1 hora de adsorção do vírus, com leve agitação, foram adicionados às garrafas 10 mL de meio DMEM (suplementado com 5% de SFB) e incubadas a 37 °C por até 72 horas. Após 3 dias a suspensão viral foi retirada e centrifugada a 2000-2500 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -80°C até a sua utilização.

Os estoques virais dos quatro sorotipos do DENV foram titulados pelo método TCID₅₀ descrito por (Reed e Muench, 1938), o qual indica a diluição do vírus que resulta na infecção de 50% das replicatas de inoculação, expressando o título viral como a dose 50% infectiva (IC₅₀). Para isso, aproximadamente 1×10^4 células Vero foram crescidas em placas de 96 poços e após a adição de diluições seriadas das alíquotas virais, as placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂. O resultado foi obtido pela análise do efeito citopático (ECP) em microscópio óptico invertido. O sorotipo DENV-2 já foi titulado e o estoque atualmente utilizado possui título de $1,9 \times 10^6$ pfu/mL.

4.3.2. Ensaio de Citotoxicidade

Este teste é usado para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos para as células. O objetivo é que as substâncias e extratos testados não causem danos significativos para a cultura de célula infectada. Além disso, foram calculados o CC₅₀ e o CC₂₀, ou seja, a concentração do composto relacionada à 50% e 20%, respectivamente, da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi analisada através do método colorimétrico quantitativo baseado na redução do sal de MTT, que é o brometo de [3-(4,5-dimetilazol, 2-il)-2,5-difenil- tetrazólio. O sal de tetrazólio é utilizado para indicar a sobrevivência e proliferação de células. O ensaio

detecta apenas células vivas, e o sinal gerado depende do grau de ativação das células (Mosmann, 1983). O resultado é lido em um espectrofotômetro, o qual gera uma densidade óptica (DO) referente ao número de células viáveis.

Para os testes de citotoxicidade, os picos de 1 a 6 foram solubilizados em DMSO e inoculados por 5 dias nas concentrações (6, 3, 1,5 e 0,75 µg/mL) em monocamadas de Vero semeadas em uma concentração de 1.10^4 células/poço em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C antes do uso. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados usando o método colorimétrico do MTT utilizando Kit MTT Cell Proliferation Assay Kit (ATCC, USA), de acordo as instruções do fabricante e com o protocolo já validado (De Carvalho *et al.*, 2017). Aliquotas de 100 µL, contendo as concentrações 6, 3, 1,5 e 0,75 µg/mL das substâncias a serem testadas foram dispensadas sequencialmente nas placas de microtitulação. Controles celulares e do veículo de solubilização (DMSO) foram incluídos. Após 5 dias de incubação, os meios de cultivo foram removidos e 50 µL da solução de MTT de 5 mg/mL (preparado imediatamente antes do uso) foram adicionados em cada pocinho, posteriormente a microplaca foi incubada durante quatro horas a 37 °C. Após este período, a solução de MTT foi removida e 50 µL de DMSO foi adicionado a cada pocinho para induzir o aumento da permeabilidade das membranas celulares permitindo, então, a reação enzimática provocada pela solubilização dos sais de formaza. Em sequência, realizou-se a análise da densidade óptica por leitura em espectrofotômetro com 560 nm para obtenção da DO de cada tratamento e da concentração de cada composto que seria utilizado para cálculo da toxicidade (CC_{50}), a qual foi determinada através de uma curva dose resposta calculada pelo programa GraphPad Prism e a viabilidade celular pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{médiao tratamento}}{\text{médiao controle}} \times 100$$

Cada experimento foi repetido independentemente três vezes.

4.3.3. Screening Antiviral

Para investigar a atividade antiviral das substâncias foi realizado um teste baseado na avaliação da redução do efeito citopático causado pelo vírus nas células. A concentração máxima não tóxica dos extratos e substâncias em testes foi adicionada e as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, por até 72 horas. Além dos tratamentos com os

diferentes picos em teste, também foi incluído aos controles o tratamento com um composto que possui atividade virucida já comprovada, o ribosídeo da 6-metilmercaptipurina (6MMPr) (De Carvalho et al., 2017). Este controle foi denominado como positivo. O controle mock (apenas células) também foi incluído em todos os ensaios. As células Vero foram cultivadas em microplacas de 48 poços e incubadas por 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e o DENV-2 diluído à sua multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 foi inoculado nos poços. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas, período de adsorção viral. Posteriormente, o meio foi novamente aspirado e a monocamada foi lavada com PBS (tampão fosfato-salino, pH 3.0) para retirada das partículas virais que não foram adsorvidas. A concentração máxima não tóxica (CC20) dos compostos em testes foi adicionada seguida das concentrações referentes à 1/2, 1/4 e 1/8 do CC20. (estimativa do CC50 e CC20 das frações alcaloides isolados a partir da milona em células Vero). Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, por até 72 horas. O efeito citopático foi observado ao decorrer das 72 horas de incubação.

Os compostos com porcentagem de inibição acima de 50% seguirão para a avaliação através da titulação por TCID₅₀.

4.3.4. Avaliação da Atividade Antiviral

Para a avaliação da atividade antiviral dos os extratos e substâncias, um protocolo já validado (De Carvalho *et al.*, 2017) foi utilizado. A redução do título viral foi medida como redução do log₁₀TCID₅₀/mL, ou seja, uma redução da concentração tecidual infectiva média. Para isto, foi escolhido um ensaio de pós tratamento. Neste ensaio, as células foram infectadas e após a inoculação viral, o sobrenadante contendo o vírus foi aspirado e a monocamada foi tratada com PBS a pH 3 por 1 min para inativar os vírus que não penetraram a célula. Em seguida as células foram tratadas ou não com diluições seriadas dos extratos e substâncias em teste e incubadas por 72 h a 37 °C com 5% de CO₂.

Em todos os tratamentos, foram utilizadas concentrações decrescentes de cada substância teste a partir do CC₂₀ de cada uma delas conforme determinado acima no ensaio de citotoxicidade. Após três dias de incubação, os meios de cultivo foram removidos e a viabilidade das células determinadas através da observação do efeito citopático. Dessa maneira, foi determinada a concentração efetiva a 50% (CE₅₀), que representa a concentração da

substância capaz de inibir o efeito citopático induzido pelo vírus em 50%. De posse desses valores, torna-se possível determinar o índice terapêutico ou índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$), que reflete a eficácia relativa da substância experimental em inibir a replicação viral comparada a sua capacidade de induzir citotoxicidade e morte celular. É desejável ter um elevado índice de seletividade que produz máxima atividade máxima e mínima toxicidade celular (Fda, 2006).

4.4. Análise Estatística

Os dados obtidos em cada experimento serão testados quanto à normalidade e comparados utilizando o teste “t-Student” (2 tratamentos) ou ANOVA (mais de 2 tratamentos) usando o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $p \leq 0.05$ serão considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Cissampelos sympodialis* processo de obtenção da FATTrz

A escolha desta planta para o presente estudo se deve ao fato de que há estudos importantes sobre uma gama de efeitos biológicos como atividade anti-anafilática, anti-inflamatória por inibição da migração de neutrófilos e sua ação no tratamento de asma em vários modelos experimentais. Além disso, é uma espécie que está distribuída por toda América tropical, África e Ásia, sendo nativa também no Brasil com uma ampla distribuição geográfica. *Cissampelos sympodialis* possui uma grande importância devido ao seu uso popular como planta medicinal no tratamento de doenças como asma, influenza, bronquite e reumatismo, sendo que suas propriedades biológicas estão relacionadas a alguns alcaloides já isolados (Tabela 2, item 2.1.1) (Agra *et al.*, 2008) (Alencar, 1994).

Neste trabalho foi realizado uma marcha de alcaloides que teve como objetivo preparar a FATTrz. O processo está ilustrado no fluxograma da Figura 8.

Com essa marcha para obtenção de alcaloides, foi possível obter a quantidade 15,84 g da FATTrz, o que corresponde a um rendimento de 14,26% em relação ao peso do extrato etanólico bruto dos rizomas EEBr-rz. Tal rendimento foi menor que o obtido por (Medeiros, 2013) no mesmo processo (21,76%), o que pode ser explicado por tempos diferentes de coleta. A época de coleta é um fator determinante, tendo em vista que, a quantidade dos constituintes ativos não é uma constante durante o ano. A sazonalidade possui uma influência direta no teor de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (Lopes e Neto, 2007).

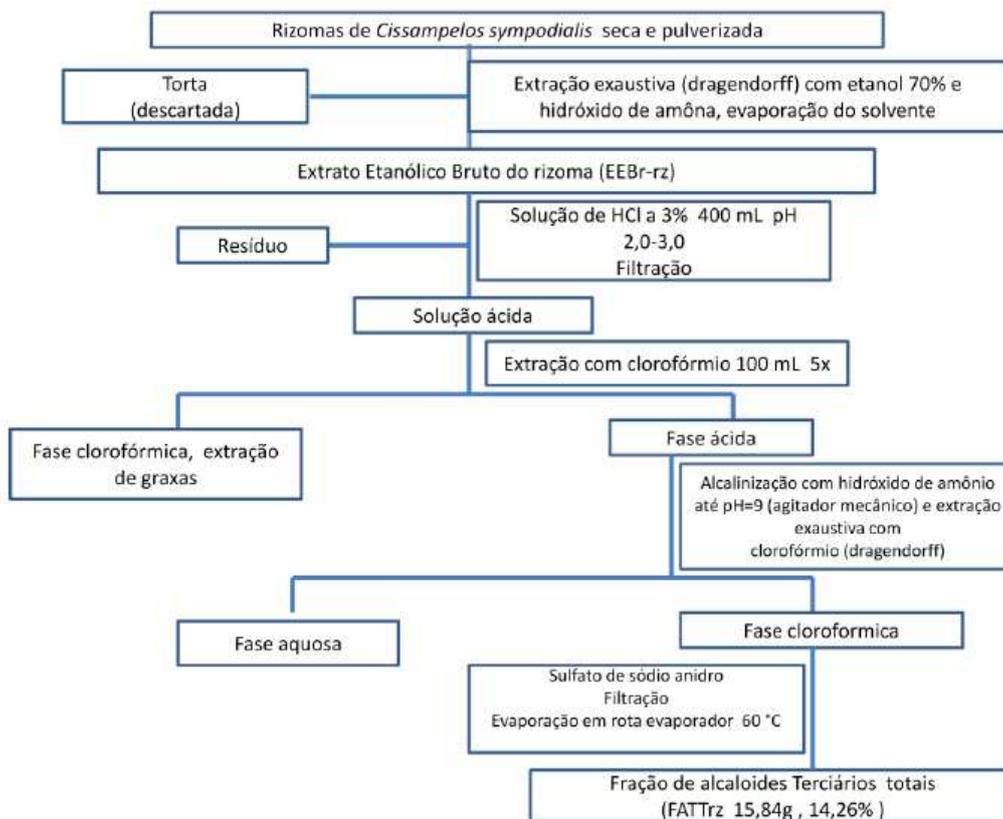


Figura 8. Fluxograma representativo da obtenção da FATTTrz

5.2. Separação da FATTTrz via CLAE-prep

Após a obtenção da FATTTrz foi realizado o processo de separação, utilizando a técnica CLAE-prep para coleta das subfrações isoladas. Com esta técnica é possível a separação de misturas complexas de moléculas com propriedades físico-químicas semelhantes como um extrato de planta, mas que diferem na sua hidrofobicidade e, conseqüentemente, em seus coeficientes de partição entre a fase móvel e estacionária.

A FATTTrz, na concentração de 10 mg/mL, foi injetada no volume de 2 mL, representando a introdução de 20 mg da mesma na coluna. Nas condições cromatográficas utilizadas, em modo preparativo, foi obtido o perfil cromatográfico apresentado na Figura 9. Seis picos foram visualizados e coletados.

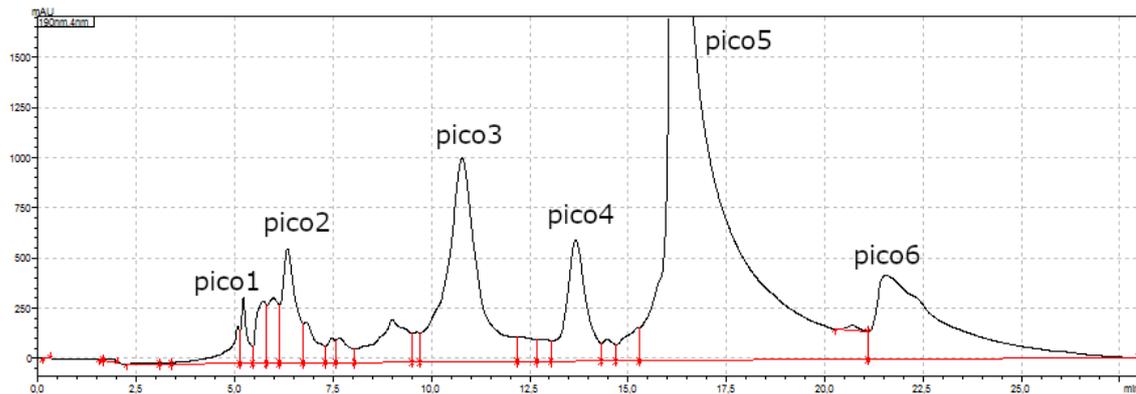


Figura 9. Cromatograma representativo da separação por CLAE preparativa da FATTTrz. Condições cromatográficas: C₁₈ (250 x 20 mm); gradiente de 0-7 min (65 %), 8-15 min (70%), 16-28 min (80%) de fase móvel composta por metanol e água (pH 8,0); detecção em 278 nm; fluxo de 12,0 mL/min.

5.3. Concentração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica que teve suas aplicações experimentais há algumas décadas, mais precisamente há 50 anos, surgindo como alternativa à extração líquido-líquido, oferecendo importantes benefícios na obtenção de analitos em amostras biológicas, contribuindo para uma redução do uso de solventes e, conseqüentemente, reduzindo à exposição aos mesmos, além de diminuir os custos e tempo de extração (Hennion, 1999; Queiroz *et al.*, 2001).

Em se tratando de análise de produtos naturais, a EFS de fase reversa é frequentemente utilizada para o pré-tratamento de amostras e para a recuperação de um grande número de metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides, saponinas e sesquiterpenos (Felgines *et al.*, 2003).

Os cartuchos utilizados na EFS apresentam-se em vários formatos, sendo um dos mais comuns o formato de cartuchos com o mecanismo de retenção idênticos aos da cromatografia líquida em coluna, são característicos em apresentarem em estrutura de polipropileno contendo de 50 a 500 mg de material adsorvente, com o tamanho variando entre 40 e 60 µm fixados ao tubo. As etapas que compreendem o processo de extração são: 1) inicialmente é realizado o condicionamento que consiste em ativar o material adsorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra, 2) posteriormente a

aplicação da amostra no cartucho e por fim, 3) eluição e coleta do analito (Lingeman e Hoekstra-Oussoren, 1997).

O processo de condicionamento realizado experimentalmente no trabalho com os alcaloides, foi de 20 mL de metanol e 20 mL de água Mili-Q que foram adicionados nas etapas de 5 em 5 mL, inicialmente com o metanol por quatro vezes com uma micropipeta e, posteriormente, o mesmo processo sendo repetido com a água, simplesmente para manter o cartucho em condições ideais de reter a amostra.

Na prática laboratorial essa técnica nos proporciona tanto a concentração como a purificação do analito, ou seja a EFS consiste basicamente em passar uma amostra líquida em uma coluna, cartucho ou disco que contém adsorventes que reterão o analito, portanto após a passagem de todo esse solvente o analito retido será recuperado através da eluição com um solvente orgânico apropriado. Estas etapas são geralmente realizadas aplicando-se vácuo ao cartucho para promover o fluxo de solvente. Isto pode ser feito de várias formas, mas uma muito utilizada é através de uma estação de EFS à vácuo (vacuum manifold). A estação de extração que foi utilizada neste trabalho está ilustrada na Figura 10.

A Figura 11 é o resultado da amostra que passou pela etapa de eluição finalizada durante o processo de EFS, que consiste de um analito com 100% do solvente orgânico que foi utilizado como eluente, portanto sem água, fato este que durante a sequência experimental facilita o processo de secagem, visto que não ocorre fenômenos relacionados a misturas eutéticas ou azeotrópicas.



Figura 10. Foto da estação de extração em fase sólida de fase reversa utilizada neste trabalho.



Figura 11. Amostras, recuperadas por meio de EFS, referentes aos picos cromatográficos, subfração 1 a 6. Esquerda – direita.

5.4. Secagem das amostras

Com as amostras já concentradas, o próximo passo foi a secagem, conduzida em rotaevaporador (Figura 12). As amostras secas foram, então, transferidas para tubos eppendorff e deixadas em um dessecador sob vácuo, até análise posterior.



Figura 12. Imagem ilustrativa do rotaevaporador utilizado neste trabalho.

Um total de 112 injeções da FATTrz foram realizadas e os picos coletados e secos. Com cada injeção resultando em 20 mg da FATTrz sendo introduzidas na coluna cromatográfica, a massa total que foi submetida ao processo de separação foi de 2,24 g. A massa combinada das subfrações secas e recuperadas foi de 899,3 mg (rendimento de 40,14%), sendo esta massa assim distribuída: 22,8 mg - pico cromatográfico 01, 75 mg - pico 02, 98,5 mg - pico 03, 76,5 mg - pico 04, 547,2 mg - pico 05 e 79,6 mg - pico 06 (Figura 13) e (figura 9).

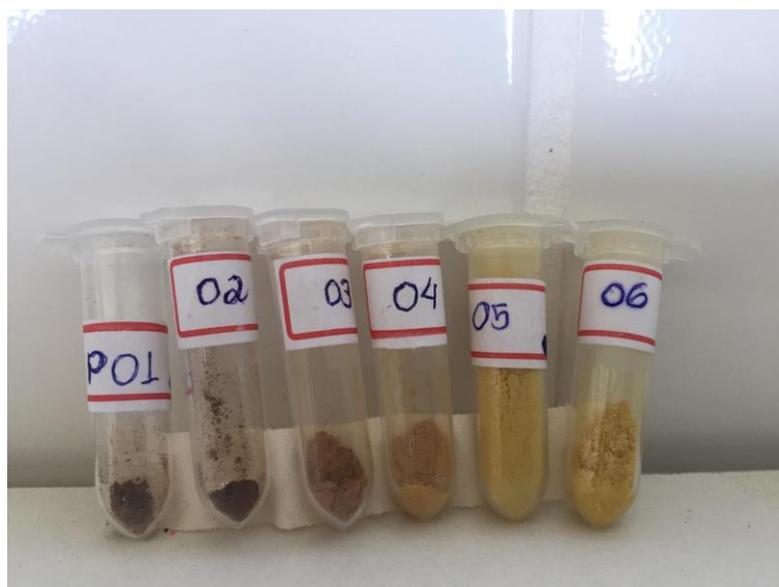


Figura 13. Amostras secas referente aos 6 picos (subfrações) cromatográficos.

5.5. Análise das amostras via CLAE

A CLAE é uma importante ferramenta para identificação de alguns possíveis interferentes em amostras, que em algumas situações podem co-eluir com o analito de interesse, prejudicando a análise quantitativa. Uma forma de verificar se está ocorrendo co-eluição de compostos é a determinação da pureza dos picos cromatográficos, a qual pode ser realizada pelo detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Portanto, a utilização deste detector possibilita a varredura em diferentes comprimentos de onda simultaneamente para um pico cromatográfico dividindo-o em várias subfrações de tempo de retenção e, conseqüentemente, verificar se os espectros obtidos em diferentes tempos coincidem, indicando, assim a pureza do pico (Snyder; Kirkland; GlaJeh, 1997). A pureza referente aos alcaloides foi determinada por CLAE utilizando detector DAD na faixa de 253 a 303 nm e o software LABSolutio (Shimadzu) para a análise.

As Figuras 14 a 19 apresentam os cromatogramas, obtidos no modo analítico, referentes aos picos cromatográficos 1 a 6 previamente isolados por CLAE-prep.

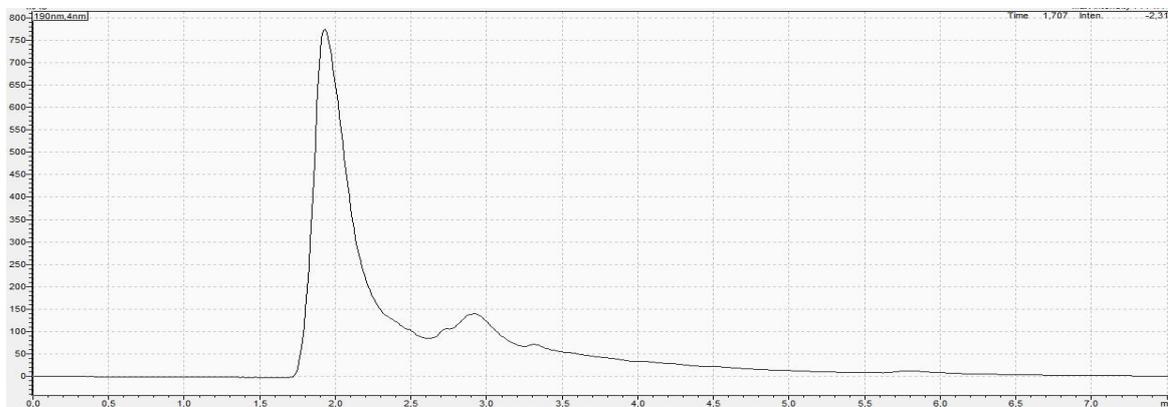


Figura 14. Cromatograma referente ao pico 1 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas, modo analítico: Eluição isocrática de fase móvel metanol e água (65:35), e injeção 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

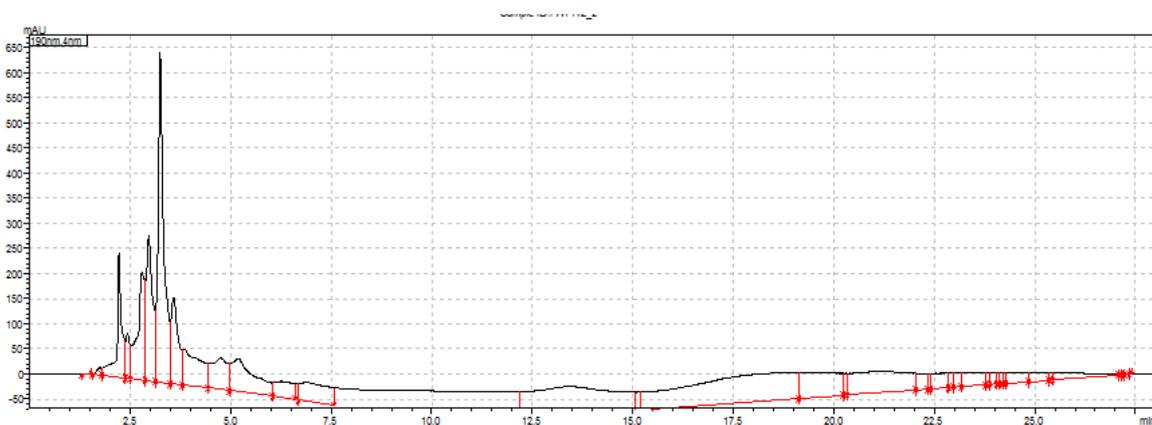


Figura 15. Cromatograma referente ao pico 2 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas do modo analítico, Eluição isocrática de fase móvel metanol e água (67:23), e injeção de 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

Como já foi mencionado no trabalho, caso um pico cromatográfico não apresentasse pureza adequada após essa análise no modo analítico utilizando detector DAD, a amostra passaria por um processo de repurificação. Desse modo, a amostra referente ao pico 02 (Figura

15) se enquadrou nessa situação, portanto sendo recromatografada e apresentando o cromatograma apresentado na Figura 15.1

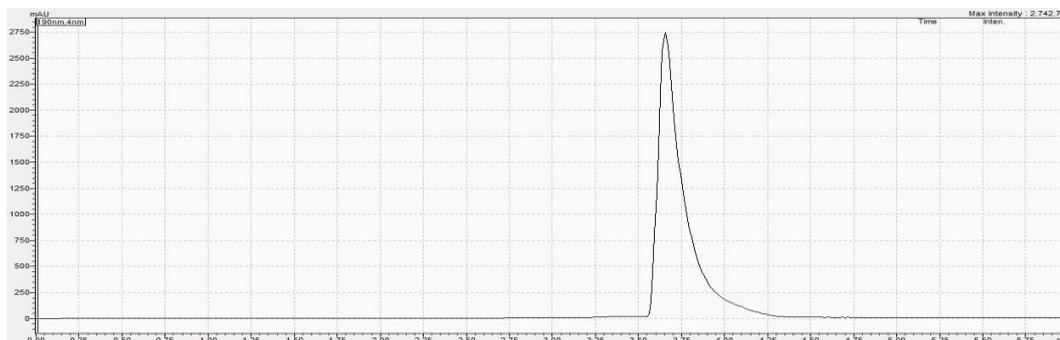


Figura 15.1. Cromatograma referente a repurificação do pico 02. recromatografia pico 02. Eluição isocrática com fase móvel metanol e água (20:80) e injeção de 1 mL na concentração de 5 mg/mL.

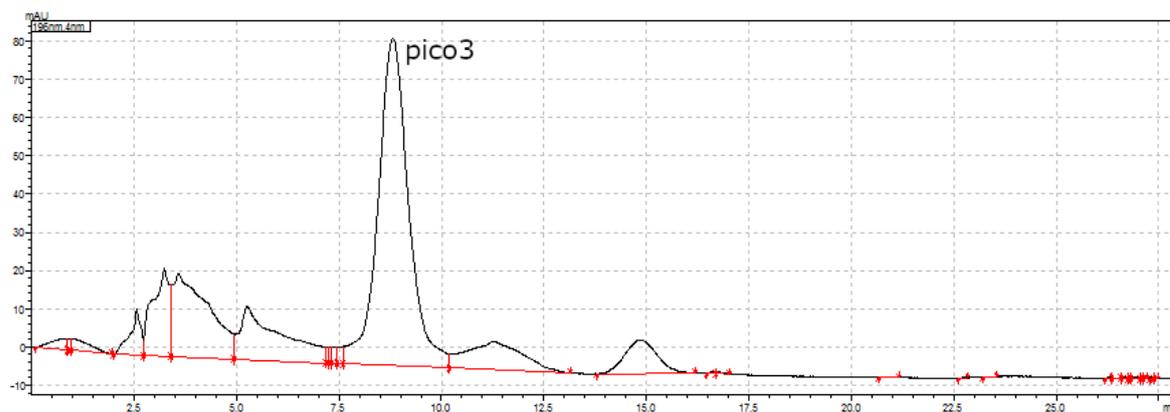


Figura 16. Cromatograma referente ao pico 3 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas: modo analítico, eluição isocrática de fase móvel metanol e água (70:30), e injeção de 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

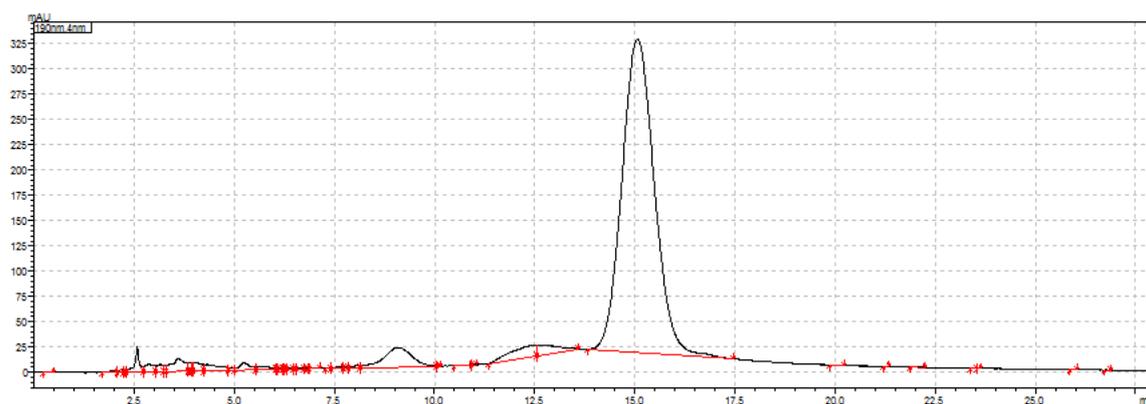


Figura 17. Cromatograma referente ao pico 4 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas: modo analítico, eluição isocrática de fase móvel metanol e água (75:25), e injeção de 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

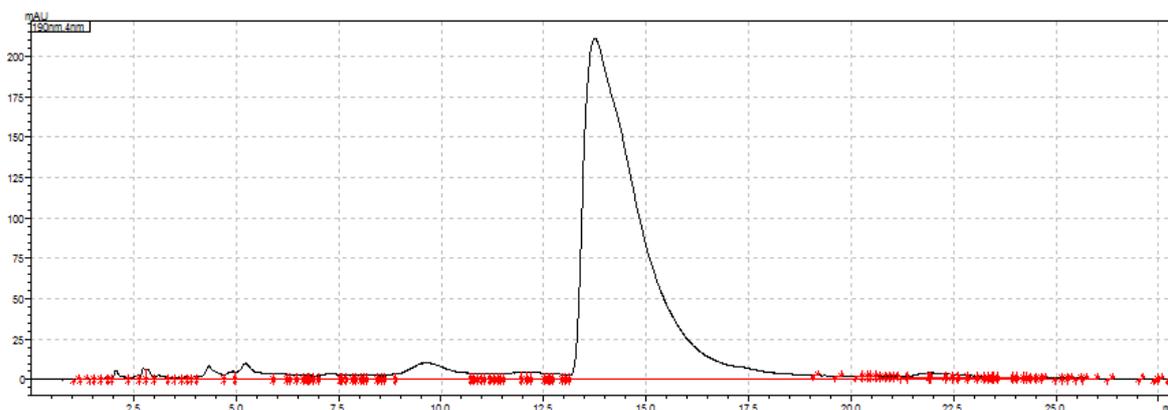


Figura 18. Cromatograma referente ao pico 5 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas: modo analítico, eluição isocrática de fase móvel metanol e água (78:22) e injeção de 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

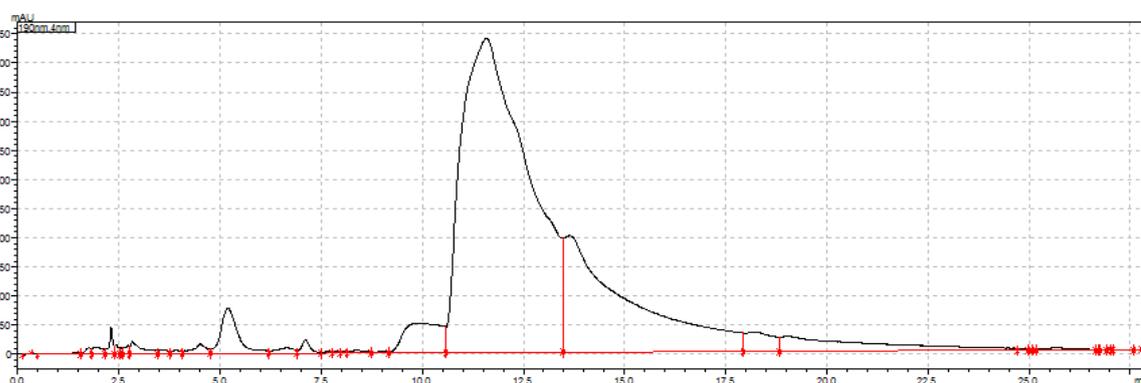


Figura 19. Cromatograma referente ao pico 6 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas: modo analítico, eluição isocrática de fase móvel metanol e água (80:20), e injeção 20 μ L na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

5.6. Caracterização via RMN

Com a finalidade de disponibilizar amostras para os ensaios farmacológicos que tivessem sua identidade confirmada por técnicas de elucidação estrutural, e devido a urgência de realização dos ensaios antivirais dentro do prazo de execução do projeto, começamos pela substância majoritária da amostra, o pico 5, que foi submetido então à análise espectroscópica de ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Os dados espectroscópicos foram comparados com aqueles disponíveis na literatura (Mukherjee e Keifer, 2003), sendo possível a confirmação da identidade do pico 5 como warifteína (Tabela 3, Figura 20). Os demais picos estão em processo de elucidação estrutural, bem como os demais espectros da warifteína estão sendo obtidos (espectro de massas de alta resolução, espectro de Infravermelho, e espectro de RMN de ^{13}C). A Figura 22 e a Tabela 4 se referem ao espectro de RMN de ^1H da Fração 6 e comparação dos dados espectrais com aqueles da literatura para a metilwarifteína, o que nos permite determinar a identidade do pico 6, como metilwarifteína.

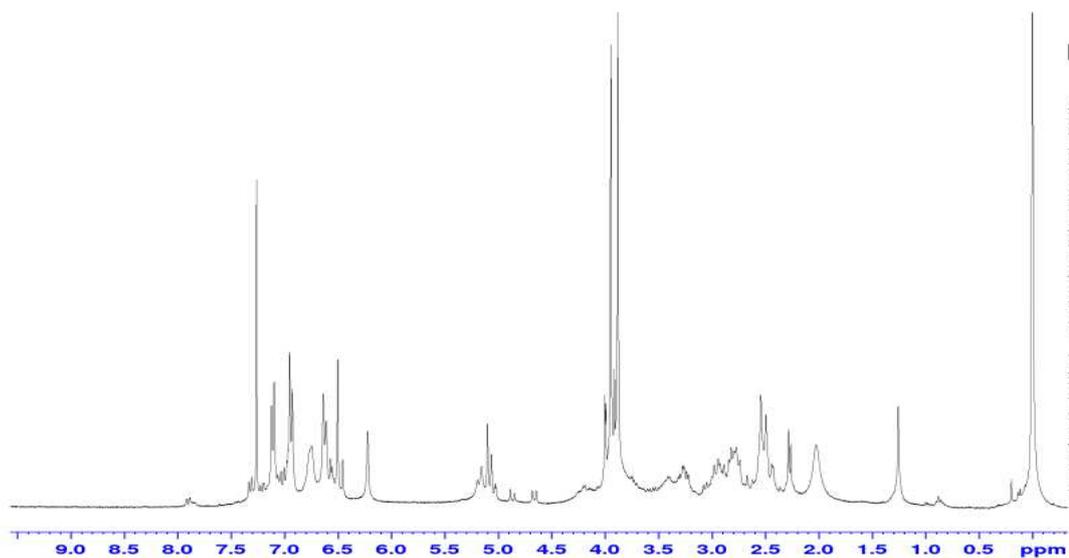


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da subfração 5.

Tabela 3. Comparação entre os dados de RMN de ^1H da warifteína obtidos da literatura com aqueles da subfração 5 (Solvente: CDCl_3).

Próton	^1H (δ , ppm) Valor de referência (Mukherjee e Keifer, 2003)	^a Multiplicidade / (Hz)	#H ^b	^1H (δ , ppm) Valor da amostra (subfração 5)
1', 3	3.18	td	2H	2.91
3, 15'	2.73	m	3H	2.82
4, 4', 15'	2.45	br m	4H	2.51
5	6.16	s	1H	6.20
10, 14	6.72	br d	2H	6.65
11, 13	6.60	d 8.2	2H	6.50
4'	2.89	m	2H	2.91
5'	6.45	s	1H	6.52
10', 14'	7.01	d	2H	7.00
11', 13'	6.88	d	2H	6.95
16'	5.07	br m	2H	5.12
6-OMe	3.88	s	3H	3.91
6'-OMe	3.81	s	3H	3.80
2'-NMe	1.93	br s	3H	2.02
Sinal desconhecido	4.01	br	1H	-
Sinal desconhecido	3.50	br	1H	-

^as, singleto; d, dubleto; t, tripleto; m, multipletto; br: largo.

^bNúmero integrado de prótons por ressonância

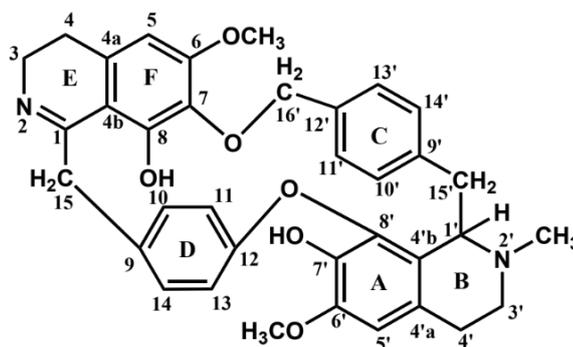


Figura 21. Estrutura química da Warifteína. (Mukherjee e Keifer, 2003)

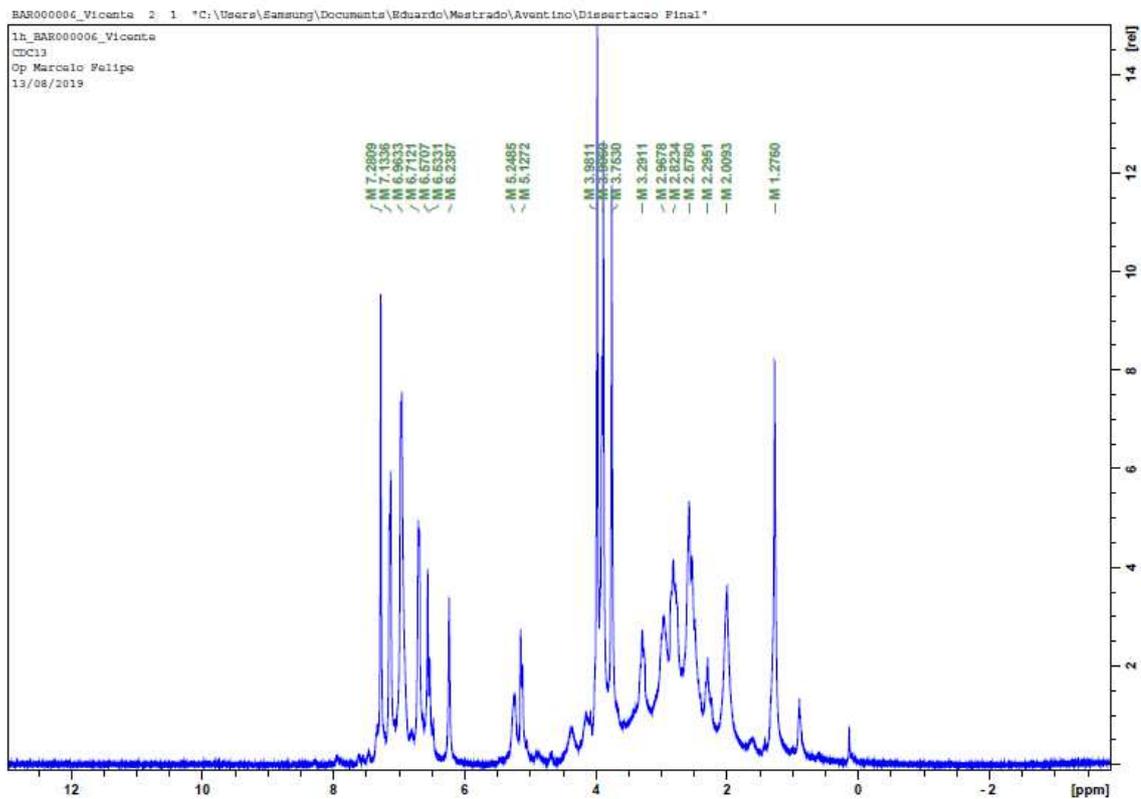


Figura 22. Espectro de RMN da subfração 6.

Tabela 4. Comparação entre os dados de RMN de ^1H da metilwarifteína obtidos da literatura com aqueles da subfração 6 (Solvente: CDCl_3).

Próton	^1H (δ , ppm) Valor de referência (Mukherjee e Keifer, 2003)	^a Multiplicidade / (Hz)	#H ^b	^1H (δ , ppm) Valor da amostra (subfração 6)
1', 3	3.19	m	2H 1H at 45°C	3.29
3, 15'	2.75	m	3H	2.82
4, 4', 15'	2.50	br m	4H	2.58
5	6.16	s	1H	6.24
10, 14	6.84	br d	2H	6.71
11, 13	6.64	d	2H	6.56
4'	2.91	br s	4H 2H at 45°C	2.95
5'	6.51	s	1H	6.48
10', 14'	7.02	d	2H	7.14
11', 13'	6.90	d	2H	6.97
16'	5.18	br d	1H	5.24
16'	5.08	br d	1H	5.12
6-OMe	3.90	s	3H	3.98
6'-OMe	3.82	s	3H	3.90
7'-OMe	3.68	s	3H	3.75
2'-NMe	1.97	br s	3H	2.00

^as, singlete; d, dubleto; t, tripleto; m, multipletto; br: largo;

^bNúmero integrado de prótons por ressonância

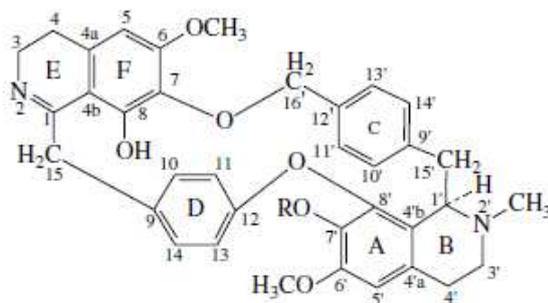


Figura 23. Estrutura química da metilwarifteína.(Mukherjee e Keifer, 2003)

6. Ensaio Biológicos

6.1. Ensaio de citotoxicidade

O extrato, FTTrz e substâncias isoladas picos (subfrações 1-6) apresentaram um nível aceitável de citotoxicidade, já que nenhuma amostra testada apresentou valores de CC_{20} muito baixos (<. Durante o teste e para o posterior ensaio antiviral do extrato, FATTrz e substâncias isoladas (subfrações 1-6), foram solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido). De acordo com o grupo de pesquisa, para os ensaios de citotoxicidade executados, a porcentagem de 0,6%, de DMSO num volume total, corresponderia como a máxima não tóxica, para as células Vero, sendo assim, não apresentando influência na viabilidade celular.

Portanto, a concentração máxima utilizada no veículo de solubilização é a de 0,6% de DMSO, o que corresponde ao limiar de concentração desta substância.

Os extratos, frações, subfrações e warifteína foram ensaiados na faixa de concentração de 6 a 0,75 $\mu\text{g/mL}$ (6, 3, 1,75 e 0,75 $\mu\text{g/mL}$), e os valores de viabilidade de três experimentos independentes submetidos a análise de regressão linear para determinação da CC_{50} e CC_{20} . Esta informação é importante para o prosseguimento dos testes de atividade antiviral, já que é necessário utilizar nos testes de atividade antiviral uma concentração das amostras que não promova uma citotoxicidade elevada (CC_{20}). Os resultados do teste de citotoxicidade estão mostrados na Tabela 4. Pode-se observar que de todas as amostras testadas, a warifteína (Pico 5) foi o que demonstrou a menor toxicidade para as células Vero, e o extrato bruto, a maior toxicidade. Isto mostra que a purificação do extrato bruto levou a eliminação de algumas substâncias mais tóxicas para as células e permitiu assim selecionar a dose (CC_{20}) das subfrações que seriam usadas nos testes subsequentes de atividade antiviral. Além disso, pode-se observar que quando os valores do controle positivo (6MMPr) são transformados de μM para $\mu\text{g/mL}$, a citotoxicidade da warifteína não difere deste de forma significativa, embora o pico 6, que foi o que demonstrou a melhor atividade antiviral frente ao vírus DENV-2 seja cerca de 2,3 vezes mais tóxico que o controle positivo se levarmos em conta os valores calculados de CC_{20} .

Tabela 5. Dados de citotoxicidade do extrato bruto, FATTrz e subfrações, relacionado a 50% e 20% de viabilidade celular, conforme determinado pelo ensaio do MTT em células Vero.

Composto	Citotoxicidade	
	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₂₀ (µg/mL)
Extrato bruto	13,35	5,73
FATTrz	24,58	9,82
Pico 01	19,2	7,12
Pico 02	14,10	5,24
Pico 03	23,24	9,58
Pico 04	14,77	2,86
Metilwarifteína	21,49	7,89
Warifteína	150,3 µM	10,49 µM
Controle positivo (6MMPr)	291,00 µM (86 µg/mL)	60,50 µM (17,88 µg/mL)

6.2. Análise da Atividade Antiviral (Redução do Título Viral)

6.2.1. Análise da Redução do Título Viral Frente ao DENV-2

A concentração correspondente a CC₂₀ de cada uma das substâncias isoladas da *Cissampelos sympodialis*, da metilwarifteína e warifteína (Tabela 5) foi utilizada para avaliação da capacidade das substâncias em reduzir o título viral, tanto frente à exposição ao DENV-2 quanto ao ZKV em testes de pós tratamento, ou seja, nos quais as substâncias são adicionadas após a infecção viral ter se estabelecido. As Figuras 24 e 25 mostram o efeito de redução do título viral do extrato etanólico bruto dos rizomas, da FATTrz e das subfrações isoladas a partir da FATTrz em reduzir o título viral frente ao DENV-2. Pode-se observar que todas as substâncias apresentaram a capacidade de reduzir de forma significativa o título viral, mas a subfração 6 em particular demonstrou uma capacidade de redução tão acentuada que o título viral foi reduzido para além do limite de detecção do método, redução esta que foi maior inclusive que aquela promovida pelo controle positivo (6MMPr). Este resultado está em conformidade com aquele obtido por Sood e colaboradores (Sood *et al.*, 2015), que demonstram que extratos de *Cissampelos parreira* apresentaram capacidade antiviral contra os quatro sorotipos de vírus da Dengue.

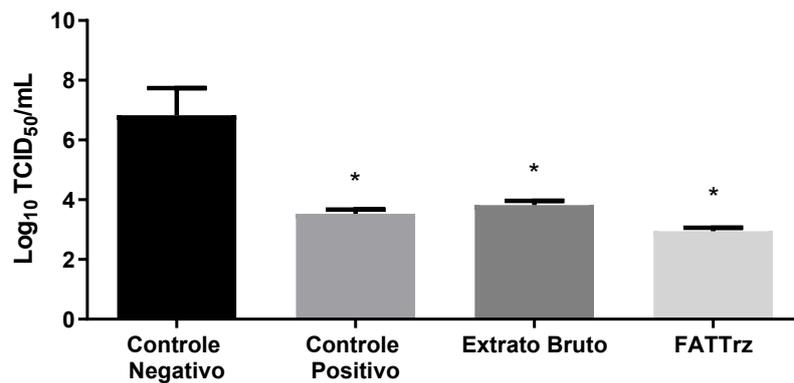


Figura 24. Análise da redução do título viral da DENV-2 após o tratamento com os compostos isolados de *Cissampelos sympodialis*: extrato bruto, Fração de Alcaloides Terciários Totais (FATTrz). Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV 2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMPr: 60,50 μ M (17,8 μ g/mL); Extrato bruto: 5,73 FAT: 9,82 μ g/mL) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV-2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV-2 e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste de Dunnett.

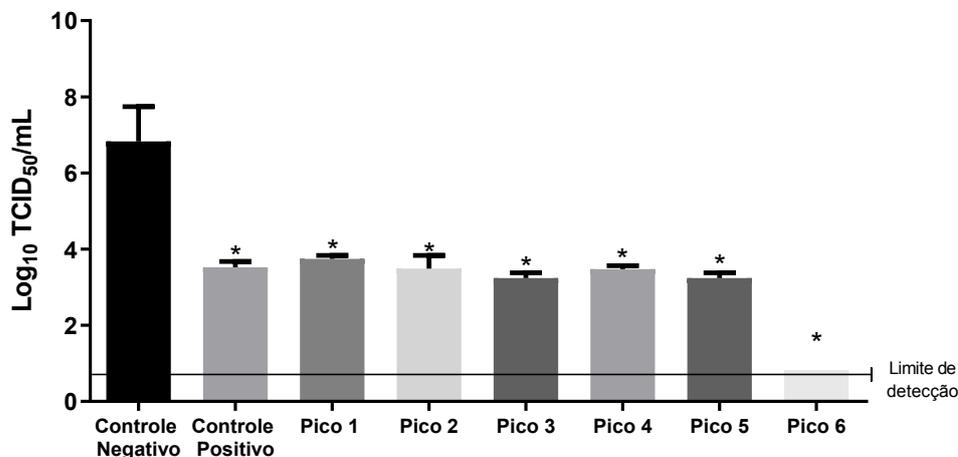


Figura 25. Análise da redução do título viral da DENV-2 após o tratamento com as subfrações 1-6 isoladas da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV 2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMPr: 60,50 μ M (17,8 μ g/mL); Pico 1: 5,73 Pico 2: 9,82 Pico 3: 9,58 Pico 4: 2,86 Pico 5: 18,11 Pico 6: 7,89 μ g/mL) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett.

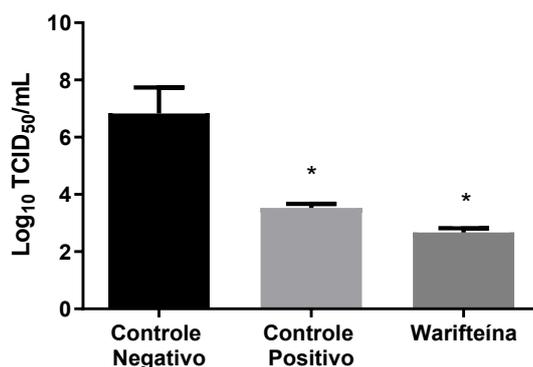


Figura 26. Análise da redução do título viral da DENV-2 após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMPr: 60,5 µM (17,8 µg/mL) e Warifteína: 10,49 µM) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett.

A Figura 26 mostra o resultado de inibição do título viral da warifteína, que demonstrou uma atividade antiviral maior que o controle positivo em uma concentração molar 5,7 vezes menor. Este efeito antiviral significativo da warifteína contra DENV-2 de certa forma nos surpreendeu frente ao resultado negativo obtido por Leite e colaboradores (Leite *et al.*, 2016), que recentemente relataram ausência de efeito antiviral frente ao vírus da Dengue para este alcaloide. Entretanto, uma possível explicação pode estar relacionada a forma de preparação da amostra. No nosso caso as amostras foram solubilizadas em DMSO, um solvente que atua como carreador celular, enquanto que no trabalho de Leite e colaboradores o alcaloide foi solubilizado em ácido clorídrico 0,1N, formando assim um sal cloridrato desta base terciária, o que pode ter dificultado o transporte do alcaloide para o meio intracelular.

Como o efeito do pico 6 (metilwarifteína) na redução do título viral frente ao DENV-2 (Figura 25) foi o mais potente entre as subfrações testadas e considerando que este efeito atingiu o limite de detecção do método, foi necessário testar concentrações mais baixas desta subfração para que fosse possível a estimativa posterior da CI₅₀ desta subfração. A Figura 27 mostra os resultados para concentrações iguais a CC₂₀, ½ da CC₂₀, ¼ da CC₂₀ e 1/8 da CC₂₀ desta subfração. A metilwarifteína mostrou um efeito antiviral potente e dependente da concentração, atingindo cerca de 84% de inibição do título viral em uma concentração de 7,8

$\mu\text{g/mL}$, enquanto o controle positivo (6MMPr) atingiu apenas cerca de 40% de inibição com uma concentração 2,3 vezes maior. Por esta razão, a metilwarifteína e a warifteína foram escolhidas para avaliação do efeito citopático em células Vero na etapa seguinte.

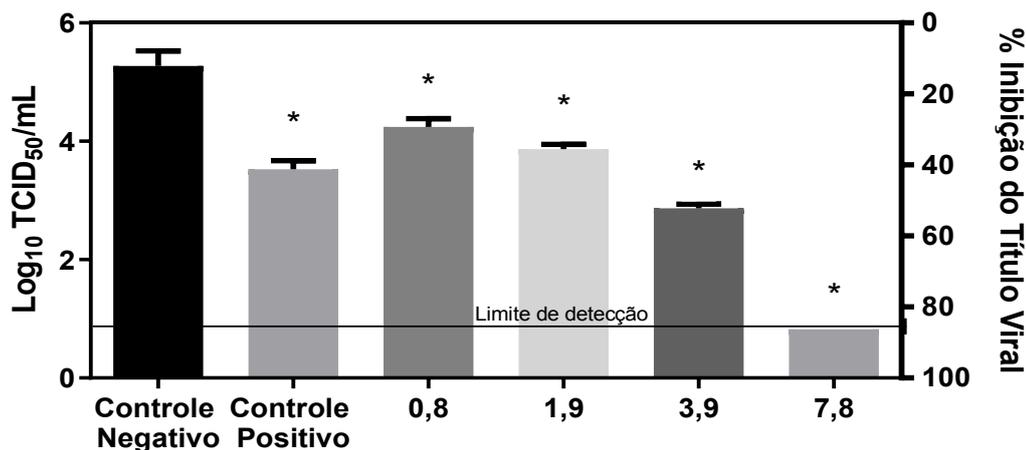


Figura 27. Análise do título viral da DENV-2 após o tratamento com diferentes concentrações da subfração 6 (metilwarifteína) isolada da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV 2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ do 6MMPr: 60,5 μM (17,8 $\mu\text{g/mL}$); CC₂₀: 7,8 $\mu\text{g/mL}$; 1/2: 3,9 $\mu\text{g/mL}$; 1/4: 1,9 $\mu\text{g/mL}$ e 1/8: 0,8 $\mu\text{g/mL}$ do pico 6 por 120 horas. O DENV-2 corresponde ao controle negativo enquanto que o 6MMPr corresponde ao controle positivo. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão do título viral em TCID₅₀ (Limite de detecção: 0,824 TCID₅₀) e réplicas biológicas. * $p < 0,05$ Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.

Com os resultados obtidos nos testes acima, foi possível calcular o valor de IC₅₀ para a (metilwarifteína) e para a warifteína frente ao vírus DENV-2, conforme mostrado na Tabela 6 abaixo, e também o índice de seletividade (IS).

Tabela 6. Valores de IC₅₀ e IS para warifteína e para a metilwarifteína frente a infecção de células Vero com DENV-2

	CC ₂₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Metilwarifteína	7,89	21,49	2,0	10,74
Warifteína	10,49 (µM)	150,3 (µM)	1,3 (µM)	115,6

6.2.2. Análise da Redução do Título Viral Frente ao ZKV

Extratos, subfrações, metilwarifteína e a warifteína obtidas da *C. sympodialis* também apresentaram atividade frente ao ZKV. A Figura 28 mostra o efeito do extrato etanólico bruto dos rizomas, e da Fração de Alcaloides Terciários Totais dos rizomas (FATTrz) sobre o título viral após infecção de células Vero com ZKV. Ambos mostraram ser capazes de reduzir de forma significativa o título viral.

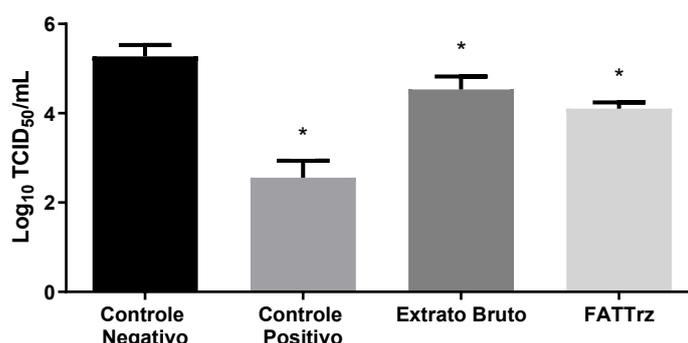


Figura 28. Análise da redução do título viral do ZKV após o tratamento com as amostras obtidas da *Cissampelos sympodialis*: extrato bruto, Fração de Alcaloides Terciários Totais (FATTrz). Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMPr: 60,5 µM (17,8 µg/mL); Extrato bruto: 5,730 µg/mL e FAT: 9,820 µg/mL) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZKV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett.

A Figura 29 abaixo mostra o efeito das subfrações sobre o título viral na infecção de células Vero por ZKV. Podemos observar que a subfração 5 foi a mais ativa entre as testadas, atingindo um efeito de redução comparável ao controle positivo. Esta subfração é rica em warifteína, que também foi testada (Figura 30) e demonstrou uma atividade significativa frente ao ZKV, com uma inibição de cerca de 22% a uma concentração molar 5,7x menor que o controle positivo. Até onde pudemos verificar na literatura, a warifteína não havia ainda sido testada frente ao ZKV. Dado o efeito potente deste alcaloide frente ao ZKV relatado aqui, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar o potencial deste composto ou de seus análogos estruturais como potencial tratamento antiviral para o ZKV. O índice de seletividade para a warifteína frente ao ZKV (Tabela 7) foi menor do que aquele determinado para a infecção com DENV-2. Esperamos que outras moléculas de núcleo isoquinolínico possam ser testadas na busca de protótipos com melhor seletividade.

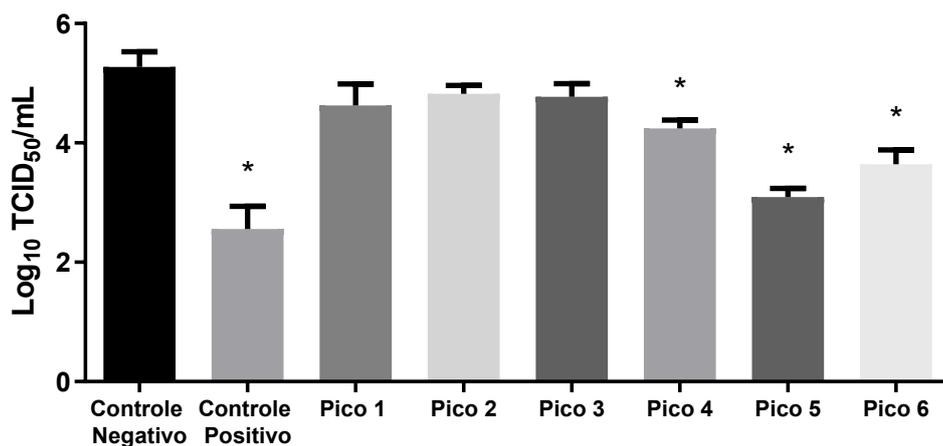


Figura 29. Análise da redução do título viral do ZKV após o tratamento com os picos (subfrações) 1-6 isolados da milona. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMPr: 60,5 µM (17,8 µg/mL); Pico 1: 5,730 µg/mL e Pico 2: 9,820 µg/mL Pico 3: 9,580 µg/mL; Pico 4: 2,865 µg/mL; Pico 5: 18,11 µg/mL; Pico 6: 7,894 µg/mL.) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZKV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett.

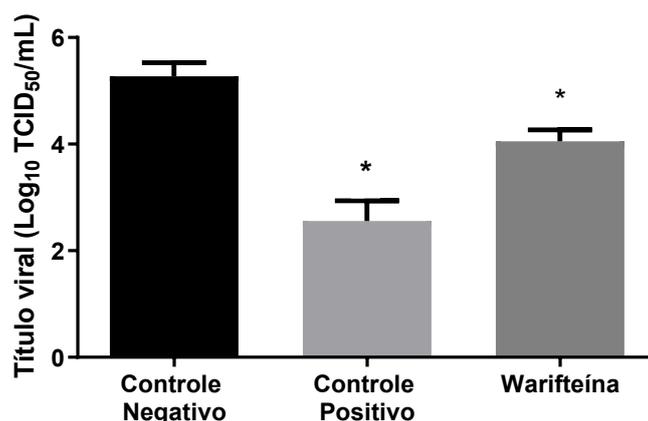


Figura 30. Análise da redução do título viral do ZKV após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada composto (6MMP: 60,5 µM (17,8 µg/mL) e Warifteína: 10,49 µM) e incubadas por 72 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZKV e tratadas com o 6MMP. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID₅₀ de 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$. ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett.

Tabela 7. Valores de IC₅₀ e IS para warifteína frente a infecção de células Vero com ZKV

	CC ₂₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
Warifteína	10,49	150,3	2,2	68,3

6.3. Análise de Redução do Efeito Citopático

6.3.1. Análise de Redução do Efeito Citopático Promovido por DENV-2

Após os ensaios de redução do título antiviral, as amostras mais promissoras (subfração 5 e 6), warifteína e metilwarifteína frente à infecção por DENV-2 e warifteína frente à infecção por ZKV) foram selecionadas para avaliação da inibição do efeito citopático. Neste ensaio, a cultura de células é avaliada de forma visual para verificar se as amostras são capazes de inibir o efeito citopático dos vírus sobre a cultura de células Vero, prevenindo a lise celular e preservando o tapete de células. Para isso, concentração correspondente a CC₂₀ de cada uma

das substâncias isoladas da *Cissampelos sympodialis*, e a warifteína foram utilizadas. Nestes ensaios, células Vero confluentes foram inoculadas com 0,1 MOI (MOI=Multiplicidade de Infecção, que é a proporção entre o número de partículas virais para o número células) de DENV-2, tratadas com as diferentes subtrações da FATTrz e o 6MMPr, e incubadas por 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O efeito antiviral neste caso pode ser evidenciado pela redução do número de células mortas por citólise, e pela preservação da morfologia normal do tapete celular (Li *et al.*, 2012; Sherman *et al.*, 2019). A coloração do meio também é de fundamental importância, além desses outros indicadores, pois indica o nível de acidez resultante do consumo de nutrientes, que está diretamente relacionado com atividade metabólica em um maior ou menor nível (Sherman *et al.*, 2019). Neste caso, a sobrevivência e proliferação celular é indicada pela redução do sal tetrazólico MTT, que ocorre com a participação de uma enzima mitocondrial redutase e o cofator NADPH, e nesse processo há mudança de uma coloração amarela para violeta púrpura, indicando um grau de ativação e detecção de células viáveis.

A Figura 31 mostra a inibição do efeito citopático do DENV-2 sobre células Vero promovido pela metilwarifteína, que foi avaliada na sua CC₂₀. Pode-se observar que ela foi capaz de inibir o efeito citopático do vírus promovendo uma redução do efeito citopático comparável ao controle, e com uma preservação do tapete de células inclusive maior que o 6MMPr.

A Figura 32 mostra a inibição do efeito citopático do DENV-2 sobre células Vero promovido pela warifteína, isolada a partir da FATTrz. Este efeito foi maior que aquele promovido pelo controle positivo como pode ser observado pela maior redução do MTT com a cultura de células com coloração violeta púrpura mais intensa, efeito este obtido em uma concentração molar 5,7 vezes menor que o controle positivo, mostrando assim um potente efeito antiviral.

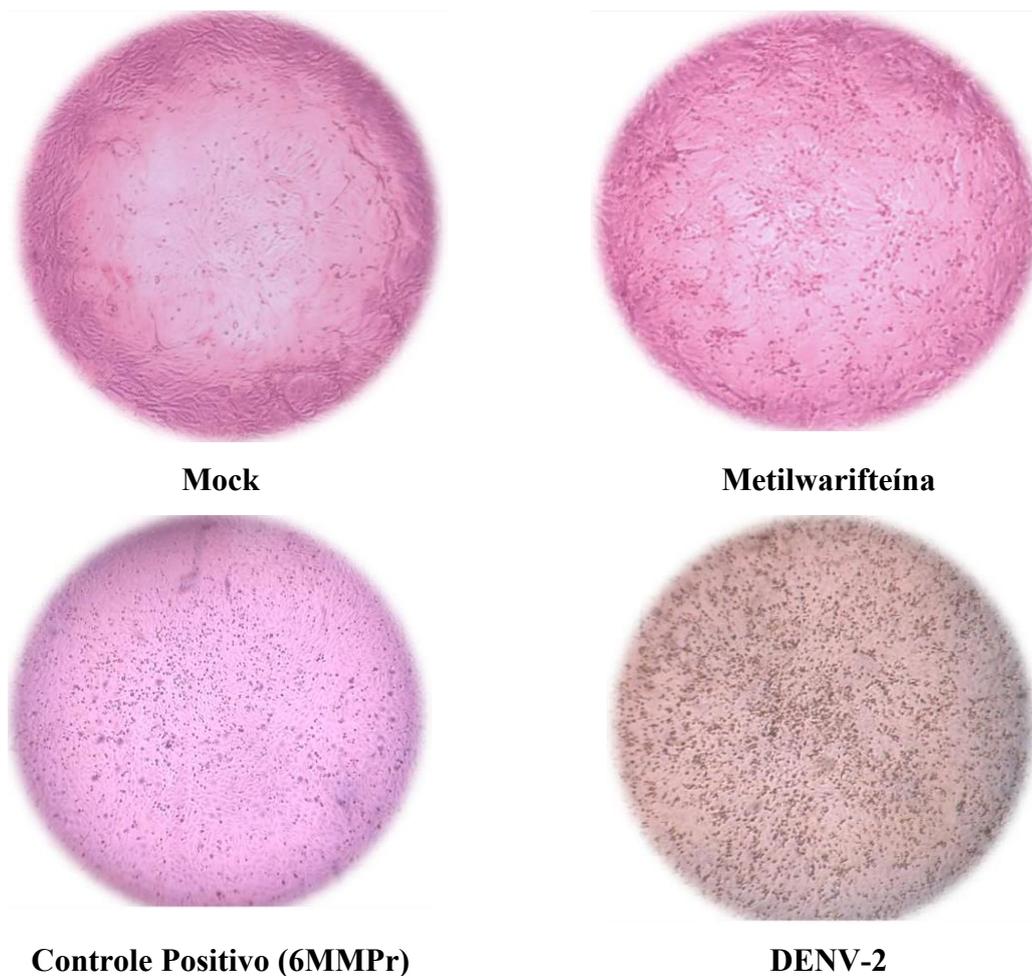


Figura 31. Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com a subfração 6 (metilwarifteína), isolada da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV 2 por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao CC_{20} de cada amostra (6MMPr: $60,5 \mu\text{M}$ ($17,8 \mu\text{g/mL}$) e metilwarifteína: $7,894 \mu\text{g/mL}$.) e incubadas por 72 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV-2 e tratadas com o 6MMPr. Controle DENV-2 corresponde a células cultivadas em meio DMEM e infectadas com DENV-2.

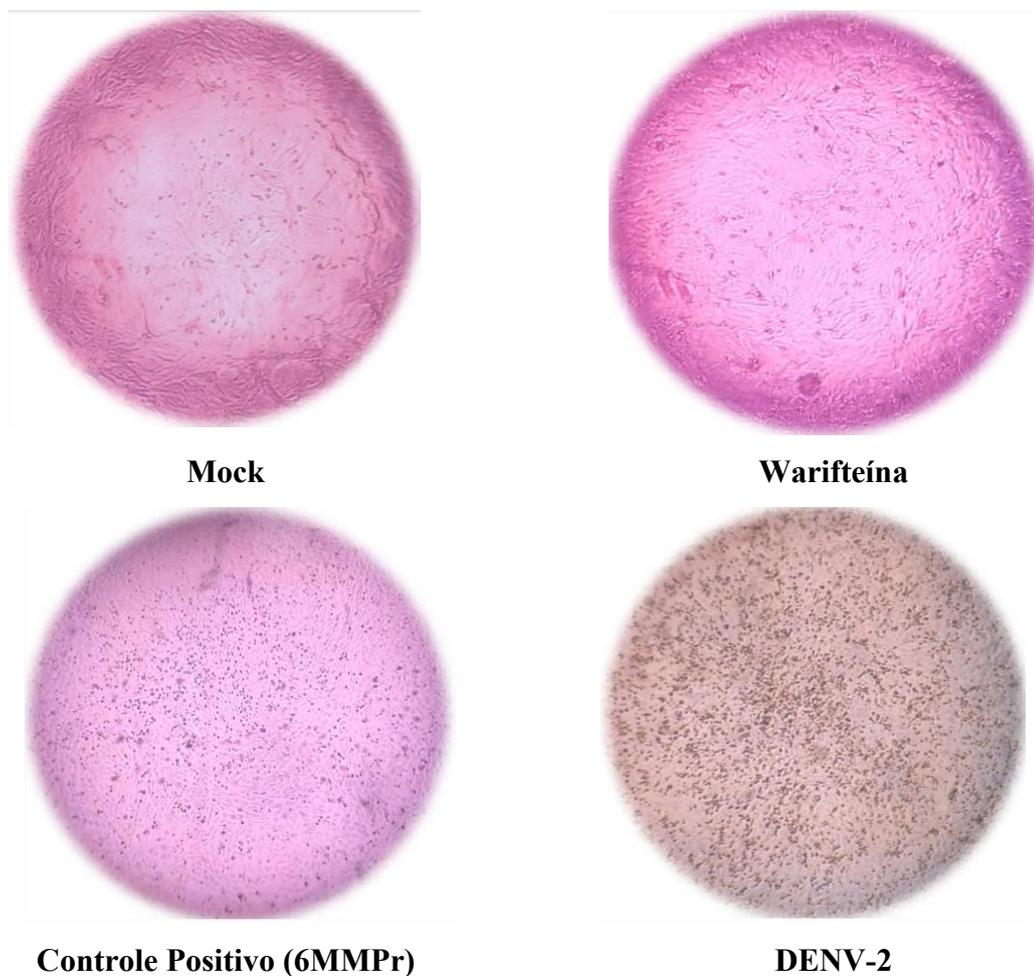


Figura 32. Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com a warifteína, isolada da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV 2 por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao CC₂₀ de cada amostra (6MMPr: 60,5 μ M e Warifteína: 10,49 μ M) e incubadas por 72 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV-2 e tratadas com o 6MMPr.

6.3.2. Análise de Redução do Efeito Citopático Promovido por ZKV

Assim como para o DENV-2, a warifteína foi capaz de inibir também o efeito citopático promovido pelo ZKV (Figura 33). Esta redução do efeito citopático se mostrou mais significativa que o controle 6-MMPr, que foi recentemente caracterizado pelo grupo liderado pelo prof. Lindomar Pena, da Fiocruz-PE como a primeira molécula com atividade antiviral

comprovada frente ao ZKV (De Carvalho et al., 2017). Os efeitos de redução do título viral e de redução do efeito citopático demonstrados até o momento, mostram que a warifteína é uma molécula promissora para ensaios adicionais e, embora não possua um índice de seletividade comparável aos antivirais de uso corrente (geralmente com IS entre 500-1000), pode servir de protótipo para modificação estrutural em buscas de moléculas com perfil de seletividade melhores e ainda, como ferramenta farmacológica para se estudar o mecanismo de ação antiviral e potencial descoberta de novos alvos moleculares para o tratamento desta importante arbovirose.

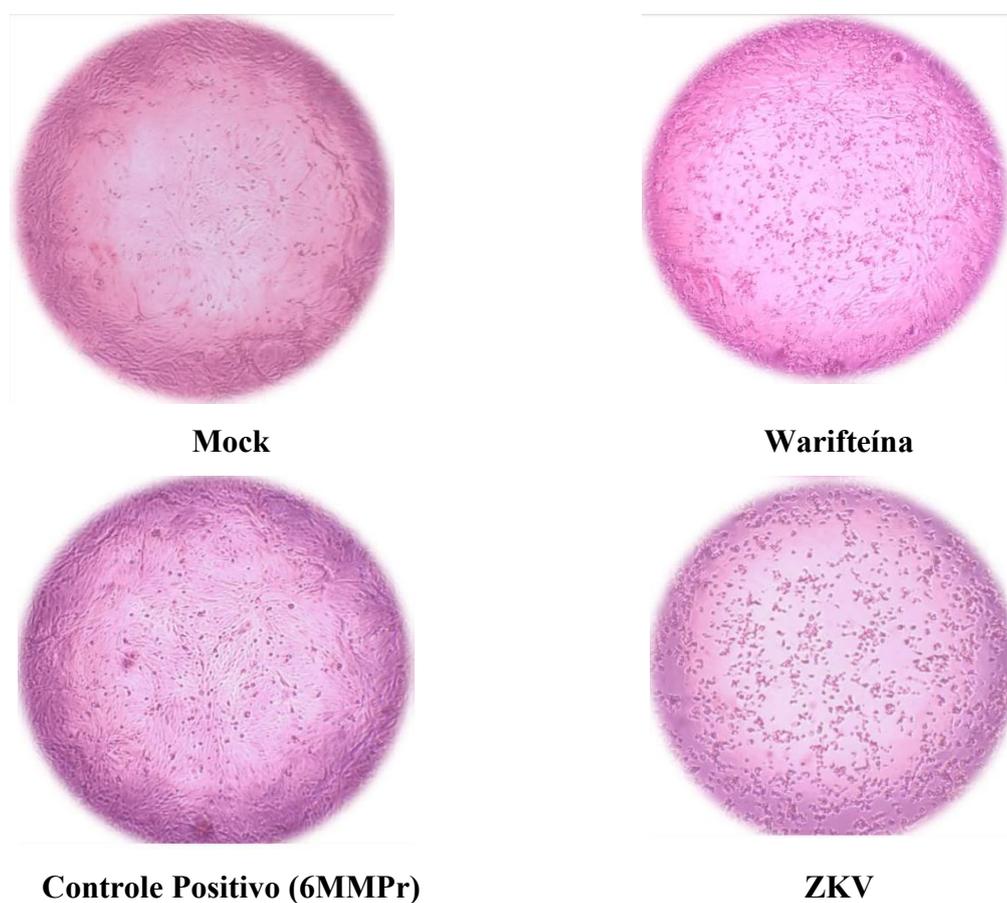


Figura 33. Redução do efeito citopático característico do vírus ZKV após tratamento com a warifteína, isolada da FATTrz. Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com ZKV por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao CC_{20} de cada amostra (6MMPPr: 60,5 μ M e Warifteína: 10,49 μ M) e incubadas por 72 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM, enquanto que o

controle positivo corresponde a células infectadas com ZKV e tratadas com o 6MMPr. O controle ZKV corresponde as células infectadas com ZKV que não receberam tratamento..

7. CONCLUSÃO

O referido trabalho atingiu seus objetivos, visto que foi obtida a FATT das raízes da *Cissampelos sympodialis*, que posteriormente foram separadas por CLAE-prep, o que permitiu o isolamento de seis possíveis alcaloides.

Houve a caracterização de duas das seis substâncias isoladas por RMN, que foi identificada através de comparação com os dados da literatura como o alcaloide bisbenzilisoquinolínico warifteína. e metilwarifteína.

Os testes de atividade antiviral mostraram que a warifteína e a metilwarifteína foram capazes de reduzir, de forma significativa e dependente da concentração, os títulos virais da infecção de células Vero com DENV-2, sendo ambas mais potente do que o controle positivo, o ribosídeo da 6-metilmercaptapurina (6-MMPPr).

De forma análoga, a warifteína foi capaz de provocar redução, significativa e dependente da concentração do título viral, da infecção de células Vero com ZKV, de forma mais potente do que o controle positivo, o ribosídeo da 6-metilmercaptapurina (6-MMPPr).

A warifteína e a metilwarifteína foram capazes de inibir o efeito citopático promovido pelo DENV-2 sob células Vero, de forma comparável ao controle positivo em concentrações molares menores.

A warifteína foi capaz de inibir o efeito citopático promovido pelo ZKV sob células Vero, de forma comparável ao controle positivo em concentrações molares menores.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a warifteína e outras substâncias que estão em processo de identificação, obtidas da FATTTrz de *C. sympodialis* são moléculas com promissora atividade antiviral contra DENV-2 e ZKV e podem servir para o desenvolvimento de análogos estruturais com melhor perfil de seletividade ou servir de ferramentas farmacológicas para estudo da infecção viral destes importantes arbovírus.

8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 10, p. 1533-1549, 2009.
- ACOSTA, E. G.; TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Cell entry of dengue virus. **Future Virol.**, v. 3, n. 5, p. 471-479, 2008.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 18(1), p. 102 - 107, 2008.
- ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl** 1994. Programa de Pósgraduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. In: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica., Universidade Federal da Paraíba, Brazil., Paraíba.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PECANHA, L. M. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 11, p. 1511-22, Nov 2003.
- AZIZ, H. et al. Zika virus: Global health challenge, threat and current situation. **J Med Virol**, v. 89, n. 6, p. 943-951, Jun 2017.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. D. F.; GEORGE, T. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **J. Braz. Assoc. Advanc. Science**, v. 49, n. 5-6, p. 386-394, 1997.
- BARRROWS, N. J. et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. **Chem. Rev.**, v. 118, n. 8, p. 4448-4482, 2018.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 7, p. 1152-60, Jul 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R. A. et al. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **Int. Immunopharmacol.**, v. 13(2), p. 148-155, 2012.

BOLDESCU, V. et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 8, p. 565-586, Aug 2017.

BOTTING, C.; KUHN, R. J. Novel approaches to flavivirus drug discovery. **Expert. Opin. Drug. Discov.**, v. 7, n. 5, p. 417-428, 2012.

CAVALCANTE, H. M. M. R. et al. Cardiovascular effects elicited by milonine, a new 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 108(2), p. 122-130, 2011.

CERQUEIRA-LIMA, A. T. et al. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Curr. Drug. Targets**, v. 11, n. 11, p. 1458-67, Nov 2010.

CORTES, S. F. D. A.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Minispermaceae). **Phytother. Res.**, v. 9(8), p. 579-583, 1995.

COSTA, A. G. et al. Dengue: epidemiological aspects and the first outbreak in the Middle Solimões Region of Coari in the State of Amazonas from 2008 to 2009. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 4, p. 471-474, 2011.

COUDEVILLE, L. et al. Potential impact of dengue vaccination: Insights from two large-scale phase III trials with a tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 34, n. 50, p. 6426-6435, 2016.

DE CARVALHO, O. V.; FÉLIX, D. M.; DE MENDONÇA, L. R. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 50, n. 6, p. 718-725, 2017.

DE F. CORTES, S. et al. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (menispermaceae). **Phytother. Res.**, v. 9, n. 8, p. 579-583, 1995.

DE FREITAS, M. R. Alcaloides isolados das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl **In: Programa de Pósgraduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de ciências da saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1994.**

DE FREITAS, M. R. et al. 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). **J Pharm Pharmacol**, v. 48, n. 3, p. 332-6, Mar 1996.

DE FREITAS, M. R. et al. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1553-1555, 1995/11/01/ 1995.

DE LIRA, G. A. et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 356-8, Jul 2002.

DECIT, D. D. C. E. T. D. M. D. S. [Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health]. **Rev Saúde Publ.**, v. 44, n. 1, p. 200-2, Feb 2010.

EICHLER, A. W. *Flora Brasiliensis* v. 13, p. 121, 1887.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Antiviral Product Development. p. <<https://www.federalregister.gov/documents/2006/06/05/E6-06/05/E6-869> 8635/guidance-for-industry-on-antiviral-product-development-conducting-and-submitting-virology-studies-to>, 2006. Acesso em: Agosto.

FEITOSA, E. M. A. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** v. 20(2), p. 375-378, 2009.

FELGINES, C. et al. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro and sulfoconjugates in humans. **J. Nutr**, v. 133, p. 1296-1301, 2003.

FERNANDEZ, E.; DIAMOND, M. S. Vaccination strategies against Zika virus. **Curr. Opin. Virol.** v. 23, p. 59-67, 2017.

GARCÍA, L. L.; PADILLA, L.; CASTAÑO, J. C. Inhibitors compounds of the flavivirus replication process. **Virology J.**, v. 14, n. 1, p. 95, 2017.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1-13, 2017.

GUEDES, D. R.; PAIVA, M. H.; DONATO, M. M. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg. Microbes Infect.**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-65, Jan 31 2015.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **J. Chromatogr.** v. 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.

HU, Y.; SUN, L. Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other Flaviviruses. **ACS Infect. Dis.**, 2019.

JUCÁ, M. B. **Inibidores de transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves** 1998. (PhD). Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular - Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas

KUPCHAN, S. M. P.; FUJITA, E. Tumor inhibitors VI Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*, cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids v. 54, n. 4, p. 580-583, 1965.

LEITE, F. C. et al. *Cissampelos sympodialis* has anti-viral effect inhibiting dengue non-structural viral protein-1 and pro-inflammatory mediators. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v. 26, p. 502-506, 2016.

LI, Y. G. et al. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirology**, v. 56, n. 1, p. 6-12, 2012.

LIMA, T. F. et al. Warifteine, an alkaloid purified from *Cissampelos sympodialis*, inhibits neutrophil migration in vitro and in vivo. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 752923, 2014.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **J. Chromat. B.**, v. 689, n. 1, p. 221-237, 1997.

LIU, W. Y. et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis **Int. J. Mol. Sciences**, v. 11(11), p. 4750-4763, 2010.

LOPES, N. P.; NETO, L. G. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Quim. Nova**, v. 30, p. 374 - 381, 2007.

MARINHO, A. F. O. et al. ^1H and ^{13}C NMR assignments of two new isomeric bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Magn. Reson. Chem.**, v. 51(5), p. 312-315, 2013.

MEDEIROS, A. F. D. **Aplicação de Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência Preparativa para Isolamento de Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl, e Estudo Farmacocinético Preliminar de Warifteína.** 2013. 167 Doutorado Universidade Federal da Paraíba João Pessoa

MELO, P. S. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicol Lett**, v. 142, n. 1-2, p. 143-51, Apr 30 2003. ISSN 0378-4274 (Print)

0378-4274 (Linking).

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, R.; KEIFER, P. A. Warifteine and methylwarifteine: ^1H and ^{13}C assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.**, v. 41, p. 213-218, 2003.

NAWAWI, A. et al. Anti-herpes simplex virus activity of alkaloids isolated from *Stephania cepharantha*. **Biol Pharm Bull**, v. 22, n. 3, p. 268-74, Mar 1999. ISSN 0918-6158 (Print)

0918-6158 (Linking).

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West. J. Emerg. Med.**, v. 17, p. 671- 679, 2016a.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J Emerg Med**, v. 17, n. 6, p. 671-679, Nov 2016b.

PREVENTION., C. C. D. C. E. P. D. D.-C. F. D. C. A. **Microcefalia e outros defeitos congênitos.**: <https://portugues.cdc.gov/Zika/healtheffects/birth_defects.html> 2018.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JADIM, I. C. S. F. Métodos de extração e ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Epidemiol.**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RIBEIRO, B. N. F. et al. Congenital Zika syndrome and neuroimaging findings: what do we know so far? **Radiol Bras.**, v. 50, n. 5, p. 314-322, 2017.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-33, Aug 23 1985.

SELVEY, L. A.; SPEERS, D. J.; & SMITH, D. W. Long term outcomes of Murray Valley encephalitis cases in Western Australia: what have we learnt? **Intern. Med. J.** v. 46, n. 2, p. 193-201, 2016.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Rev Med Virol**, v. 29, n. 4, p. e2050, Jul 2019.

SHERMAN, K. E. et al. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0214016, 2019.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **J Infect Dis**, v. 216, n. suppl_10, p. S935-S944, Dec 16 2017.

SOOD, R. et al. Cissampelos pareira Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 12, p. e0004255, Dec 2015.

THOMAS, G. et al. Bronchodilator activity of an aqueous fraction of an ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine**, v. 4, n. 3, p. 233-8, Sep 1997.

VIEIRA, G. C. et al. Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-regulates airway allergic reaction by reducing lung CD3+ T cells. **Phytother Res**, v. 27, n. 6, p. 916-25, Jun 2013. ISSN 1099-1573 (Electronic)

0951-418X (Linking).

WAN, Z. et al. Fangchinoline inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by interfering with gp160 proteolytic processing. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39225, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking).

ZAIDI, M. B. et al. Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and Dengue viruses in the Mexican population. **Acta Trop**, v. 201, p. 105201, Sep 25 2019.

ZENG, X. et al. Isolation and structure determination of anti-influenza component from *Mahonia bealei*. **J Ethnopharmacol**, v. 108, n. 3, p. 317-9, Dec 6 2006.