

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Alessandra de Oliveira Pereira

Aristolochia triangularis Cham.: **ANÁLISE FITOQUÍMICA, ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIMICOBACTERIANA E DE INIBIÇÃO
ENZIMÁTICA**

Santa Maria, RS
2018

Alessandra de Oliveira Pereira

Aristolochia triangularis Cham.: **ANÁLISE FITOQUÍMICA, ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIMICOBACTERIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ionara Irion Dalcol

Santa Maria, RS
2018

Pereira, Alessandra de Oliveira

Aristolochia triangularis Cham.: ANÁLISE FITOQUÍMICA,
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIMICOBACTERIANA E DE
INIBIÇÃO ENZIMÁTICA / Alessandra de Oliveira Pereira.-
2018.

138 p.; 30 cm

Orientadora: Ionara Irion Dalcol

Coorientador: Ademir Farias Morel

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. *Aristolochia triangularis* Cham. 2. Antimicrobianos
3. Enzimas I. Dalcol, Ionara Irion II. Morel, Ademir
Farias III. Título.

Alessandra de Oliveira Pereira

Aristolochia triangularis Cham.: **ANÁLISE FITOQUÍMICA, ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTIMICOBACTERIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovada em 15 de março de 2018:



Ionara Irion Dalcol, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Neusa Fernandes de Moura, Dra. (FURG)



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Adalmiro e Loreci,
por não medirem esforços em nossa criação e educação.
Obrigada por todo amor, carinho, respeito, dedicação,
ensinamentos e por serem guias nesta caminhada.
Se hoje chego até aqui, devo a vocês tudo que tenho.*

*À minha irmã Mariane e ao meu cunhado Marcio,
pela amizade, amor, companheirismo e conhecimentos trocados.
Pelos momentos únicos de convivência que compartilhamos,
experiências, conquistas e dias incríveis.
Que possamos sempre ser apoio e confiança.
Grata por ter vocês ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do Universo e de todas as coisas, por ser luz a guiar meus passos, pela oportunidade de mais esta jornada e por todo aprendizado a cada novo dia.

A minha família, tios, tias, primos e primas, pelo apoio, carinho e amizade em todos os momentos. Em especial aos tios Paulino e Adão, pais de coração, e as tias Onira, Tânia, Fátima e Helena, por todo amor, preocupação, força e suporte em momentos difíceis e de alegrias. A prima Aline, por ser exemplo de garra e infinito amor, pela amizade e preocupações de irmã. Obrigada por todo apoio que vocês me deram, sem dúvidas foi de extrema importância até a conclusão deste trabalho. Amo muito vocês!

A prof^a Ionara Dalcol, orientadora e amiga, pela oportunidade de em 2012 começar como IC no lab NPPN, e seguir até 2018 com a conclusão do mestrado. Pelas inúmeras horas de conversas e aprendizados, pelos trabalhos realizados, viagens, almoços, pela paciência, carinho e apoio em todos estes anos. Obrigada prof por compartilhar tantos ensinamentos, pela ajuda no lab, nas escritas e imagens dos trabalhos.

Aos professores do curso de Farmácia e da Pós-graduação em Farmacologia da UFSM, pelos conhecimentos trocados e todo o empenho em nossa formação.

A mestra, quase doutora, colega, amiga, companheira e confidente Janaína Ávila, por todos os momentos que passamos juntas, sempre compartilhando as dificuldades, as alegrias, conquistas e derrotas. Muito obrigada por me ensinar tanto no lab e na vida, pelas puxadas de orelha, pela ajuda e aconselhamentos, pelos lanches e mate me esperando, pelo carinho e risadas, muitas risadas. Vai ser bem estranho trabalhar sem a Jana agora...Que nosso convívio tenha construído laços indestrutíveis, e que nossa amizade prevaleça em qualquer lugar, a qualquer tempo.

As demais colegas e amigas do laboratório 2014 que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto, Maura, Nalin, Vanessa e Lucimara. Pelos momentos compartilhados, tantas risadas, ensinamentos, idas no Almox e amizade construída.

Aos colegas de NPPN, Frederico, Adriano e Adriana, pela realização das leituras de RMN, empréstimos de materiais e momentos compartilhados. As colegas Gabrielle e Gisele, pela ajuda incansável nos ensaios antimicrobianos, pelas conversas, apoio e ideias compartilhadas, muito obrigada!

Aos professores do grupo NPPN, Dr. Ademir Farias Morel e Dr. Marco Aurélio Mostardeiro, pelos ensinamentos, suporte técnico e ajuda nos trabalhos desenvolvidos. Ao

técnico de laboratório Ubiratan Flores da Silva, pelas leituras de HPLC, CG e Massa de alta, e pela paciência e ensinamentos.

Aos colegas farmacêuticos da 106^a e 107^a turmas de Farmácia da UFSM, pelos dias de convívio, risadas e aprendizados. Aos demais colegas deste curso que de alguma forma contribuíram em minha caminhada, em especial ao colega Fallon Siqueira pelo ensaio das atividades antimicrobianas apresentado neste trabalho. Aos alunos de Farmácia que tive a oportunidade de ministrar as cadeiras de Docência, obrigada pela oportunidade de ensinar tão pouco a vocês, mas que foi muito importante para mim.

Aos amigos Maurício, Matheus, Endrigo, Thaís, Danielli, Vanessa, Patrícia, Gabriela, Karina e Eliseu, por todo apoio, amizade, carinho, companheirismo e por me aguentarem em tantas aventuras. Obrigada pelos momentos que compartilhamos, de risadas, alegrias e dificuldades. Sou muito feliz por ter vocês no meu caminho!

Aos colegas, amigos, confidentes e parceiros Vinícius e Karine, me faltam palavras para agradecer por tanto apoio e carinho. Vocês foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho, pois em todos os momentos pude contar com a amizade de vocês. Muito obrigada por me acolherem e serem esteio em cada dificuldade, pelos momentos divertidos e de alegrias que compartilhamos, por acreditarem e confiarem em mim, me incentivando a buscar meus objetivos e sendo exemplos de pessoas incríveis. Amo vocês!

A Universidade Federal de Santa Maria por ser minha segunda casa em todos estes anos de ensino. Aos funcionários deste instituição, pelos serviços prestados.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Mas se vos peço, também vos dou e dou muito. Convido vos para um grande banquete, e vos forneço a árvore onde vos saciareis. Vede como é bela, como está carregada de flores e de frutos! Ide, ide, colhei, apanhai todos os frutos dessa bela árvore que chama beneficência. Em lugar dos ramos que houverdes tirado, fixarei todas as boas ações que fizerdes e levarei essa árvore a Deus, para que a carregue de novo, porque a beneficência é inesgotável.

(Allan Kardec)

São tão parecidas, as almas e as plantas.

(Luiz Marengo)

RESUMO

Aristolochia triangularis Cham.: ANÁLISE FITOQUÍMICA, ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIMICOBACTERIANA E DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

AUTORA: Alessandra de Oliveira Pereira

ORIENTADORA: Ionara Irion Dalcol

O gênero *Aristolochia* é muito utilizado na medicina popular devido as suas propriedades desintoxicante, anestésica e antiviral. No Brasil, a espécie *Aristolochia triangularis* Cham., conhecida popularmente como “cipó mil-homens”, é utilizada como antitérmica, antisséptica, sedativa, antiofídica e anti-inflamatória. Estudos relatam o isolamento de alcaloides, taninos, lignanas e terpenos de *A. triangularis*. Dentre as enfermidades que trazem preocupações a saúde mundial estão os distúrbios do sistema nervoso central e as doenças infecciosas. A depressão, esquizofrenia e a doença de Alzheimer não apresentam cura até os dias de hoje, e seus sintomas são amenizados através de diversas terapias. Porém, devido aos efeitos adversos e a toxicidade dos medicamentos disponíveis na clínica, a busca por novas substâncias ativas para tratar estas doenças é de extrema importância. Sabe-se que as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e prolil oligopeptidase (POP) encontram-se com seus níveis alterados nestes distúrbios. Já as doenças infecciosas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos pela população, tornaram-se um grave problema, principalmente para pacientes imunocomprometidos. A multirresistência dos microrganismos frente aos tratamentos já conhecidos faz com que a pesquisa por novos fármacos ganhe relevância. Considerando que as plantas medicinais apresentam inúmeros compostos ainda desconhecidos em suas potencialidades, este trabalho teve por objetivo preparar extratos e frações de *A. triangularis*, isolar e identificar seus metabólitos secundários, avaliar a atividade inibitória frente às enzimas AChE e POP, e avaliar as atividades antimicrobiana e antimicobacteriana de extratos, frações e substâncias puras isoladas. Como resultado, obtiveram-se nove compostos isolados, entre eles três diterpenos (ent-caur-16-en-19-al (1), ácido (-)-caur-16-en-19-oico (4), ent-caurano-16 β ,17-diol (5)), quatro lignanas (zuonina B (2), diidroclubebina (6), α e β -clubebinas (7a + 7b)), um sequiterpeno (nerolidol (3)) e um alcalóide (aristolactama BII (8)). Também obteve-se a partir do diterpeno (1) o derivado oxima 9. O potencial antimicrobiano dos compostos isolados foi estudado, verificando-se que o composto (4) foi o mais ativo na inibição das bactérias testadas, principalmente frente à *Shigella sonnei*. Este diterpeno também apresentou excelente atividade bacteriostática e bactericida (CIM/CLM - 3.1/6.2 $\mu\text{g/mL}$) contra *Enterobacter aerogenes*. A maior atividade antifúngica observada foi contra *Candida krusei*, onde os compostos 4 e 8 inibiram significativamente o crescimento do fungo (CIM - 6,2 $\mu\text{g/mL}$). Todos os extratos, frações e substâncias testadas apresentaram importante potencial antimicobacteriano, principalmente contra *Mycobacterium abscessus*. O composto nerolidol (3) apresentou a maior atividade de inibição das micobactérias testadas (CIM de 4,9-19,9 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios frente a AChE demonstraram um bom resultado de inibição da enzima pela fração etérea ácida, com 48% de inibição na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Frente a POP, extrato e frações de *A. triangularis* apresentaram alta capacidade de inibição, com valores de 70-92% (a 200 $\mu\text{g/mL}$). Entre os compostos isolados, diidroclubebina (6) mostrou maior atividade inibitória desta enzima (150 $\mu\text{g/mL}$), apresentando IC50 de 15,2 \pm 0,5 μM .

Palavras-chave: *Aristolochia triangularis* Cham. Antimicrobianos. Antimicobacterianos. Acetilcolinesterase. Prolil oligopeptidase.

ABSTRACT

Aristolochia triangularis Cham.: PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, ANTIMICROBIAL, ANTIMYCOBACTERIAL AND ENZYMATIC INHIBITION ACTIVITIES

AUTHOR: Alessandra de Oliveira Pereira
ADVISOR: Ionara Irion Dalcol

The genus *Aristolochia* is widely used in folk medicine because of its detoxifying, anesthetic and antiviral properties. In Brazil, the species *Aristolochia triangularis* Cham., popularly known as "cipó mil-homens", is used as antipyretic, antiseptic, sedative, antiofidic and anti-inflammatory. Studies report the isolation of alkaloids, tannins, lignans and terpenes of *A. triangularis*. Among the diseases that bring global health concerns are disorders of the central nervous system and infectious diseases. Depression, schizophrenia and Alzheimer's disease do not heal until today, and their symptoms are alleviated through various therapies. However, due to the adverse effects and toxicity of the drugs available in the clinic, the search for new active substances to treat these diseases is extremely important. It is known that the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and prolyl oligopeptidase (POP) have their altered levels in these disorders. Infectious diseases, due to the indiscriminate use of antimicrobials by the population, have become a serious problem, especially for immunocompromised patients. The multiresistance of the microorganisms against the already known treatments makes the research for new drugs gain relevance. Considering that medicinal plants have many compounds still unknown in their potentials, this work aimed to prepare extracts and fractions of *A. triangularis*, isolate and identify their secondary metabolites, evaluate the inhibitory activity against AChE and POP enzymes, and evaluate the activities antimicrobial and antimycobacterial properties of extracts, fractions and isolated pure substances. As a result, nine isolated compounds were obtained, among them three diterpenes (*ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**), (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) dihydrocubebin (**6**), α and β -cubebin (**7a** + **7b**)), a sesquiterpene (nerolidol (**3**)) and an alkaloid (aristolactam BII (**8**)). The oxime derivative **9** was also obtained from diterpene (**1**). The antimicrobial potential of the isolated compounds was studied, showing that compound (**4**) was the most active in the inhibition of the bacteria tested, mainly against *Shigella sonnei*. This diterpene also had excellent bacteriostatic and bactericidal activity (MIC/MLC - 3.1 / 6.2 $\mu\text{g/mL}$) against *Enterobacter aerogenes*. The highest antifungal activity was observed against *Candida krusei*, where compounds **4** and **8** significantly inhibited fungal growth (MIC - 6.2 $\mu\text{g/mL}$). All extracts, fractions and substances tested had an important antimycobacterial potential, especially against *Mycobacterium abscessus*. The compound nerolidol (**3**) showed the highest inhibition activity of the mycobacteria tested (MIC of 4.9-19.9 $\mu\text{g/mL}$). The AChE assays demonstrated a good enzyme inhibition result by the ethereal acid fraction, with 48% inhibition at the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. Compared to POP, *A. triangularis* extract and fractions showed high inhibition capacity, with values of 70-92% (at 200 $\mu\text{g/mL}$). Among the isolated compounds, dihydrocubebin (**6**) showed higher inhibitory activity of this enzyme (150 $\mu\text{g/mL}$), presenting IC_{50} of $15.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

Keywords: *Aristolochia triangularis* Cham. Antimicrobial. Antimycobacterial. Acetylcholinesterase. Prolyl oligopeptidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplos de metabólitos isolados do gênero <i>Aristolochia</i>	32
Figura 2 – <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	33
Figura 3 – Estrutura química da substância Aristoloquina.....	34
Figura 4 – Exemplos de inibidores da AChE de origem natural.....	36
Figura 5 – Exemplos de inibidores da POP de origem natural.....	39
Figura 6 – Processo de fracionamento de <i>A. triangularis</i>	116
Figura 7 – Reação de formação de oxima (9) a partir de ent-caur-16-en-19-al (1).....	120

MANUSCRITO 1

Figure 1 – Compounds 1-9 structures.....	72
---	----

MANUSCRITO 2

Figure 1 – Dihydrocubebin (6) IC ₅₀ against POP.....	114
--	-----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Table 1 – Antibacterial activity (MIC/MLC in $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	66
Table 2 - Antifungal activity (MIC/MLC in $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	68
Table 3 - Antimycobacterial activity (MIC in $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	70

MANUSCRITO 2

Table 1 - POP and AChE inhibition the extracts, fractions and secondary metabolites of <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	112
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASS	Ácido acetil-salicílico
AAs	Ácidos aristolóquicos
acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
CIM	Concentração inibitória mínima
CLM	Concentração letal mínima
DA	Doença de Alzheimer
EM	Extrato bruto metanólico
FAB	Fração acetato básica
FAq	Fração aquosa
FEA	Fração etérea ácida
FEB	Fração etérea básica
IC	Concentração inibitória
MCR	Micobactérias de crescimento rápido
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratories Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
POP	Protil oligopeptidase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS E FITOQUÍMICAS	30
3.1.1 Família Aristolochiaceae	30
3.1.2 Gênero <i>Aristolochia</i>	30
3.1.3 Espécie <i>Aristolochia triangularis</i> Cham.	33
3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	34
3.2.1 Atividade inibição enzimática	34
3.2.1.1 Acetilcolinesterase (AChE)	34
3.2.1.2 Prolil oligopeptidase (POP)	37
3.3.1 Atividade antimicrobiana e antimicobacteriana	39
3.3.1.1 <i>Microrganismos patógenos</i>	39
4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	44
4.1 MANUSCRITO 1	46
4.2 MANUSCRITO 2	104
5 DISCUSSÃO	116
6 CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais pela civilização humana vem sendo descrita há milhares de anos. Seja para o tratamento ou cura de enfermidades, produtos minerais, vegetais e animais foram implementando o arsenal terapêutico do homem (RATES, 2001). Uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais cita a ingestão de ervas e folhas para o tratamento de doenças e o alívio de dores (VIEGAS, 2006).

O uso empírico de diversas plantas e vegetais resultou em valiosas informações que foram sendo transmitidas através de gerações até o surgimento da escrita, que possibilitou o registro destes dados. Escrituras sagradas e registros que compõem o papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., descrevem 811 prescrições e mais de 700 drogas de origem vegetal. Além disso, o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais data de 500 a. C. e relata nomes, doses e indicações de usos (DUARTE, 2006; PINTO et al., 2002).

O conhecimento popular, uma vez registrado, foi sendo disseminado primeiramente entre as populações de baixo poder aquisitivo, onde as plantas medicinais eram utilizadas para o tratamento de doenças e em práticas religiosas e culturais (DUARTE, 2006; VIEGAS, 2006). Segundo Calixto (2000), a pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, conforme descreve a Organização Mundial de Saúde (OMS), fez com que cerca de 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependessem das plantas para os cuidados básicos de saúde. Assim, os tratamentos com plantas medicinais tornaram-se uma solução alternativa para os problemas de saúde em países da Ásia, África e América Latina (DUARTE, 2006).

Da mesma forma, os países desenvolvidos também se utilizam do conhecimento popular disseminado nos países em desenvolvimento. Alemanha, França e Itália representam os países europeus onde conforme Chen et al. (2016), existem mais de 1300 plantas medicinais em uso, sendo 90% destas de origem natural. Já nos Estados Unidos da América, de 150 medicamentos prescritos, 118 são de fontes naturais (CHEN et al., 2016). Porém, nesses países existem diretrizes adequadas para o registro e controle dos medicamentos de origem natural, havendo normas de certificação e controles rígidos de qualidade (CALIXTO, 2000; JUNIOR et al., 2005).

Diante dessas informações podemos observar a importância da terapia com plantas medicinais independentemente do tempo e do nível de desenvolvimento social. O interesse por recursos naturais, seus efeitos e mecanismos de ação ainda não conhecidos provocaram a curiosidade de pesquisadores pelo mundo todo, fazendo com que no final do século XIX e

começo do século XX as plantas medicinais passassem a serem estudadas como ferramentas científicas, sendo então seus compostos ativos isolados e identificados (SIMÕES et al., 2004).

Com a obtenção destes compostos, as indústrias farmacêuticas foram crescendo e aumentando a produção de novos fármacos. Apesar de ser a principal fonte de substâncias ativas, muitas vezes as plantas medicinais produzem pequenas quantidades de compostos, dificultando as produções em escala industrial. A partir disso, novos métodos foram sendo criados e dentre eles ganhou força a síntese orgânica. Como exemplo pode-se citar o ácido acetil-salicílico (AAS), pioneiro dos fármacos sintéticos, onde após anos de isolamentos de salicina da espécie *Salix alba*, pesquisas levaram a produção de diferentes salicilatos até a formulação que temos em uso nos dias de hoje (VIEGAS, 2006).

Atualmente, cerca de 40% dos fármacos disponíveis apresentam produtos naturais em suas formulações, como princípios ativos ou análogos inspirados nos mesmos (OLIVEIRA et al., 2012). Medicamentos antitumorais e antimicrobianos lideram a lista de formulações que contém derivados de produtos naturais, com cerca de 60% dos medicamentos disponíveis no mercado ou em estágios de ensaios clínicos (CALIXTO, 2000).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo com mais de 45 mil espécies de plantas (20% das espécies do planeta), além de milhares de espécies de algas, fungos e animais (DUTRA et al., 2016). O uso de extratos de plantas brasileiras e seus princípios ativos se destacam no tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC), alívio de dor, em processos de resposta imune e inflamação, doenças respiratórias, do trato gastrointestinal, doenças metabólicas, e também como agentes antimicrobianos e antimicobacterianos (DUARTE, 2006; DUTRA et al., 2016; NGUTA et al., 2015).

Acredita-se que as propriedades medicinais das plantas estão relacionadas aos seus componentes intrínsecos ativos, chamados metabólitos secundários, sintetizados pelas plantas por uma série de reações químicas. Os metabólitos primários são as substâncias consideradas essenciais para o organismo vegetal, relacionadas a sua constituição biológica e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários são as substâncias relacionadas aos processos de defesa, proliferação e adaptação, sendo importantes na interação das plantas com o meio ambiente que vivem. Entre os principais compostos secundários podemos citar os alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos (SIMÕES et al., 2004; EMBRAPA, 2010).

Considerando a importância das respostas terapêuticas das plantas medicinais, relacionadas principalmente com a presença de seus metabólitos secundários, e o extensivo uso popular no tratamento de diversas enfermidades a milhares de anos, se faz necessário o investimento em pesquisas científicas visando conhecer detalhadamente a composição destas

plantas. Sabe-se que muitas vezes existem além da presença de componentes benéficos para a saúde, compostos tóxicos, alérgicos, e com outros efeitos adversos altamente prejudiciais ao corpo humano (JUNIOR et al., 2005). Diante disso, é de suma importância o conhecimento científico a respeito das plantas de uso popular, buscando direcionar, prevenir e orientar o uso destes tratamentos alternativos.

Desta forma, o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), tem por objetivo, através de suas pesquisas, conhecer a composição química e as atividades farmacológicas de espécies nativas do Rio Grande do Sul. Os estudos se concentram em realizar uma prospecção fitoquímica das espécies, bem como executar o isolamento dos metabólitos secundários majoritários, identificá-los e analisar o potencial farmacológico de extratos, frações e substâncias.

Sabe-se que nos últimos anos a pesquisa por novos agentes antimicrobianos e antimicobacterianos tem ganhado força devido aos problemas de multirresistência aos medicamentos disponíveis no mercado. Juntamente ao processo evolutivo dos microrganismos, o consumo desenfreado de antibióticos em países desenvolvidos e em desenvolvimento tem resultado na resistência de populações de bactérias, fungos e micobactérias a diferentes classes de fármacos, gerando assim um grave problema de saúde pública (DUARTE, 2006). Os principais pacientes acometidos pelos microrganismos resistentes são aqueles envolvidos em infecções oportunistas, por serem pacientes imunologicamente fragilizados, pacientes em tratamento com quimioterápicos antineoplásicos, em casos de transplantes e na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (OSTROSKY et al., 2008). Através do uso popular de inúmeras espécies para o tratamento de infecções, e sabendo-se que as plantas são uma fonte inestimável de compostos, a busca por novas substâncias antimicrobianas e antimicobacterianas vem se tornando cada vez mais importante (DUARTE, 2006; NCUBE et al., 2012).

Além disso, o uso popular de plantas medicinais para o tratamento de transtornos mentais também desperta interesse para pesquisas relacionadas à inibição enzimática. Estudos demonstram que uma das enzimas relacionadas à doença de Alzheimer (DA), a acetilcolinesterase (AChE), encontra-se com sua atividade alterada levando a processos degenerativos no cérebro, resultando em problemas cognitivos e funcionais (MOTA et al., 2012). Esta doença caracteriza-se pela diminuição dos níveis plasmáticos de acetilcolina (ACh) nas fendas sinápticas devido ao excesso de AChE atuando neste local. Os tratamentos utilizados atualmente para esta doença mostram-se pouco efetivos e com vários efeitos adversos, o que reforça a necessidade da descoberta de novos fármacos eficazes (VIEGAS et al., 2004). Além disso, alguns dados epidemiológicos também preocupam, pois indicam que nas próximas

décadas haverá um aumento da prevalência desta doença (BARBOSA FILHO et al., 2006; MOTA et al., 2012). Da mesma forma, a enzima prolil oligopeptidase (POP) está relacionada com distúrbios neurológicos e doenças neurodegenerativas, estando seus níveis elevados ou diminuídos conforme a enfermidade (MAES et al., 1995). Dentre elas a depressão, doença que acomete pessoas de diferentes faixas etárias e níveis sociais, que não apresenta etiologia bem explicada e nem tratamentos adequados até os dias de hoje (CZÉH et al., 2016). Devido a isso, compreende-se o interesse em se buscar em fontes naturais agentes farmacológicos eficientes e com menores efeitos adversos no tratamento destas enfermidades do SNC.

Com base em informações etnofarmacológicas, pesquisas na literatura e dentre as espécies nativas do bioma Pampa, a espécie *Aristolochia triangularis* Cham., pertencente à família Aristolochiaceae e conhecida popularmente como “cipó-mil-homens”, foi selecionada para a realização de um estudo mais aprofundado a respeito de sua composição química, suas atividades antimicrobianas, antimicobacterianas e de inibição enzimática de enzimas do SNC.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas do extrato bruto, frações e substâncias isoladas do cipó da espécie *Aristolochia triangularis* Cham.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato bruto metanólico da espécie em estudo através de maceração a frio do cipó, e realizar o fracionamento ácido-base deste extrato para a obtenção de frações, utilizando-se diferentes solventes.

- Avaliar o extrato e frações obtidas quanto a seu potencial antimicrobiano, antimicobacteriano e inibitório frente às enzimas AChE e POP, com a finalidade de selecionar as frações para a continuidade dos trabalhos.

- A partir dos melhores resultados obtidos, isolar através de técnicas cromatográficas os metabólitos secundários presente nas frações do cipó de *A. triangularis*.

- Identificar os compostos isolados com a utilização de métodos espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais.

- Realizar ensaios biológicos para a determinação da atividade antimicrobiana, antimicobacteriana e de inibição enzimática frente às enzimas-alvo de estudo, dos compostos isolados e identificados de *A. triangularis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS E FITOQUÍMICAS

3.1.1 Família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae é composta por quatro gêneros e cerca de 600 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Popularmente a família é conhecida por “jarrinha”, “papo-de-peru”, “cassaú” e “cipó mil-homens”, sendo suas espécies empregadas de forma medicinal por populações indígenas e rurais (NASCIMENTO et al., 2010).

Pertencente à superordem Magnoliiflorae, juntamente com as famílias mais primitivas de Angiospermae, a família Aristolochiaceae apresenta em sua literatura divergências em relação ao seu número de subfamílias. Alguns estudos trazem classificações de sete a quatro subdivisões, sendo então atualmente dividida em duas subfamílias, baseando-se em informações moleculares e características morfológicas: Asaroideae, que inclui os gêneros *Asarum* e *Saruma*, distribuídos na China, América do Norte, Europa e Ásia, e Aristolochioideae, com os gêneros *Aristolochia sensu lato* (s.l.) e *Thottea*, distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (NASCIMENTO et al., 2010; HOLZBACH, 2011; NOGUEIRA e LOPES, 2012; TIAN-SHUNG et al., 2005).

No Brasil, a família é representada somente pelo gênero *Aristolochia* e suas espécies são utilizadas na medicina popular por seus efeitos sedativos, antissépticos, abortivos, expectorantes, antitérmicos, anti-inflamatórios, e outros (NASCIMENTO et al., 2010; NOGUEIRA e LOPES, 2012; PACHECO, 2009). Algumas destas ações são conhecidas devido aos estudos fitoquímicos deste gênero, que trazem como principais componentes substâncias com estruturas fenantrênicas. Dentre elas, os ácidos aristolóquicos (AAs) são os compostos encontrados na maioria das espécies, e acabam por serem as substâncias que caracterizaram a família Aristolochiaceae (MACHADO, 2009; NOGUEIRA e LOPES, 2012).

3.1.2 Gênero *Aristolochia*

O gênero *Aristolochia* apresenta cerca de 500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas do mundo, sendo o maior gênero da família Aristolochiaceae (DE BARROS e CAPELLARI, 2004; PACHECO et al., 2009). Suas espécies se concentram principalmente nas zonas tropicais do planeta, dentre elas o Brasil, que contém cerca de 60 espécies espalhadas pelo seu território (DE BARROS e CAPELLARI, 2004).

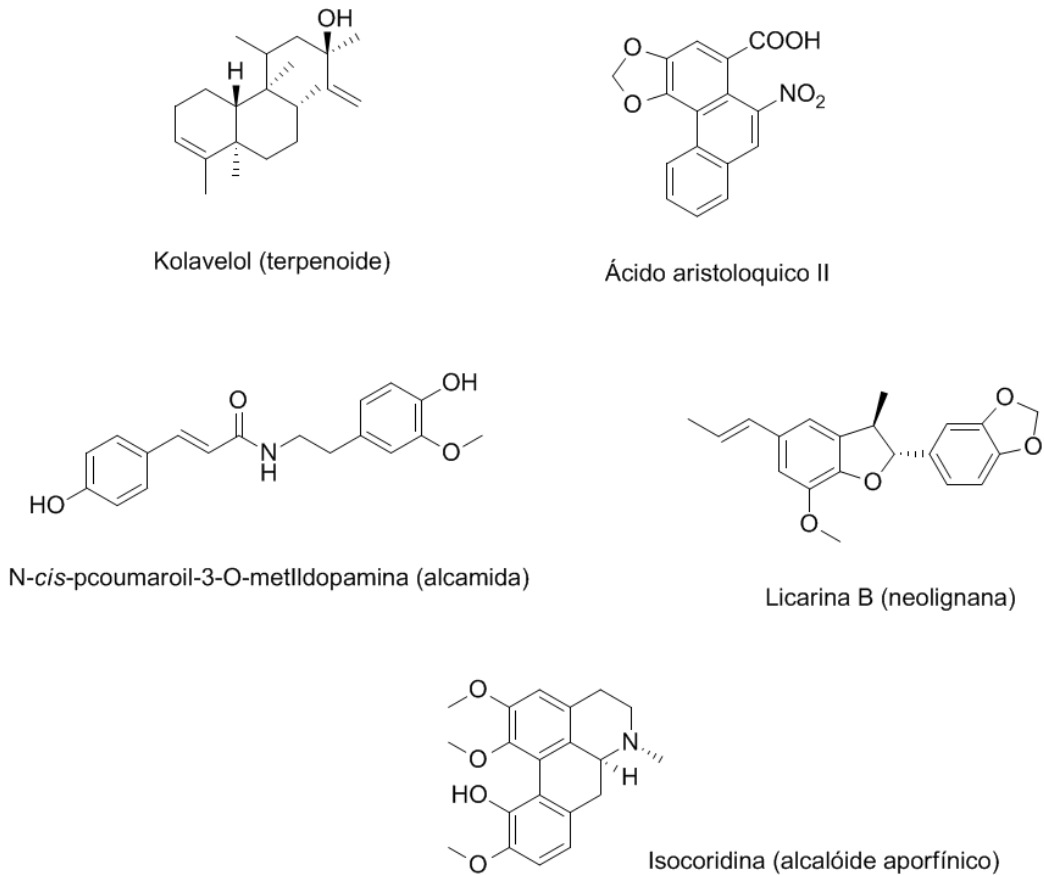
São plantas herbáceas, perenes, arbustos ou trepadeiras, com rizomas tuberosos, folhas polimórficas ou lobadas e flores axilares de cores rosa e marrom (TIAN-SHUNG et al., 2005).

Ocorrem em tipos de vegetação variados, com predomínio em áreas abertas, florestas e margens de rios (NASCIMENTO et al., 2010). Além de espécies medicinais, o gênero também fornece plantas que são utilizadas na ornamentação de jardins e em rituais religiosos, devido suas características (PACHECO et al., 2009).

Os indígenas denominam plantas deste gênero como “anhangá-potyra”, “flor-do-espírito-do-mal” e “erva-do-urubu”, em decorrência dos efeitos alucinógenos que provocam, sendo utilizadas em pontas de flechas em dias de caça pelos nativos. O nome *Aristolochia*, que de origem grega significa *aristos*: excelente e *lochios*: parto, algumas espécies deste gênero foram usadas na medicina popular desde a antiguidade em obstetrícia, como emenagoga e para facilitar o parto (FRANÇA et al., 2005). Além disso, seus usos populares relatam aplicações tais como antiofídicas, desintoxicantes, analgésicas, no tratamento de feridas, da malária, entre outros exemplos (HEINRICH et al., 2009; MACHADO e LOPES, 2008; PACHECO et al., 2009).

Em uma breve revisão da literatura, folhas, caules, e raízes do gênero *Aristolochia* apresentam entre seus metabólitos secundários já isolados terpenoides, lignoides, alcaloides, cumarinas, ácidos graxos, derivados fenólicos e nitrogenados (FRANÇA et al., 2005; PACHECO et al., 2009; SHI et al., 2004). Alguns metabólitos ocorrem com frequência nas espécies deste gênero, entre eles as alcalmidas, que conforme Holzbach (2011) são amidas fenólicas que apresentam atividade anti-inflamatória, antitumoral e antimicobacteriana já descritas, e foram isoladas da espécie *A. gigantea*. Da mesma forma, as aristolactamas são um tipo de alcaloide fenantrênico com atividades neuroprotetora, antiplaquetária e antitumoral comprovadas, isoladas de inúmeras espécies de *Aristolochia*, dentre elas *A. manshuriensis* (HOLZBACH e LOPES, 2010; ZHANG e JIANG, 2006). Alguns destes metabólitos secundários encontram-se exemplificados na Figura 1.

Figura 1. Exemplos de metabólitos isolados do gênero *Aristolochia*.



Fonte: (ABDELGADIR et al, 2011; FERREIRA et al., 2010; HOLZBACH e LOPES, 2010; LEÓN-DÍAZ et al., 2010; WU et al., 2004).

Além disso, os AAs conhecidos por identificarem a família Aristolochiaceae, são encontrados em várias espécies como *A. fangchi*, *A. clematidis*, *A. cinnabarina* e *A. bracteolata* (ABDELGADIR et al., 2011; HEINRICH et al., 2009; LI et al., 1994). Mathew et al. (2011), descreve os AAs como agentes antivirais, antibacterianos e anti-inflamatórios. Em contrapartida aos efeitos benéficos, os AAs são descritos na literatura também como substâncias nefrotóxicas e cancerígenas, o que levou a proibição da distribuição e comercialização em muitos países de ervas medicinais que incluíssem espécies de *Aristolochia* (PACHECO et al., 2009; ZHANG e JIANG, 2006).

Contudo, diversas pesquisas mostram a importância deste gênero e buscam comprovar cientificamente os usos populares das plantas medicinais através do isolamento de substância e ensaios biológicos. A espécie *A. bracteolata* é conhecida devido aos seus efeitos anti-helmínticos, atividades antialérgicas e antimicrobianas (ABDELGADIR et al., 2011). Já a espécie *A. debilis* apresenta atividades antiofídicas, anti-hipertensivas e é utilizada no tratamento da tuberculose (TIAN-SHUNG et al., 2005). *A. fordiana* é comumente utilizada para

o tratamento de dores no estômago, dores abdominais, reumatismo e para doenças de pele na China (ZHOU et al., 2013). E a espécie *A. indica* apresentou resultados promissores relacionados às atividades antipruriginosas e anti-inflamatórias segundo Mathew et al. (2011).

3.1.3 Espécie *Aristolochia triangularis* Cham.

A espécie *Aristolochia triangularis* Cham. (Figura 2) é uma planta nativa do Brasil e se encontra distribuída principalmente nos Biomas Cerrado e Mata Atlântica. Se desenvolve na orla de florestas, margens de rios, e se propaga por vegetações altas e de paredões rochosos, sendo comumente encontrada na beira de estradas (CORRÊA e BIASI, 2003; NASCIMENTO et al., 2010; SCALON et al., 2007). Utilizada em rituais religiosos e descrita em diversos estudos pelos seus poderes curativos, esta planta medicinal é conhecida popularmente por “cipó mil-homens”, “angelicó”, “calungo”, “mil-homens-do-rio-grande” e “ypê-mi” (CORRÊA e BIASI, 2003; SCALON et al., 2007).

Figura 2: *Aristolochia triangularis* Cham.

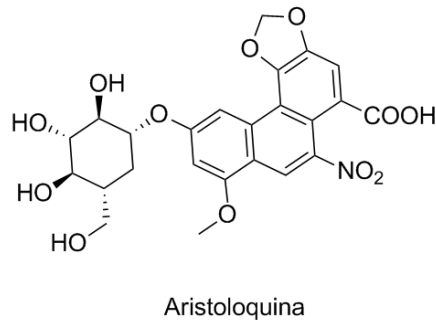


Fonte: (PEREIRA, A. O.).

A literatura descreve o uso desta espécie pela população indígena, aplicada para o envenenamento de flechas devido à presença de um componente tóxico chamado aristoloquina (Figura 3). Seus efeitos ocorrem em órgãos abdominais, particularmente nos músculos lisos, como no útero e nos ovários. Isto acaba por explicar o uso popular desta espécie no preparo de

abortivos ilegais a base de extratos de raízes e de sementes das plantas da família Aristolochiaceae (SCALON et al., 2007).

Figura 3: Estrutura química da substância Aristoloquina.



Fonte: (NAKANISHI et al., 1982).

Dentre os metabólitos isolados da espécie *A. triangularis*, estudos relatam a presença de compostos alcaloides, esteroides, taninos, lignanas e terpenos nas raízes e caules da planta (CORRÊA e BIASI, 2003). Conforme Lopes et al. (1990), já foram isoladas desta espécie alantoína, nerolidol, sitosterol, lignanas do tipo dibenzilbutirolactona e diterpenos do tipo ent-caurano. Pacheco et al. (2009) descreve alguns diterpenos do tipo ent-caurano em seus estudos com a espécie *A. triangularis*, onde podemos citar o ácido *ent-16 β (H)*-cauran-17-oico, *ent-caur-15-en-17-ol* e *(-)-ent-caur-16-en-19-al*, como exemplos. Além disso, Rucker et al. (1981) apresenta como resultado de suas pesquisas a presença de triterpenos, sesquiterpenos e de lignanas do tipo cubebina, que também caracterizam esta espécie.

Na medicina popular, *A. triangularis* (principalmente caule e raízes) é utilizada devido as suas propriedades antitérmica e antisséptica, como digestiva, sedativa, antiofídica, abortiva e no tratamento das febres intermitentes da malária (SCALON et al., 2007). Na literatura encontram-se diversos estudos que avaliam os extratos desta espécie diante do seu potencial anti-inflamatório (MUSCHIETTI et al., 1996), anticancerígeno (MONGELLI et al., 2000), antimicobacteriano (OLIVEIRA et al., 2009) e inseticida (KAMARAJ et al., 2010).

3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.2.1 Atividade inibição enzimática

3.2.1.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Um dos principais e mais estudados neurotransmissores do SNC, a acetilcolina (ACh) é sintetizada no interior de terminações nervosas a partir de colina, produto do metabolismo de

lipídeos, e acetil coenzima A (acetil-CoA), produzida durante a respiração celular, através da ação da enzima colina-acetiltransferase (MAZZANTI et al., 2004; VIEGAS et al., 2004). Encontra-se amplamente distribuída por todo sistema nervoso, apresentando seus efeitos tanto no SNC, onde esta relacionada às funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, memória e controle motor, como no sistema nervoso periférico (SNP), participando da contração de músculos lisos, dilatação de vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos (MAZZANTI et al., 2004; VIEGAS et al., 2004). No cérebro, a ACh se encontra principalmente nas regiões do córtex cerebral, hipocampo, ponte e, em menor quantidade, no cerebelo (MOTA et al., 2012). Já no SNP, este neurotransmissor é encontrado em todas as junções neuromusculares espalhadas pelo corpo (VIEGAS et al., 2004).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) pertencente à família das colinesterases, é classificada como uma serina hidrolase que exerce um papel importante no mecanismo colinérgico (MAZZANTI et al., 2004). Responsável pelo controle da transmissão de impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas, a AChE inativa a propagação do impulso nervoso devido a sua ação de catalisar a hidrólise do substrato ACh em acetato e colina (BARBOSA FILHO et al., 2006; MAZZANTI et al., 2004). Indispensável para a regulação do neurotransmissor ACh e das sinapses nervosas, a enzima AChE encontra-se envolvida em diferentes distúrbios do SNC, como na doença de Alzheimer (DA) (LIU et al., 2014).

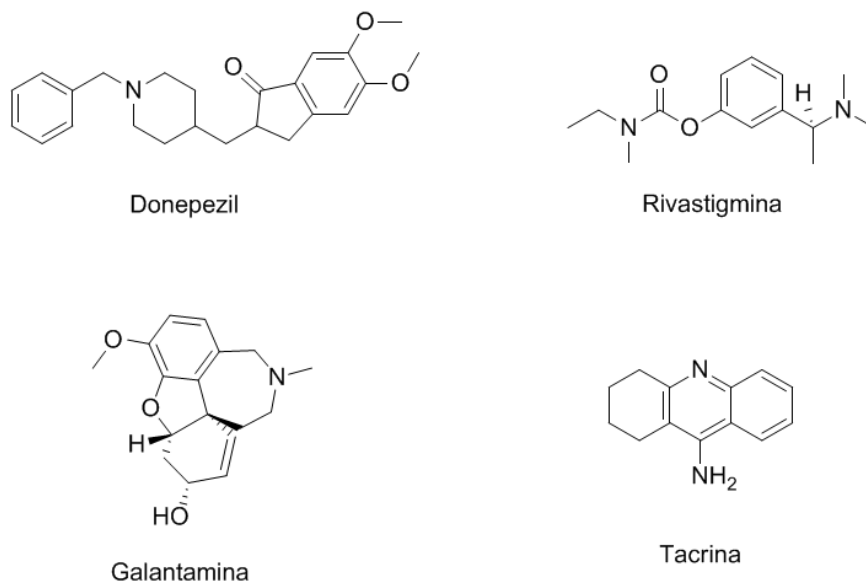
A DA é uma desordem progressiva, crônica e neurodegenerativa multifatorial que se caracteriza pelo declínio de memória e habilidades cognitivas, geralmente associada ao desenvolvimento de demência (LIU et al., 2014; MOTA et al., 2012; NAJAFI et al., 2017). Atingindo cerca de 35 milhões de pessoas no mundo, na maioria idosos com mais de 65 anos, a DA é descrita pela destruição de neurônios com atividades funcionais no córtex cerebral, sistema límbico, hipocampo e atrofia cortical, resultando em problemas nas sinapses colinérgicas no SNC (CAZARIM et al., 2016; MOTA et al., 2012; ÖZTAŞKIN et al., 2015). Ainda não se conhece a etiologia exata da DA até os dias de hoje, mas sabe-se o forte envolvimento da deficiência na transmissão colinérgica (BARBOSA FILHO et al., 2006; NAJAFI et al., 2017).

Alguns estudos relacionam a degeneração do sistema colinérgico com a redução dos níveis plasmáticos de ACh (MOTA et al., 2012). Devido a isso, a neurotransmissão colinérgica cortical diminui, bem como alguns outros neurotransmissores em menor proporção, entre eles a noradrenalina, dopamina, serotonina e glutamato. Outras pesquisas também relacionam a etiologia da DA com a redução do número de receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh localizados nas terminações colinérgicas pré-sinápticas (VIEGAS et al., 2006).

Outra evidência observada em casos da DA é a formação de depósitos extracelulares do peptídeo β -amiloide e a formação de neurofibrilas intracelulares de proteína TAU, gerando uma placa inflamatória e emaranhados neurofibrilares (CAZARIM et al., 2016; VIEGAS et al., 2009). O “início” da formação destes processos, segundo Cazarim et al. (2016) e Cortes et al. (2015), pode estar relacionado com alterações vasculares, estresse oxidativo, neuroinflamação, função mitocondrial, expressão gênica e funcionalidade do sistema endócrino. O resultado destes eventos resulta na destruição lenta dos neurônios, perda da função neuronal e dano sináptico, prejudicando a memória dos pacientes, a coordenação motora, capacidade cognitiva e demência (CORTES et al., 2015; VIEGAS et al., 2006).

Os tratamentos utilizados atualmente visam a melhoria dos sintomas da DA, visto que esta não tem cura (CORTES et al., 2015). O objetivo dos fármacos utilizados é a inibição da atividade da enzima AChE e o aumento dos níveis de ACh nos diferentes níveis da doença, sendo eles donepezil, rivastigmina, galantamina e tacrina (Figura 4) (LIU et al., 2014; MOTA et al., 2012). Estes compostos se originam de plantas medicinais, tal como a galantamina, alcaloide produzido biossinteticamente por algumas espécies dos gêneros *Galanthus* e *Narcissus* (Amaryllidaceae), e que atualmente é produzida sinteticamente, sendo considerada a substância mais efetiva no tratamento da DA (MOTA et al., 2012).

Figura 4: Exemplos de inibidores da AChE de origem natural.



Fonte: (BARBOSA FILHO et al., 2008).

Entretanto, os inibidores da AChE em uso apresentam diversos efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, problemas gastrointestinais e problemas de biodisponibilidade devido ao seu

curto tempo de meia-vida, o que acaba por dificultar a adesão dos pacientes aos tratamentos (LIU et al., 2014; MOTA et al., 2012). Devido a isso e com a escassa disponibilidade de medicamentos para o tratamento da DA, a busca por novos inibidores da AChE ainda é de grande interesse. Conhecendo a série de compostos que as plantas medicinais dispõem, a pesquisa por novos agentes naturais continua sendo fonte de novos estudos.

3.2.1.2 *Prolil oligopeptidase (POP)*

A enzima prolil oligopeptidase (POP) é encontrada na maioria dos tecidos, porém em níveis mais elevados no SNC, onde se acredita que desempenha um papel fundamental em diferentes sistemas neuronais (IRAZUSTA et al., 2002). Caracteriza-se por clivar sequências peptídicas de resíduos de prolina, sendo que a escolha pela prolina envolve a modulação dos níveis de vários hormônios peptídicos e peptídeos neuronais, propondo que esta enzima também desempenha papéis fundamentais nos processos fisiológicos do corpo (BABKOVA et al., 2017; JALKAMEN et al., 2006; MAES et al., 1995).

Alguns estudos têm enfatizado que a POP desempenha funções relevantes, como aprendizado e memória, diferenciação e divisão celular e transdução de sinais (TOIDE et al., 1995). Além disso, também está envolvida em diversos transtornos e patologias do SNC, incluindo esquizofrenia, transtorno afetivo bipolar, doença de Parkinson e a DA (CAHLÍKOVÁ et al., 2015; HELLINGER et al., 2015).

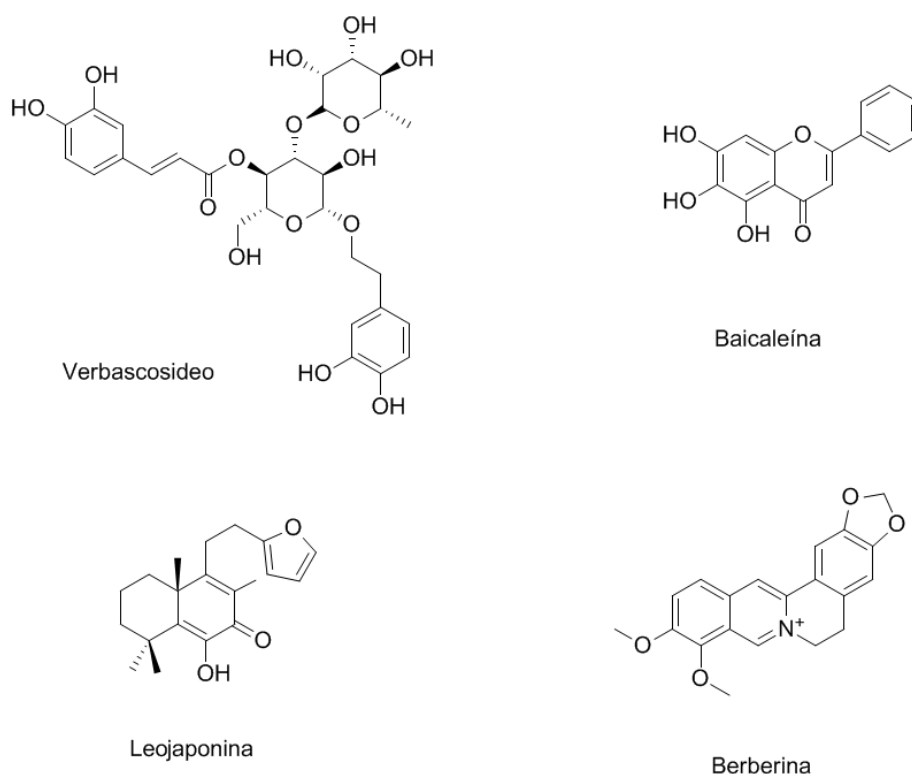
Uma das doenças que tem tomado grandes proporções nos últimos anos é a depressão. Conforme estudos de Cramer et al. (2016), esta doença afeta cerca de 17% da população em algum momento de suas vidas, sendo hoje um dos maiores problemas de saúde mental. Além de seus sintomas debilitantes, a depressão traz consequências prejudiciais a longo prazo para a saúde física e mental dos pacientes (CRAMER et al., 2016). Sabe-se que em diferentes estágios da depressão a atividade da POP apresenta-se diminuída. Os substratos conhecidos desta enzima que também estão diretamente envolvidos na fisiopatologia da doença são os peptídeos endorfina, substância P, arginina e vasopressina. Em contrapartida, níveis séricos da POP encontram-se aumentados em pacientes que sofrem de esquizofrenia. Os fármacos mais utilizados para o tratamento destes distúrbios são a fluoxetina e o ácido valpróico, fármacos sintéticos que tentam restaurar os níveis séricos normais da POP no soro do paciente (MAES et al., 1995; POLGÁR, 2002).

Além disso, em pacientes que sofrem de DA encontram-se baixos níveis da substância P, e a administração desta substância P tem sido descrita para bloquear proteínas β -amiloides que causam neurotoxicidade e atuar como moduladores positivos na atividade colinérgica cerebral

(POLGÁR, 2002; SIATKA et al., 2017). Dessa forma, inibidores da POP têm sido utilizados para conter a deposição de proteínas β -amiloides no cérebro, atuando positivamente em distúrbios cognitivos, visto que testes em ratos já fornecem resultados satisfatórios onde foi possível reverter amnésia e melhorar a cognição de ratos idosos (CAHLÍKOVÁ et al., 2015; SHINODA et al., 1997; SIATKA et al., 2017).

Há registros de inibidores da POP de origem natural (Figura 5) extraídos de diferentes espécies, como das folhas de *Ginkgo biloba* de onde foram isolados os compostos ácidos 6-(8'-Z-pentadecenil) salicílico e o 6-(10'-Z-heptadecenil) salicílico, das raízes da *Scutellaria baicalensis* onde obteve-se o flavonoide baicaleína, das partes aéreas de *Tamarix hispida* Willd que resultou na identificação dos compostos ácido 3 α -(3'',4''-diidrox-trans-cinamoiloxi)-Dfriedolan-14-en-28-oico, ramnocitrina e isoramnetina, e dos extratos de *Rhizoma coptidis* no qual o alcaloide berberina foi isolado (CAHLÍKOVÁ et al., 2015; SANTOS, 2016; TARRAGÓ et al., 2008). Além disso, Filho et al. (2012), apresentou resultados promissores frente a inibição da POP do fenilpropanoide verbascosídeo, isolado de *Buddleja brasiliensis*, assim como Zachow et al. (2016) que descreve o diterpeno leojaponina isolado de *Leonurus sibiricus* como inibidor desta enzima.

Figura 5. Exemplos de inibidores da POP de origem natural.



Fonte: (FILHO et al., 2012; SANTOS, 2016; ZACHOW et al., 2017)

Diante das enfermidades que estão relacionadas à POP, os compostos inibidores desta enzima aparecem como tratamentos promissores para os distúrbios neuronais. Além das substâncias sintéticas já utilizadas na clínica nos dias de hoje e devido aos diversos efeitos colaterais já relatados (como, por exemplo, desconfortos gastrointestinais e insônia), que acabam por prejudicar a adesão dos pacientes aos fármacos, busca-se a descoberta de novos inibidores enzimáticos oriundos de produtos naturais.

3.3.1 Atividade antimicrobiana e antimicobacteriana

3.3.1.1 *Microrganismos patógenos*

As doenças infecciosas são responsáveis por um dos mais sérios problemas de saúde pública que o mundo enfrenta. A evolução biológica contínua dos microrganismos e o desenvolvimento de resistência pelos antimicrobianos disponíveis clinicamente, levaram a intensificação na busca por novas substâncias que possam ser úteis nos tratamentos das diversas patologias (NCUBE et al., 2012). Infecções bacterianas, fúngicas e micobacterianas que não respondem aos tratamentos propostos, resultam no aumento do índice de mortalidade e morbidade no mundo segundo a OMS (GARCÍA et al., 2006).

O mecanismo de resistência dos microrganismos pode ser explicado devido a mutações genéticas e herança de genes entre os patógenos (ABHISHIKTHA et al., 2015). Recentemente reconheceu-se a presença de biofilmes bacterianos e micobacterianos que fornecem um ambiente protegido, formado por diferentes gradientes biológicos, e que permitem a transferência genética (WENZEL, 2007). Segundo Ingen et al. (2012), o desenvolvimento da resistência em micobactérias, por exemplo, é explicado devido a sua parede celular ser altamente lipofílica, havendo diversos mecanismos que controlam o número de porinas, bombas de efluxo e as biotransformações por enzimas citosólicas nas paredes celulares destes microrganismos.

As doenças infecciosas graves acabam por se desenvolverem em pacientes que apresentam fragilidade no seu sistema imunológico, como pacientes em tratamento para o câncer, em processos de transplante e que apresentam a síndrome da AIDS (GARCÍA et al., 2006). Estes fatores, juntamente com a resistência aos antimicrobianos e a toxicidade conhecida destes medicamentos, levam a pesquisas de substâncias mais eficazes. Frente ao uso popular de plantas medicinais de diversas espécies para o tratamento de feridas e infecções, e considerando-as importantes reservatórios de metabólitos ativos, estudos por todo mundo buscam a descoberta de novos compostos (ABHISHIKTHA et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas apresentam em sua estrutura várias camadas peptidoglicanas de parede celular, o que aumenta o grau de dificuldade de acesso a fármacos nestes microrganismos. Entre a gama de bactérias desta classificação, pode-se citar a espécie *Staphylococcus aureus* como causa de uma grande variedade de enfermidades, sendo encontrada em casos de infecções de feridas, pneumonias, intoxicações alimentares e septicemias. Já a espécie *Staphylococcus epidermidis*, encontrada principalmente na pele e nas mucosas dos indivíduos, apresenta-se como um importante agente de infecções hospitalares devido a sua capacidade de formar biofilmes em superfícies de polímeros (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). As cepas de *Bacillus cereus*, facilmente encontradas no solo, acabam sendo prejudiciais ao homem quando são identificadas em casos de intoxicações alimentares (TORTORA et al., 2012). Já as cepas de *Bacillus subtilis* se encontram também em casos de problemas alimentares e em infecções respiratórias e septicemias (ANVISA, 2004). A bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* é um patógeno oportunista que se manifesta em casos de gastroenterite, meningite e infecções materno-fetal. Do gênero *Enterococcus*, a espécie *E. faecalis* compreende cerca de 80-85% das amostras isoladas na clínica, sendo mais uma espécie com importância em casos de infecções hospitalares (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Bactérias Gram-negativas apresentam suas estruturas de parede celular mais simples, somente com dupla camada lipídica. O gênero *Salmonella* pode ser encontrado no ambiente, na água potável e em alimentos, está envolvido na contaminação por fezes de indivíduos doentes, causando infecções gastrointestinais pela espécie *S. typhimurium* e febre tifoide por *S. enteritidis* (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). As cepas de *Escherichia coli* colonizam o trato gastrointestinal humano e coexistem com o homem por décadas, causando doenças principalmente em hospedeiros imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais normais são violadas (WANKE, 2015). A espécie *Enterobacter aerogenes* é isolada clinicamente do trato respiratório, urinário, gastrointestinal e do sangue, sendo até 2003, de acordo com Davin-Regli (2015), considerado um patógeno multirresistente em infecções hospitalares. O gênero *Shigella* é descrito como sendo a principal causa de disenteria em pacientes, sendo as espécies *S. sonnei* e *S. flexneri* as linhagens mais isoladas (KOTLOFF et al., 1999). *S. sonnei* é citada como problemática em ambientes com muitos indivíduos, como creches e prisões, tornando a “shigelose” uma das principais causas de doenças gastrointestinais nos Estados Unidos da América, com relato de 25.000 casos em 1998 (DELAPPE et al., 2003). Encontrada no solo, água, vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais responsáveis por infecções em pacientes com defesas baixas, sendo um importante agente de infecções hospitalares, apresentando resistência a antibióticos e a desinfetantes (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). *Proteus mirabilis* é conhecida principalmente por causar infecções no trato urinário de pacientes idosos e com diabetes tipo 2, podendo levar a casos mais graves de bacteremia e uroseps (SCHAFFER e PEARSON, 2015). Já as cepas de *Klebsiella pneumoniae* encontradas em casos graves de pneumonia e infecções sanguíneas, trazem altas taxas de mortalidade e morbidade devido à resistência aos tratamentos em uso (ULU et al., 2015).

Entre os fungos, o gênero *Candida* apresenta-se amplamente distribuído no meio ambiente, fazendo parte da microbiota normal do homem ou de algumas patologias. A candidíase ou candidose é uma infecção causada comumente pela espécie *Candida albicans*, também podendo ocorrer devido a outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). A espécie *Candida dubliniensis* é descrita por Nonaka et al. (2008) como um importante patógeno envolvido em casos de candidíase orofaríngea em indivíduos imunocomprometidos, principalmente em pacientes com AIDS. Fungos do gênero *Cryptococcus* são conhecidos por causarem uma doença oportunista chamada criptococose, que atinge o SNC e o sistema respiratório do ser humano e de animais. Fungos como *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans* são encontrados em

fezes de pássaros, principalmente de pombos, e seus esporos quando inalados por indivíduos com sistema imunológico suprimido, levam ao quadro da doença criptococose (TORTORA et al., 2012; JUNIOR, et al., 2006). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida por seus usos na indústria alimentícia e farmacêutica, vem trazendo preocupações clínicas, pois quando associada a outras leveduras (em especial do gênero *Candida*) resultam em altas taxas de mortalidade, gerando infecções fúngicas raras encontradas nas mucosas gastrointestinais, respiratórias, urinárias e no sangue de pacientes com doenças subjacentes (SILVA et al., 2011).

Outros importantes patógenos que são estudados e apresentam resistência frente a medicamentos já conhecidos são as micobactérias. Microrganismos do gênero *Mycobacterium* apresentam uma parede celular complexa, com camadas de peptidoglicanos, arabinoglicanos, ácidos micólicos (que caracterizam este gênero) e uma camada glicolipídica (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN, 2007). De forma geral, as micobactérias dividem-se no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias não tuberculosas e *M. leprae*. (GRIFFITH et al., 2007). Entre as espécies de micobactérias não tuberculosas têm-se as espécies de micobactérias de crescimento rápido (MCR), encontradas no solo, água, piscinas e outras superfícies (BRASIL, 2008; PITOMBO et al., 2009). Patógenos oportunistas, as MCR vêm sendo relacionadas a infecções pós-operatórias cardiotorácicas, ortopédicas, pediátricas, oftalmológicas e de procedimentos estéticos (MACEDO e ABRAHAM, 2009; BROWN-ELLIOTT e WALLACE, 2002). Conforme relatório publicado pela ANVISA (2011), que trata da investigação de casos de infecções por MCR no Brasil, no período de 1998 a 2009 foram descritas cerca de 2.520 notificações. Em 2004, na cidade de Belém do Pará, no estado do Pará, um surto por *M. abscessus* e *M. massiliense* levou a um grande número de infecções pós-operatórias em hospitais e clínicas, o que gerou um alerta ao sistema de saúde do país. No mesmo ano, em Campinas, São Paulo, 33 pacientes apresentaram cepas de *M. fortuitum* em próteses mamárias após mastoplastia (PADOVEZE et al., 2007; VIANA-NIERI et al., 2008). Dois anos depois, em 2006, cerca de 699 casos de infecções por MCR foram notificados no Rio de Janeiro, e no ano seguinte, um surto (248 casos) de infecções nos hospitais de Vitória, no Espírito Santo, foi confirmado após o isolamento de cepas de MCR (GARCIA, 2007; MACEDO et al., 2009). Diante de todos estes relatos, pode-se ressaltar a importância dos estudos frente as cepas de MRC. Dentre elas, a espécie *Mycobacterium abscessus*, que é responsável por infecções de pele, tecidos moles e pulmonar, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo uma ameaça em nível hospitalar devido a sua alta resistência a antimicrobianos (NESSAR et al., 2012). Cepas de *Mycobacterium fortuitum* estão associadas a doenças pulmonares, casos de infecções pós-cirúrgicas e a infecções relacionadas a cateteres,

sendo observado o aumento de casos deste tipo de infecção em pacientes imunocomprometidos e a ocorrência de multirresistência deste patógeno a fármacos (DATTA et al., 2016; SANTOS et al., 2016). Já as cepas de *Mycobacterium massiliense* estão relacionadas a doenças pulmonares como fibrose cística, doença pulmonar crônica e bronquiectasia, causando infecções pulmonares resistente aos tratamentos (CHOI et al., 2017; KOH et al., 2016).

4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se organizados na forma de dois manuscritos. O Manuscrito 1 apresentado descreve o estudo da composição química da espécie *A. triangularis*, relatando o preparo do extrato e frações, o isolamento e identificação de compostos, e a realização de ensaios biológicos “*in vitro*” para a avaliação das atividades antimicrobianas e antimicobacterianas das amostras. O artigo científico foi submetido ao periódico “*Industrial Crops and Products*”.

O Manuscrito 2 apresenta a avaliação *in vitro* do extrato metanólico de *A. triangularis*, suas frações, e seus metabólitos isolados frente as enzimas acetilcolinesterase e prolil oligopeptidase. Este artigo científico está em processo de finalização para submissão ao periódico “*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*”.

Subsequentemente a estes é apresentada uma discussão geral dos resultados obtidos, bem como as conclusões e a bibliografia utilizada como referência na elaboração do presente trabalho.

4.1 MANUSCRITO 1

Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil

Alessandra O. Pereira^a, Janaína M. Avila^b, Gabrielle do Carmo^b, Fallon S. Siqueira^c, Marli M. A. Campos^c, Davi F. Back^b, Ademir F. Morel^b, Ionara I. Dalcol^{*,a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS 97105-900, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais - NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS 97105-900, Brazil. *Tel.:* +55 3220 9621; *fax:* +55 3220 8031.

E-mail address: iidalcol@gmail.com (I.I. Dalcol)

ABSTRACT

Three diterpenes (**1**, **4**, **5**), four lignans (**2**, **6**, **7a**, **7b**), one sesquiterpene (**3**) and one alkaloid (**8**) were isolated from an acidic ether fraction of *Aristolochia triangularis* Cham. native from Brazil including *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**), zuonin B (**2**), nerolidol (**3**), (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**), *ent*-Kauran-16 β ,17-diol (**5**), dihydrocubebin (**6**), a mixture of α and β -cubebin (**7a** + **7b**) and aristolactam BII (**8**). The structures were determined by spectroscopic analysis and through the comparison of their NMR data and related compounds. The methanol extract, fractions and the isolated substances were evaluated to check their antimicrobial/antimycobacterial activity against bacteria (15 strains), fungi (9 strains) and mycobacteria (3 strains). The Gram-negative bacteria *Shigella sonnei* is a pathogen that when together with other *Shigella* species becomes responsible for the shigellosis, an important global cause of gastroenteritis. *Shigella sonnei* was highly susceptible to (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) showing the same potential activity when compared to the antibacterial substance chloramphenicol (MICs at < 1.5 $\mu\text{g/mL}$). This diterpene also exhibited excellent bacteriostatic and bactericidal (MIC/MLC = 3.1/6.2 $\mu\text{g/mL}$) activity against *Enterobacter aerogenes*, being considered a better bactericidal substance than the controls ampicillin and chloramphenicol, and it also presented high bioactivity against *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* (MIC values of 3.1 $\mu\text{g/mL}$). *Shigella flexneri* was sensitive to the compounds **1**, **4** (MICs values - 6.2 $\mu\text{g/mL}$), **2** and **3** (MICs - 12.5 $\mu\text{g/mL}$). *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) showed good activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* (MICs = 12.5 $\mu\text{g/mL}$). The greatest antifungal activity observed was against *Candida krusei*, where the compounds **4** and **8** significantly inhibited the fungus growth (MICs = 6.2 $\mu\text{g/mL}$). All extract, fractions and the isolates tested showed a promising degree of antimycobacterial activity mainly against

Mycobacterium abscessus. Nerolidol (**3**) presented the highest antimycobacterial activity (MICs of 4.9 - 19.9 µg/mL).

Keywords: Aristolochiaceae; *Aristolochia triangularis*; antimicrobial activity, antimycobacterial activity.

1. Introduction

The Aristolochiaceae family has several genus and species distributed all over the world. Around 600 species grow in tropical, subtropical and temperate regions but only 400 species are part of the *Aristolochia* genus (Do Nascimento et al., 2010; Holzbach and Lopes, 2010; França et al., 2005). Being numerically and medicinally important, several species are used in folk medicine as abortifacient, anti-ophidian, anti-asthmatic, expectorant, insecticide, anti-inflammatory, analgesic (Marchesini et al., 2009), anti-tumor (Benarba et al., 2012), sedative, muscle relaxant, anti-histaminic (Pacheco et al., 2009) and also in weight-loss diets in Brazil, Europe (Holzbach and Lopes, 2010) and China (Francisco et al., 2003). Studies report the known benefit of *Aristolochia debilis* for the tuberculosis treatment, *Aristolochia albida* for skin diseases, *Aristolochia constricta* as anti-spasmodic and anti-helminthic, and *Aristolochia grandiflora*, which presents the antimicrobial activity previously described (Wu et al., 2004). Part of these medicinal properties were attributed to bioactive compounds including terpenoids (Wu et al., 2004), lignoids, alkaloids, phenolic derivatives (França et al., 2005), alkalamides, aristolactams (Holzbach and Lopes, 2010) and aristolochic acids, that are characteristic of the *Aristolochia* genus (Zhang and Jiang, 2006; Machado and Lopes, 2010).

Aristolochia triangularis Cham. is native from Brazil and it is found in the Atlantic forest (Corrêa and Biasi, 2003; Scalon et al., 2007). It is also found in riverbanks and rocky vegetation being very common on roadsides (Do Nascimento et al., 2010), this species is popularly known as “cipó mil-homens”, “angelicó” and “ypê-mi” (Corrêa and Biasi, 2003) and there are reports of its use in indigenous culture, in religious rituals and because of their curative powers (Scalon et al., 2007). Their stems and roots are the chosen parts for the treatment of wounds and skin diseases (Lopes et al., 1990; Scalon et al., 2007). It can be used for the treatment of rheumatism and as an emmenagogue. It is also an antidote, abortive (Ciccia et al., 2000) and can be applied

for the treatment of the digestive and circulatory system (Baptista et al., 2013). Besides, it is considered efficient against diarrhoea (Pirker et al., 2012), as an antipyretic, as a diuretic, in malaria fevers (Scalon et al., 2007), as anti-helminthic, sedative and anti-inflammatory (Corrêa and Biasi, 2003). Phytochemical studies about *A. triangularis* found these main constituents: alkaloids, aristololactams, aristolochic acid (Lin et al., 1997), terpenoids (Lopes et al., 1990) and lignoids (Rücker and Langmann, 1978).

Traditional uses and scientific knowledge concerning some medicinal plants have led to several studies to discover new antimicrobial agents (Sini and Malathy, 2005). The unrestrained use of antibiotics resulted in an increase in the number of multiresistant microorganism infections making infectious diseases one of the largest causes of mortality and morbidity in the world (Machado et al., 2005; García et al., 2006). Therefore, it is important and necessary to research new treatments for infections caused by bacteria, mycobacteria and fungi to minimize such problems. Based on the *A. triangularis* ethnopharmacological uses for the treatment of wounds and skin diseases, this study aimed to investigate the chemical composition, as well as the antimicrobial and antimycobacterial potential of the extract, fractions and isolated compounds of this species.

2. Materials and methods

2.1. General Experimental Procedures

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 400 spectrometer operating at 400.13 MHz for ^1H and 100.62 MHz for ^{13}C in CDCl_3 or $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ or CD_3OD using TMS as internal standard. Fractions were monitored by TLC (Merck, silica 60 F-254) and spots were visualized under UV light and then revealed through the application of an Anisaldehyde reagent spray. Melting points were determined on a MQAPF-302 apparatus and are uncorrected.

Crystallographic measurements were obtained on a Bruker D8 Venture Photon 100 diffractometer equipped with an Incoatec I μ S high brilliance Mo K α X-ray tube with two dimensional Montel micro-focusing optics. The structure was solved by direct methods using SHELXS.

2.2. Plant material

Aristolochia triangularis Cham. was collected in the district of Palma, in the region of Santa Maria, RS, Brazil (29°41'38.2"S /53°36'43.0"W). The plant material identification was made by Professor Renato Aquino Zachia, and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Botany Department at UFSM (n° SMDB 16.109).

2.3. Extraction and isolation

The *A. triangularis* dried powdered rhizomes and stems (1.500 g) were exhaustively extracted with MeOH at room temperature. The resulting MeOH extract was concentrated under vacuum to obtain a crude extract (ME; 66.0 g). Part of this extract (64.0 g) was dissolved in H₂O (600 mL) and MeOH (20 mL) and acidified with 2M HCl to pH 2. The acid solution was extracted with Et₂O (7 x 350 mL each) to yield the acidic ether fraction (AEF; 28.0 g). The aqueous solution was basified with NH₄OH to pH 8, and extracted with Et₂O (12 x 300 mL each) to yield the basic ether fraction (BEF; 0.640 g), followed by EtOAc (15 x 300 mL each) to yield the basic acetate fraction (BAF; 1.80 g). The final aqueous solution was frozen and freeze-dried to yield the aqueous fraction (AF; 16.0 g).

A portion of acidic ether fraction (AEF, 22.0 g) was applied to chromatographic column (CC) using silica gel (209.0 g; 230-400 mesh) as stationary phase, which was eluted with *n*-hexane and *n*-hexane:CH₂Cl₂ (1:1) [sub-fractions I-IV] followed by CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂:EtOAc (1:1) [sub-fractions V-XVI], EtOAc and EtOAc:MeOH 50% [sub-fractions

XVII-XXX] and MeOH [sub-fractions XXXI-XXXVIII]. Combined sub-fractions V-VII (1.40 g) were subjected to silica gel column (65.0 g) and eluted with *n*-hexane to obtain a yellow solid substance, that was washed with MeOH to yield a white solid substance purified by preparative thin layer chromatography (PTLC) using *n*-hexane:Et₂O (50:4) to get **1** (0.074 g). Sub-fractions IX-X (1.39 g) were crystallized using a minimum quantity of EtOAc and excessive *n*-hexane to give **2** (0.10 g). Sub-fractions XI-XIII (0.99 g) were combined and applied to silica gel column (100.0 g) eluted with a gradient of *n*-hexane:CH₂Cl₂ (100:0 → 0:100), CH₂Cl₂:EtOAc (100:0 → 50:50) and EtOAc to yield twelve fractions. Fraction F_(XI-XIII)13-18 (0.142 g) was purified by CC using increased amounts of EtOAc in *n*-hexane to have **3** (0.053 g). From fraction F_(XI-XIII)19-23 (0.302 g), **2** (0.151 g) was isolated. Fraction F_(XI-XIII)25 (0.04 g) was separated by silica gel CC (3.3 g silica gel) with *n*-hexane:CH₂Cl₂ (50:50 → 0:100), CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂-MeOH (50:50) to obtain **4** (0.014 g). Sub-fraction XX (0.172 g) was applied to CC (8.0 g silica gel) and eluted with a gradient of CHCl₃-MeOH to get nine fractions. Fraction F_(XX)12-17 (0.020 g) was chromatographed on PTLC developed with CH₂Cl₂-Et₂O (20:10) to give **5** (0.011 g) and **6** (0.005 g). From the same sub-fraction FXX (1.65 g) by CC using 45.0 g of silica gel and *n*-hexane:CH₂Cl₂ (100:0 → 0:100), CH₂Cl₂:EtOAc (100:0 → 0:100) and MeOH were isolated the compounds **5** and **6** as well as a yellowish white solid **7** (0.016 g) that appeared to be pure by PTLC using CH₂Cl₂:Et₂O (40:10). NMR analysis revealed this solid to be a mixture of cubebins (α and β -cubebin). After several attempts to separate the mixture by fractionated crystallization, the formation of β -cubebin crystals was observed by slow evaporation of an *n*-hexane solution. The X-Ray confirmed the relative configuration of the epimer **7b**. In the same sub-fraction it was isolated **8** (0.010 g) by purification on CC using a gradient of *n*-hexane: EtOAc.

2.4. Preparation of derivative (9)

This derivative was prepared from *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**; 20 mg, 0.07 mmol) and NH₂OH.HCl/ CH₃COONa according to the method described by Hueso-Falcón et. al. (2010). The oxime **9** was obtained as a white solid with 43% of yield, m.p. 163.0-167.0 °C. ¹H NMR (400.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.40 (1H, br s, H-19), 4.78 (1H, m, H-17a), 4.73 (1H, m, H-17b), 2.63 (1H, m, H-13), 1.03 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 156.5 (C-19), 155.8 (C-16), 103.1 (C-17), 56.8 (C-5), 54.9 (C-9), 49.0 (C-15), 44.1 (C-8), 43.8 (C-13), 40.9 (C-1), 40.1 (C-7), 39.9 (C-14), 39.3 (C-10), 39.1 (C-4), 36.8 (C-3), 33.9 (C-12), 29.1 (C-18), 19.8 (C-2), 18.3 (C-11), 18.3 (C-6), 16.7 (C-20).

2.5. Antimicrobial screening

2.5.1. Microbial strains and growth conditions

The *in vitro* antimicrobial activity of the extracts and compounds was tested against twenty-four microorganisms, including six Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, nine Gram-negative bacteria: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* IC, and nine yeasts: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida dubliniensis* ATCC MYA-577, *Candida krusei* ATCC 6258, *Cryptococcus gattii* ATCC 56990, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. The *in vitro* antimycobacterial activity was tested against three rapid growing mycobacteria: *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977),

Mycobacterium fortuitum (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). Microbial strains were cultured 24h at 37°C for bacteria on the Mueller-Hinton agar, 48h at 25°C for yeasts on the Sabouraud agar and 72h at 35°C for mycobacteria on the Mueller-Hinton broth. Standard strains of microorganisms were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), and standard antibiotics chloramphenicol, ampicillin, fluconazole and nystatin were used in order to control the sensitivity of the microbial test. The mycobacteria colonies were isolated on Löwesten-Jensen solid medium (HiMedia Laboratories) and then cultured in Middlebrook 7H9 broth médium (Difco Laboratories) containing 0.2% (vol/vol) glycerol and 10% (vol/vol) OADC (oleicacid-albumin-dextrose-catalase) (Falkinham, J.O., 2003). The antibiotics tested include clarithromycin (Sigma) and sulfamethoxazole (Fluka).

2.5.2. Microdilution method

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined on 96 well culture plates by a microdilution method using a microorganism suspension at a density of 10^5 CFU mL⁻¹ with Casein Soy Broth incubated for 24 h at 37°C for bacteria (NCCL, 2002b) and Sabouraud Broth incubated for 72h at 25°C for yeasts (NCCL, 2002a). MIC values were defined as the lowest concentration of extract, fraction or pure substance where $\geq 50\%$ of the microorganisms were inhibited. The cultures that did not present any growth were used to inoculate plates of solid medium (Casein Soy Broth and Sabouraud Broth) in order to determine the minimal lethal concentration (MLC). Proper blanks were simultaneously assayed and samples were tested in triplicate.

For the antimycobacterial activity, the standard broth microdilution method of CLSI M24-A2 (Woods et al., 2011) was used for the performance of the susceptibility test. The standardization of the inoculum density for the susceptibility test was performed according to Mac Farland 0.5 scale. For the final inoculum preparation (5×10^5 CFU/mL) the volume of 50 μ l

of bacterial suspension was transferred to a test tube containing 10mL of Mueller-Hinton broth (Merck). In sterile titration microplates it was added 100 μ L of dilution of the extracts/compounds and the inoculum in equal volume. The reading was made after 72h incubation at 35°C and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. This test was performed in triplicate and the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride was used as an indicator of microbial growth (CLSI, 2013).

3. Results and discussion

The *A. triangularis* species has appeared as a potential source of *naturally* occurring antimicrobial and antimycobacterial agents in many phytochemical studies about medicinal plants. Some previous studies demonstrated the antimicrobial activities of extracts and substances isolated from some species of *Aristolochia* (Pacheco et al., 2010; Andrade et al., 2011; Silva Jr et al., 2013; Li et al., 2013; Abbouyi et al., 2016). In the present work we have investigated the activities of methanol extract (ME), acidic ethereal (AEF), basic ethereal (BEF), basic ethyl acetate (BAF) and aqueous (AF) fractions of *A. triangularis* rhizomes and stems against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. The standard references employed were chloramphenicol, ampicillin, fluconazole and nystatin. The assays showed antibacterial potential of both extract and fractions with MIC values between 15.6 and 500 μ g/mL (Table 1). Fraction AEF was the most effective to inhibit the Gram-positive *Bacillus cereus* and the Gram-negative bacteria *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* and *Enterobacter aerogenes*, while the Gram-negative *Shigella flexneri* was the most sensitive to the BAF fraction (MICs of 15.6 μ g/mL). All extracts and fractions showed potential to inhibit the growth of the tested fungi (Table 2). *Candida krusei* was the most sensitive to the BEF and BAF basic fractions (MIC values of 31.2 μ g/mL).

Since AEF was the most active against the microorganisms tested, this was the fraction highlighted for the phytochemical analysis to identify which components are responsible for the antimicrobial activities. The AEF chromatographic purification resulted in nine compounds, among them, three diterpenes (**1**, **4**, **5**), four lignans (**2**, **6**, **7a**, **7b**), one sesquiterpene (**3**) and one alkaloid (**8**). The compounds (Figure 1) were identified as *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) (Silva et al., 2012), zuonin B (**2**) (Herath and Priyadarshani, 1996), nerolidol (**3**) (Suarez et al., 2002), (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) (Zhang et al., 2008), *ent*-Kauran-16 β ,17-diol (**5**) (Pacheco et al., 2009), dihydrocubebin (**6**) (Cabanillas et al., 2010), α and β -cubebin (**7a** + **7b**) (Blumenthal et al., 1997) and aristolactam BII (**8**) (Kim et al., 2008) through the comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature. Furthermore, compounds **5** and **7b** presented crystals which were analyzed by X-ray diffraction (Supplementary Material) to provide the relative configuration of the stereogenic centers of the structures.

When we had the isolated compounds, all of them were examined for their potential antifungal and antibacterial properties, except for the lignan **6** that was isolated in insufficient quantity to perform all the antimicrobial assays. The highest activity was observed by (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) against *Shigella sonnei*, which was highly susceptible to this diterpene showing the same activity potential compared to the antibacterial chloramphenicol (MICs at < 1.5 $\mu\text{g/mL}$). Together with other *Shigella* species, *S. sonnei* is responsible for shigellosis, an important global cause of gastroenteritis and dysentery. Furthermore, **4** also exhibited exceptional bacteriostatic and bactericidal (MIC/MLC = 3.1/6.2 $\mu\text{g/mL}$) activity against *Enterobacter aerogenes*, being considered a better bactericidal than the controls ampicillin and chloramphenicol, and it also presented high bioactivity in our assays against other Gram-negative bacteria as *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* and against the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* (MIC values - 3.1 $\mu\text{g/mL}$). *Shigella flexneri* was sensitive to the natural compounds **1**, **4** (MICs values - 6.2 $\mu\text{g/mL}$), **2** and **3** (MICs

-12.5 µg/mL), as demonstrated in Table 1. Besides, *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) showed relevant activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* (MICs = 12.5 µg/mL). In a previous study, Mendoza et al. (1997) described the antimicrobial activity of **4** against *S. aureus* and *Bacillus cereus* with MICs of 16 and 125 µg/mL, respectively. After analyzing the available data, our group did not find any register of antimicrobial activity concerning the compound **1**. As previously observed by Bonikowski et al. (2015), in this study the Gram-negative strains seem to be more sensitive than Gram-positive to sesquiterpene **3**. To evaluate the aldehyde group influence in the antimicrobial activity in compound **1**, we obtained the oxime **9** by reaction of **1** with NH₂OH.HCl. As it is shown in Table 1, the presence of an aldehyde group in C-19 seems to be important in the *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) activity except for one bacterium. Contrary to what was observed with most of the tested bacteria, oxime **9** showed higher activity than the parent compound **1** against *Shigella flexneri*, with MIC value of 6.25 µg/mL. The diterpene **5**, the mixture of cubebins (**7a** + **7b**) and the alkaloid **8** presented the weakest antibacterial activity, with MICs values of 50 - 200 µg/mL. The greatest antifungal activity observed in our assays was against *Candida krusei* where the compounds **4** and **8** significantly inhibited the fungus growth (MICs = 6.2 µg/mL) (Table 2).

According to studies carried out by Oliveira et al. (2007), hydroalcoholic extracts prepared from *A. triangularis* by a Brazilian indigenous community showed promising activity against *M. tuberculosis*, with a reduction of two logarithmic orders of magnitude in the number of viable bacteria after thirty minutes of mycobacteria/extract contact and the absence of viable mycobacteria after one hour contact. Based on their results, we decided to investigate, for the first time, the antimycobacterial activity of *A. triangularis* ME, all fractions and the *isolated major compounds* **2**, **3** and **4** against the mycobacteria shown in Table 3. The standard references used in these assays were clarithromycin and sulfamethoxazole (Flores et al., 2016).

All methanol extract (ME), fractions AF, AEF, BEF and BAF and the tested isolates showed a promising degree of antimycobacterial activity mainly against *Mycobacterium abscessus*, where ME, AF and AEF showed MICs between 4.8 and 21.4 $\mu\text{g/mL}$. The pure metabolite nerolidol (**3**) displayed the highest antimycobacterial activity (MICs of 4.9 - 19.9 $\mu\text{g/mL}$).

4. Conclusion

We have isolated from *Aristolochia triangularis* acid ethereal fraction a variety of metabolites as terpenoids, lignans and one alkaloid. In addition, we prepared an oxime derivative from the diterpene *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) that has not been described in the literature so far. Extract and pure compounds isolated from *A. triangularis* showed promising antimicrobial activities. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) presented an activity potential when compared to the antibacterial chloramphenicol against the *Shigella sonnei* and together with the compound **1**, it was the most effective to inhibit the tested microorganisms *making them* appropriate *candidates* for antimicrobial agents. Thus, it is possible to open up the spectrum for new perspectives concerning the use of natural products to minimize problems as antimicrobial resistance. Based on the results with three strains of mycobacteria, we can conclude that the antimycobacterial activity exhibited by the *A. triangularis* main constituent, the lignan zuonin B (**2**), and by the sesquiterpene **3** significantly contribute to the antimycobacterial properties. However, together with compound **4**, these substances may not be the only active compounds from this medicinal plant. This way, new studies are being carried out to increase the knowledge about *A. triangularis* mycobacterial action.

Acknowledgements

This research was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Authors would like to thank Prof. Dr. Cristina Nogueira for providing us with a microplate reader, Prof. Dr. Erico M. Flores (UFES) for the analysis by mass spectrometry.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at ...

References

- Abbouyi, A.E., Maliki S. E., Filali-Ansari, N., Khyari, S.E. 2016. Antibacterial and antifungal activities of rhizomes extract from *Aristolochia clematitis*. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 6, 72-75.
- Andrade, B.B., Moreira, M.R., Ambrosio, S.R., Furtado, N.A.J., Cunha, W.R., Heleno, V.C.G., Silva, A.N., Simão, M.R., Rocha, E.M.P., Martins, C.H.G., Veneziani, R.C.S. 2011. Evaluation of *ent*-kaurenoic acid derivatives for their anticariogenic activity. *Nat. Prod. Commun.* 6, 777-780.
- Baptista, M.M., Ramos, M.A., Albuquerque, U.P., Souza, G.C., Ritter, M.R., 2013. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9, 1-16.

Benarba, B., Ambroise, G., Aoues, A., Meddah, B., Vazquez, A., 2012. *Aristolochia longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *Int. J. Green Pharm.* 6 45-49.

Blumenthal, E.E., Silva, M.S., Yoshida, M., 1997. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, 46, 745-749.

Bonikowski, R., Świtakowska, P., Kula, J. 2015. Synthesis, odour evaluation and antimicrobial activity of some geranyl acetone and nerolidol analogues. *Flavour Fragr. J.* 30, 238–244.

Cabanillas, B.J., Lamer, A., Castillo, D., Arevalo, J., Rojas, R., Odonne, G., Bourdy, G., Moukarzel, B., Sauvain, M., Fabre, N., 2010. Caffeic Acid Esters and Lignans from *Piper sanguineispicum*. *J. Nat. Prod.* 73, 1884–1890.

Ciccia, G., Coussio, J., Mongelli, E., 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J. Ethnopharmacol.* 72(1), 185-189.

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, Perform. Stand. Antimicrob. susceptibility Test., 22th informational supplement. M100 e S23, Clinical and laboratory standards Institute, Wayne, PA, 2013.

Corrêa, C., Biasi, L. 2003. Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.). *R. Bras. Agrociência* 9, 233-235.

Do Nascimento, D.S., Cervi, A.C., Guimarães, O.A. 2010. A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 24, 414-422.

Falkinham, J.O. 2003. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5685-5689.

Flores, V.C., Siqueira, F.S., Mizdal, C.R., Bonez, P.C., Agertt, V.A., Stefanello, S.T., Campos, M. M. A., 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microbial Path.*, 99, 229-235.

- França, V.C., Vieira, K.V.M., Lima, E.O. L., Barbosa Filho, J.M., Da Cunha, E.V., Silva, M.S.D. 2005. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht.(Aristolochiaceae). Rev Bras Farmacogn. 15, 326-330.
- Francisco, M.C., Nasser, A.L.M., Lopes, L.M. 2003. Tetrahydroisoquinoline alkaloids and 2-deoxyribonolactones from *Aristolochia arcuata*. Phytochemistry, 62, 1265-1270.
- García, V.M.N., Rojas, G., Zepeda, L.G., Aviles, M., Fuentes, M., Herrera, A., Jiménez, E. 2006. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. Pharm. Biol. 44, 297-300.
- Herath B.H.M.T., Priyadarshani, A.M.A., 1996. Two lignans and an aryl alkanone from *Myristica dactyloides*. Phytochemistry 42, 1439-1442.
- Holzbach, J.C.; Lopes, L.M.X., 2010. Aristolactams and alkamides of *Aristolochia gigantea*. Molecules 15, 9462-9472.
- Hueso-Falcón, I., Girón, N., Velasco, P., Amaro-Luis, J.M., Ravelo, A.G., Heras, B., Hortelano, S., Estevez-Braun, A., 2010. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. Bioorg. Med. Chem. 18, 1724–1735.
- Kim, J.K., Kim, Y.H., Nam, H.T., Kim, B.T., Heo, J., 2008. Total synthesis of aristolactams via a one-pot Suzuki-Miyaura coupling/aldol condensation cascade reaction. Org. Lett. 10, 3544-3546.
- Li, Z., Njateng, G..S.S., He, W., Zhang, H., Gu, J., Chen, J., Du, Z. 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Edible Aromatic Plant *Aristolochia delavayi*. Chem. Biodivers. 10, 2032-2041.
- Lin, W.H., Fu, H.Z., Hano, Y., Nomura, T., 1997. Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (I). J. Chin. Pharm. Sci. 6, 8-13.
- Lopes, L.M., Bolzani, V.D.S., Trevisan, L.M., Grigolli, T.M., 1990. Terpenes from *Aristolochia triangularis*. Phytochemistry 29, 660-662.

- Machado, M.B., Lopes, L.M., 2010. Dimeric alkaloids and flavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 110-115.
- Machado, T.B., Leal, I.C.R., Kuster, R.M., Amaral, A.C.F., Kokis, V., de Silva, M.G., dos Santos, K.R.N., 2005. Brazilian phytopharmaceuticals—evaluation against hospital bacteria. *Phytother. Res.* 19, 519-525.
- Marchesini, A.M., Prado, G.G., Messiano, G.B., Machado, M.B., Lopes, L.M., 2009. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 1598-1608.
- Mendoza, A., Wilkens, M., Urzfla, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 58, 85-88.
- NCCL National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. CLSI document M27 e A2.
- NCCL National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. CLSI document M7 e A5.
- Oliveira, D.G., Prince, K.A., Higuchi, C.T., Santos, A.C.B., Lopes, L.M.X., Simões, M.J.S., Leite, C.Q.F. 2007. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28, 165-169.
- Pacheco, A.G., Oliveira, P.M., Piló-Veloso, D., Alcântara, A.F.C., 2009. ¹³C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species. *Molecules* 14, 1245-1262.
- Pacheco, A.G., Silva, T.M., Manfrini, R.M., Sallum, W.S.T., Duarte, L.P., Veloso, D.P., Alcântara, A.F.C., Knupp, V.F. 2010. Estudo químico e atividade antibacteriana do caule de *Aristolochia esperanzae* kuntze (Aristolochiaceae). *Quim. Nova* 8, 1649-1652.

- Pirker, H., Haselmair, R., Kuhn, E., Schunko, C., Vogl, C.R., 2012. Transformation of traditional knowledge of medicinal plants: the case of Tyroleans (Austria) who migrated to Australia, Brazil and Peru. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 8, 44.
- Rücker, G., Langmann, B., 1978. 3, 4-Dimethoxy-3, 4-desmethyldioxycubebin, ein neues lignan aus *Aristolochia triangularis*. *Tetrahedron Lett.* 19, 457-458.
- Scalon, S.P.Q., Sene, P. A. L., Zatti, D. A., Mussury, R. M., Scalon Filho, H., 2007. Temperatura, luz e substrato na germinação de sementes de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangulares* Cham. Et Schl.). *Rev. Bras. Plantas Med.* 9, 32-38.
- Silva Jr, W.F, Cecílio, S.G., Magalhães, C.L.B., Ferreira, J.M.S., Tótola, A.H., Magalhaes, J.C. 2013. Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug. *SpringerPlus* 2, 430-437.
- Silva, D.M., Costa, E.V., Nogueira, P.C., Moraes, V.R., Cavalcanti, S.C., Salvador, M.J., Ribeiro, L.H., Gadelha, F.R., Barison, A., Ferreira, A.G., 2012. *ent*-Kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopiia laevigata* (Annonaceae). *Quim. Nova* 35, 1570-1576.
- Sini, S., Malathy, N.S., 2005. Antimicrobial properties of roots of medicinal plants. *Anc. Sci. life*, 25, 62-65.
- Suarez, L.C., Menichini, F., Monache, F.D, 2002. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*. *J. Braz. Chem.Soc.* 13, 339-344.
- Woods G.L., Brown-Elliott B.A., Conville P.S., Desmond E.P., Hall G.S., Lin G., Witebsky F.G., 2011. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard, v 31, 2ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Wu, T.S., Damu, A.G., Su, C.R., Kuo, P.C., 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 21, 594-624.

- Zhang, G., Shimokawa, S., Mochizuki, M., Kumamoto, T., Nakanishi, W., Watanabe, T., Ishikawa, T., Matsumoto, K., Tashima, K., Horie, S., Higuchi, Y., Dominguez, O., 2008. Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. *J. Nat. Prod.* 71, 1167–1172.
- Zhang, Y.T., Jiang, J.Q., 2006. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). *Helvetica Chim. Acta* 89, 2665-2670.

Table 1.
Antibacterial activity (MIC/MLC in $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of *Aristolochia triangularis* Cham.

Microorganism and MIC/MLC ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Gram-positive bacteria</i>								<i>Gram-negative bacteria</i>						
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Se</i>	<i>Lm</i>	<i>Bs</i>	<i>Ef</i>	<i>St</i>	<i>Ec</i>	<i>Ss</i>	<i>Ea</i>	<i>Pm</i>	<i>Sn</i>	<i>Sf</i>	<i>Pa</i>	<i>Kp</i>
	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC
ME	31.2/ >500	62.5/ >500	250/ 500	250/ 500	250/ 500	250/ >500	31.2/ >500	250/ >500	31.2/ >500	62.5/ 500	500/ >500	500/ >500	250/ >500	62.5/ 500	125/ 500
AF	62.5/ >500	500/ >500	250/ >500	500/ >500	125/ >500	500/ >500	62.5/ >500	250/ >500	62.5/ >500	62.5/ >500	500/ >500	500/ >500	250/ >500	62.5/ >500	125/ 500
AEF	125/ 500	15.6/ 500	125/ 500	250/ 500	125/ >500	500/ >500	15.6/ >500	250/ >500	15.6/ 500	15.6/ 500	500/ >500	500/ >500	500/ >500	31.2/ 500	125/ 500
BEF	62.5/ >500	62.5/ 500	125/ 500	500/ >500	250/ 500	500/ >500	62.5/ >500	500/ >500	62.5/ >500	31.2/ 500	500/ >500	500/ >500	250/ >500	125/ >500	125/ 500
BAF	62.5/ >500	62.5/ 500	125/ 500	500/ >500	125/ 500	500/ >500	62.5/ >500	500/ >500	31.5/ >500	62.5/ >500	500/ >500	500/ >500	15.6/ >500	62.5/ >500	125/ 500
1	12.5/ >200	50/ 50	100/ 200	100/ 200	50/ 200	50/ >200	12.5/ >200	100/ >200	25/ 100	12.5/ >200	200/ >200	200/ >200	6.2/ >200	25/ >200	50/ 200
2	50/ >200	100/ >200	200/ >200	100/ >200	50/ 200	200/ >200	50/ >200	100/ >200	50/ 100	50/ >200	200/ >200	200/ >200	12.5/ >200	200/ >200	50/ 200
3	25/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ 200	100/ 200	200/ >200	25/ >200	100/ >200	25/ >200	50/ >200	200/ >200	100/ >200	12.5/ >200	100/ >200	50/ 200
4	3.1/ >200	3.1/ >200	100/ >200	12.5/ 200	50/ >200	6.2/ >200	3.1/ >200	100/ >200	<1.5/ >200	3.1/ 6.2	200/ >200	200/ >200	6.2/ >200	3.1/ >200	50/ 200
5	50/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ >200	50/ >200	>200/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ >200	50/ >200	200/ >200	100/ >200	100/ >200	200/ >200	50/ 200
7a + 7b	50/ >200	200/ >200	100/ >200	>200/ >200	10/ >2000	200/ >200	50/ >200	100/ >200	100/ >200	50/ >200	200/ >200	200/ >200	100/ >200	200/ >200	100/ >200
8	100/ >200	100/ >200	100/ >200	200/ >200	100/ >200	200/ >200	50/ >200	100/ >200	100/ 200	200/ >200	200/ >200	200/ >200	100/ >200	200/ >200	100/ >200
9	50/ >200	100/ >200	50/ >200	200/ >200	50/ >200	200/ >200	50/ >200	100/ >200	50/ >200	50/ >200	200/ >200	200/ >200	6.2/ >200	100/ >200	50/ 200
AMP	100/ 200	100/ >200	12.5/ 200	<1.5/ <1.5	50/ 200	<1.5/ 12.5	100/ >200	50/ >200	100/ 200	3.1/ >200	<1.5/ 6.2	<1.5/ 6.2	12.5/ >200	25/ >200	50/ 200
CHL	3.1/ 12.5	3.1/ 12.5	3.1/ 6.2	3.1/ 50	3.1/ 100	3.1/ 50	<1.5/ 12.5	6.25/ 100	<1.5/ 12.5	6.2/ 100	6.2/ 50	3.1/ 25	<1.5/ 6.2	6.2/ 25	25/ 200

Sa = *Staphylococcus aureus*; *Bc* = *Bacillus cereus*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Lm* = *Listeria monocytogenes*; *Bs* = *Bacillus subtilis*; *Ef* = *Enterococcus faecalis*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Ss* = *Shigella sonnei*; *Ea* = *Enterobacter aerogenes*; *Pm* = *Proteus mirabilis*; *Sn* = *Salmonella enteritidis*; *Sf* = *Shigella flexneri*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; AMP: Ampicillin; CHL: Chloramphenicol.

Table 2.

Antifungal activity (MIC/MLC in $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of *Aristolochia triangularis* Cham.

	Microorganism and MIC/MLC ($\mu\text{g/mL}$)								
	<i>Fungi</i>								
	<i>Cp</i>	<i>Ct</i>	<i>Ca</i>	<i>Cl</i>	<i>Cd</i>	<i>Ck</i>	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Sc</i>
	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC	MIC/MLC
ME	250/ >500	500/ >500	250/ >500	500/ >500	250/ >500	250/ >500	125/ 500	125/ 250	500/ >500
AF	250/ >500	500/ >500	500/ >500	500/ 500	500/ >500	125/ 500	125/ 500	125/ 250	500/ >500
AEF	250/ >500	500/ >500	250/ >500	500/ >500	250/ >500	62.5/ >500	125/ 125	125/ 250	500/ 500
BEF	250/ >500	500/ >500	500/ >500	250/ >500	500/ >500	31.2/ >500	125/ 125	125/ 250	250/ >500
BAF	250/ >500	500/ >500	500/ >500	250/ >500	500/ 500	31.2/ >500	125/ >500	250/ 250	500/ >500
1	100/ >200	100/ 100	100/ 100	50/ 100	50/ 100	25/ 200	50/ 100	25/ 50	200/ 200
2	100/ >200	100/ >200	100/ >200	200/ >200	100/ 200	50/ 100	50/ 100	100/ 100	100/ >200
3	100/ >200	100/ 200	100/ >200	50/ 200	50/ 100	50/ 100	50/ 50	25/ 50	100/ 200
4	100/ >200	100/ 200	100/ >200	200/ 200	100/ 100	6.2/ 100	100/ 100	50/ 100	100/ >200
5	100/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ 200	25/ 100	100/ 200	50/ >200	100/ >200
7a + 7b	50/ 200	100/ >200	100/ >200	50/ 200	100/ 200	25/ 100	50/ 50	50/ 200	100/ 200
8	100/ >200	100/ >200	100/ >200	100/ 200	100/ >200	6.2/ >200	>200/ >200	100/ >200	200/ >200
9	100/ >200	200/ >200	100/ >200	200/ 200	100/ 200	25/ >200	100/ 100	25/ >200	200/ >200
FLC	3.1/ 100	100/ >200	100/ >200	100/ 200	6.25/ 200	25/ 100	3.1/ 100	3.1/ 50	6.25/ 100
NYT	<1.5/ 3.1	<1.5/ <1.5	<1.5/ <1.5	<1.5/ <1.5	<1.5/ <1.5	<1.5/ 50	<1.5/ <1.5	<1.5/ <1.5	<1.5/ 3.1

Cp = *Candida parapsilosis*; *Ct* = *Candida tropicalis*; *Ca* = *Candida albicans*; *Cl* = *Candida glabrata*; *Cd* = *Candida dubliniensis*; *Ck* = *Candida krusei*; *Cg* = *Cryptococcus gattii*; *Cn* = *Cryptococcus neoformans*; *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*; FLC: Fluconazole; NYT: Nystatin.

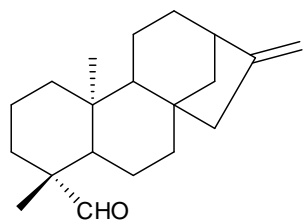
Table 3. Antimycobacterial activity (MIC $\mu\text{g/mL}$) for extract and isolated compounds of *Aristolochia triangularis* Cham.

Microorganism and MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
<i>Mycobacteria</i>			
	<i>Ma</i>	<i>Mf</i>	<i>Mm</i>
	MIC	MIC	MIC
ME	5.1	41.4	165.6
AF	4.8	156.2	156.2
AEF	21.4	85.9	42.9
BEF	42.9	21.4	85.9
BAF	82.8	165.6	82.8
2	10.1	20.3	20.3
3	4.9	9.9	19.9
4	15.6	15.6	15.6
CLR	16.0	1.0	32.0
SMX	8.0	32.0	128.0

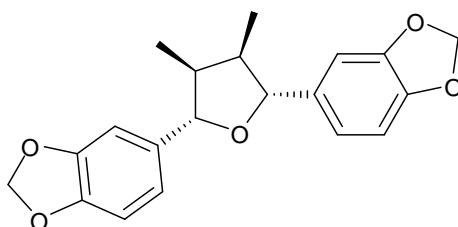
Ma = *Mycobacterium abscessus*; *Mf* = *Mycobacterium fortuitum*; *Mm* = *Mycobacterium massiliense*;
CLR: Clarithromycin; SMX: Sulfamethoxazole.

Figures Subtitles

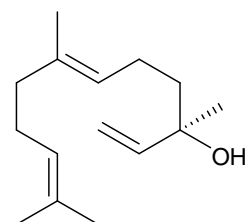
Figure 1. Compounds 1-9 structures.



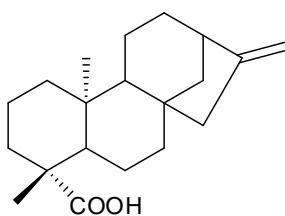
1



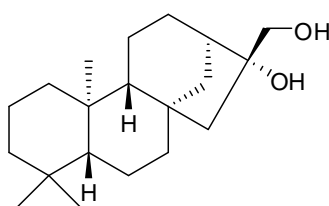
2



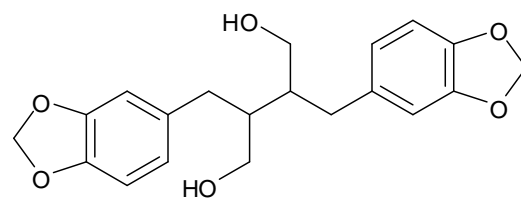
3



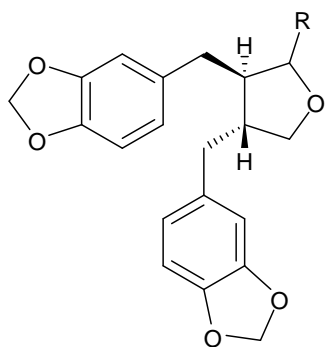
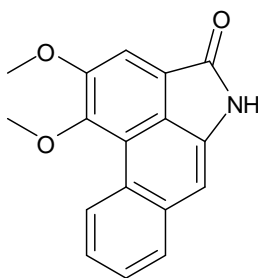
4



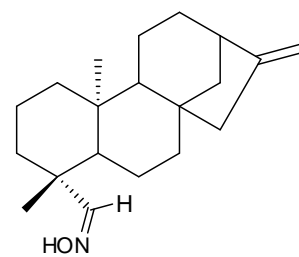
5



6

7a, R: α -OH
7b, R: β -OH

8



9

Supplementary Material

Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil

Alessandra O. Pereira^a, Janaína M. Avila^b, Gabrielle do Carmo^b, Fallon S. Siqueira^c, Marli M.A. Campos^c, Davi F. Back^b, Ademir F. Morel^b, Ionara I. Dalcol^{*,a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author.

E-mail address: iidalcol@gmail.com (I.I. Dalcol)

Tel.: +55 3220 9621; *fax:* +55 3220 8031.

Identification of isolated compounds.

1. ent-Kaur-16-en-19-al (1). White solid, m.p: 104.0-108.0 °C. ¹H NMR (400.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.74 (2H, d, *J*= 1.5 Hz, H-19), 4.80 (1H, m, H-17a), 4.75 (1H, m, H-17b), 2.65 (1H, m, H-13), 2.15-2.12 (1H, dm, *J*= 13.4 Hz, H-3a), 2.07 (2H, m, H-15), 1.98-1.07 (17 H), 0.99 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 205.9 (C=O), 155.5 (C-16), 103.2 (C-17), 56.7 (C-5), 54.5 (C-9), 49.0 (C-15), 48.5 (C-4), 44.0 (C-8), 43.7 (C-13), 41.2 (C-7), 39.9 (C-1), 39.8 (C-14), 39.3 (C-10), 34.2 (C-3), 32.9 (C-12), 24.3 (C-18), 19.8 (C-6), 18.4 (C-2), 18.3 (C-11), 16.3 (C-20).

2. Zuonin B (2). Colorless solid, m.p: 52.0-54.0 °C. LC-MS *m/z*: 340.1 [M]⁺ (calcd. for C₂₀H₂₀O₅; 340.1310). ¹H NMR (400.1 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.92 (2H, d, *J*= 1.7 Hz, H-2 and H-2'), 6.83 (2H, dd, *J*= 1.7, 7.9 Hz, H-6 and H-6'), 6.77 (2H, d, *J*= 7.9 Hz, H-5 and H-5'), 5.94 (4H, s, O-CH₂-O), 4.59 (2H, d, *J*= 9.3 Hz, H-7 and H-7'), 1.75 (2H, m, H-8 and H-8'), 1.02 (6H, d, *J*= 6.2 Hz, H-9 and H-9'). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 147.7 (C-3, C-3'), 146.9 (C-4, C-4'), 136.3 (C-1, C-1'), 119.7 (C-2, C-2'), 107.9 (C-6, C-6'), 106.5 (C-5, C-5'), 100.9 (O-CH₂-O), 88.2 (C-7, C-7'), 51.0 (C-8, C-8'), 13.7 (C-9, C-9').

3. Nerolidol (3). Yellow oil. ¹H NMR (400.1 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 5.92 (1H, dd, *J*= 10.7, 17.3 Hz, H-2), 5.20 (1H, dd, *J*= 1.9, 17.3 Hz, H-1a), 5.15-5.09 (2H, m, H-6 and H-10), 4.96 (1H, dd, *J*= 1.9, 10.7 Hz, H-1b), 2.09-1.94 (6H, m, H-5, H-8 and H-9), 1.65 (3H, s, H-13), 1.58 (6H, s, H-12 and H-14) 1.52-1.47 (2H, m, H-4), 1.22 (3H, s, H-15). ¹³C NMR (100.6 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 147.8 (C-2), 136.1 (C-7), 132.5 (C-11), 126.6 (C-6), 126.1 (C-10), 112.3 (C-1), 73.8 (C-3), 44.2 (C-4), 41.4 (C-8), 29.2 (C-15), 28.3 (C-9), 26.8 (C-13), 24.3 (C-5), 18.7 (C-12), 16.9 (C-14).

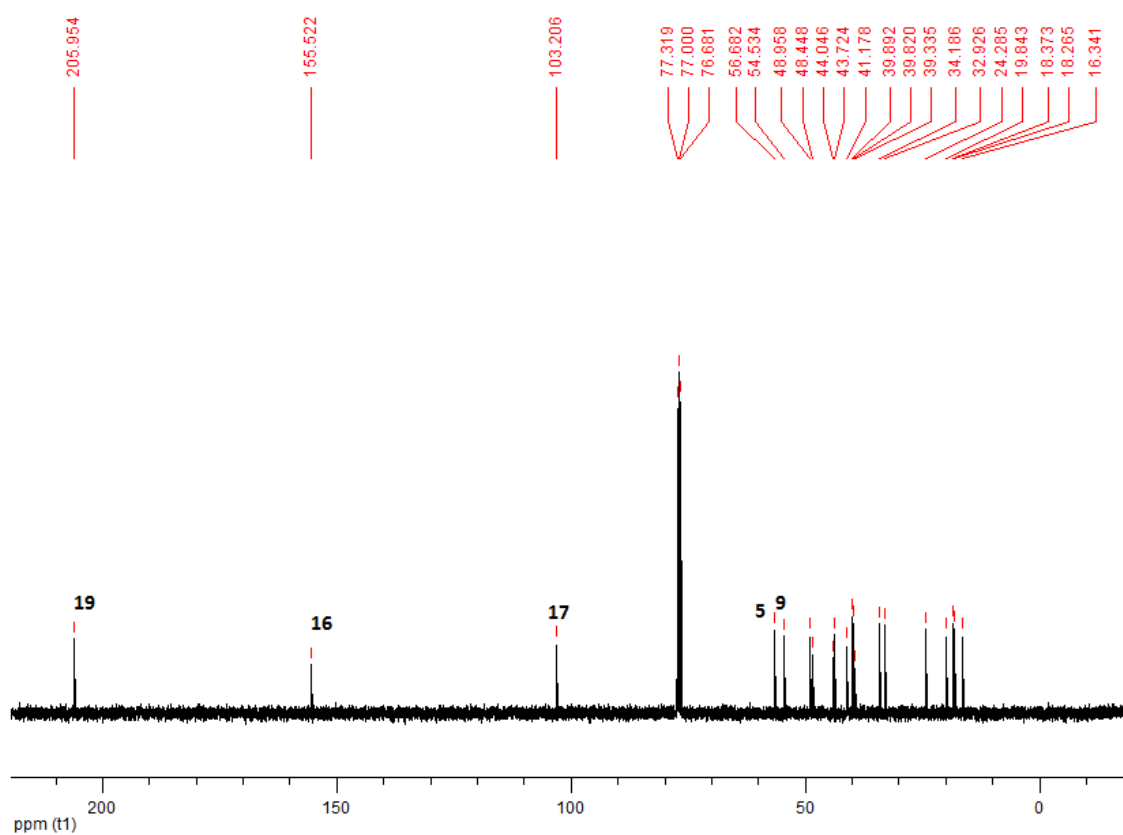
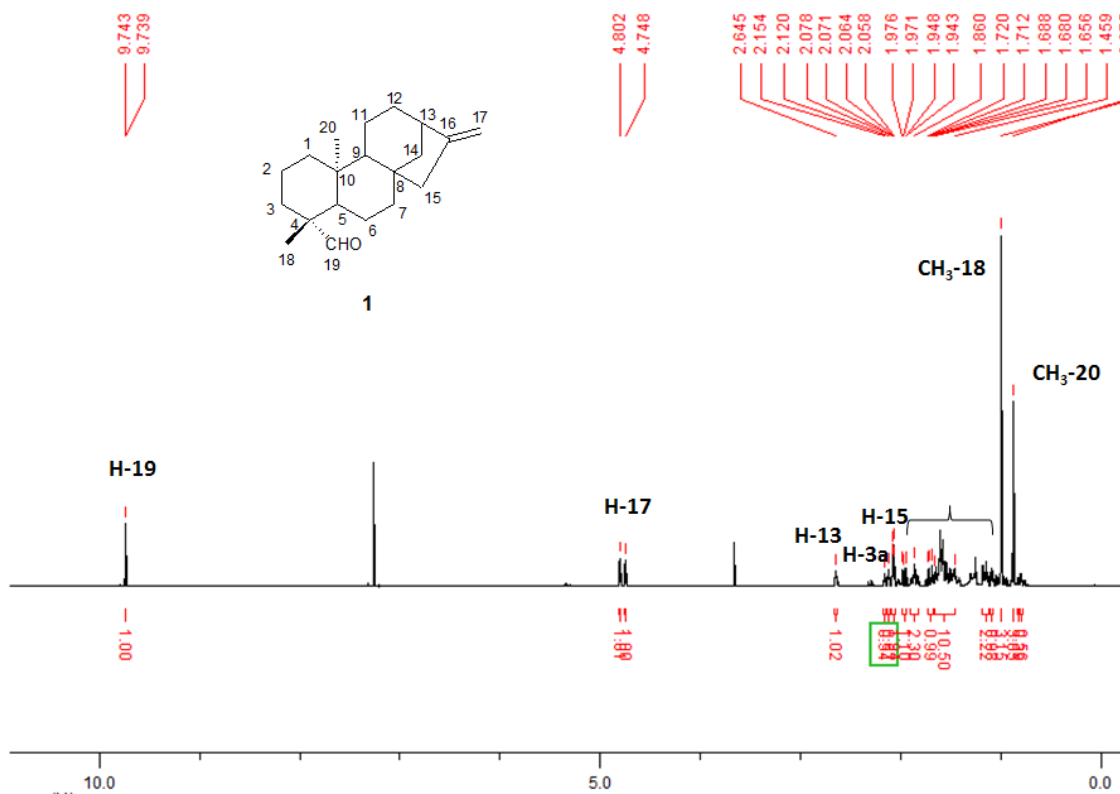
4. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (4). White solid, m.p: 140.0-145.0 °C. LC-MS m/z : 302.1 (calcd. for $C_{20}H_{30}O_2$; 302.2246). 1H NMR (400.1 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 4.78 (1H, br s, H-17a), 4.72 (1H, br s, H-17b), 2.62 (1H, m, H-13), 2.14 (1H, d, $J= 14.4$ Hz, H-3a), 2.04 (2H, m, H-15), 1.97 (1H, d, $J= 11.8$ Hz, H-14a), 1.89-1.81 (4H, m, H-1a, H-6, H-11a), 1.61-1.40 (7H, m, H-2, H-7, H-11b, H-12), 1.23 (3H, s, H-18), 1.14-0.98 (4H, m, H-3b, H-5, H-9, H-14b), 0.93 (3H, s, H-20), 0.81 (1H, dt, $J= 4.0, 13.7$ Hz, H-1b). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 184.6 (C-19), 155.9 (C-16), 103.0 (C-17), 57.0 (C-5), 55.1 (C-9), 48.9 (C-15), 44.2 (C-8), 43.8 (C-13), 43.7 (C-4), 41.2 (C-7), 40.7 (C-1), 39.7 (C-14), 39.6 (C-10), 37.7 (C-3), 33.1 (C-12), 28.9 (C-18), 21.8 (C-6), 19.1 (C-2), 18.4 (C-11), 15.6 (C-20).

5. ent-Kauran-16 β ,17-diol (5). Yellowish solid, m.p: 175.0-177.0 °C. 1H NMR (400.1 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.71 (2H, d, $J= 11.0$ Hz, H-17), 2.03-1.95 (2H, m, H-15), 1.00 (3H, s, H-20), 0.84 (3H, s, H-19), 0.79 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 81.9 (C-16), 66.4 (C-17), 56.7 (C-9), 56.1 (C-5), 53.3 (C-15), 45.5 (C-13), 44.7 (C-8), 42.0 (C-7), 41.9 (C-3), 40.3 (C-1), 39.3 (C-10), 37.3 (C-14), 33.5 (C-18), 33.2 (C-4), 26.3 (C-12), 21.5 (C-19), 20.4 (C-6), 18.5 (C-2), 18.4 (C-11), 17.7 (C-20).

6. Dihydrocubebin (6). Amorphous solid. 1H NMR (400.1 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 6.72 (2H, d, $J= 7.9$ Hz, H-5 and H-5'), 6.65 (2H, d, $J= 1.5$ Hz, H-2 and H-2'), 6.61 (2H, dd, $J= 1.5, 7.9$ Hz, H-6 and H-6'), 5.93 (4H, s, O- CH_2 -O), 3.80 (2H, dd, $J= 1.8, 11.4$ Hz, H-9a and H-9a'), 3.52 (2H, dd, $J= 4.5, 11.4$ Hz, H-9b and H-9b'), 2.76 (2H, dd, $J= 8.8, 13.9$ Hz, H-7a and H-7a'), 2.63 (2H, dd, $J= 6.0, 13.9$ Hz, H-7b and H-7b'), 1.85 (2H, m, H-8 and H-8'). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 147.6 (C-3, C-3'), 145.7 (C-4, C-4'), 134.3 (C-1, C-1'), 121.8 (C-6, C-6'), 109.3 (C-2, C-2'), 108.1 (C-5, C-5'), 100.8 (O- CH_2 -O), 60.4 (C-9, C-9'), 44.2 (C-8, C-8'), 35.9 (C-7, C-7').

7. α and β -cubebin (7a + 7b). Amorphous solid. ^1H NMR (400.1 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.73-6.50 (6H, m, H-ar), 5.93 (2H, s, O- CH_2 -O), 5.91 (2H, s, O- CH_2 -O), 5.22 (1H, m, H-9), 4.10-3.55 (1H, m, H-9'), 2.86-1.97 (6H, m, H-7, H-7', H-8, H-8'). α -cubebin ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 147.5 (C-3), 147.5 (C-3'), 145.8 (C-4'), 145.7 (C-4), 134.1 (C-1'), 133.2 (C-1), 121.7 (C-6'), 121.4 (C-6), 109.1 (C-2'), 108.8 (C-2), 108.1 (C-5), 108.0 (C-5'), 103.3 (C-9), 100.8 (O- CH_2 -O), 100.8 (O- CH_2 -O), 72.2 (C-9'), 53.0 (C-8), 45.8 (C-8'), 39.2 (C-7'), 38.4 (C-7). β -cubebin ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 147.6 (C-3), 147.4 (C-3'), 145.9 (C-4'), 145.7 (C-4), 134.4 (C-1'), 133.8 (C-1), 121.6 (C-6'), 121.3 (C-6), 109.3 (C-2'), 108.9 (C-2), 108.2 (C-5), 108.1 (C-5'), 100.8 (O- CH_2 -O), 100.7 (O- CH_2 -O), 98.8 (C-9), 72.6 (C-9'), 52.0 (C-8), 42.8 (C-8'), 38.8 (C-7'), 33.6 (C-7).

8. Aristolactam BII (8). Yellowish solid, m.p: 256.0-258.0 °C. ^1H NMR (400.1 MHz, CDCl_3 + CD_3OD): δ (ppm) 9.12 (1H, dd, J = 2.4, 6.7 Hz, H-5), 7.85 (1H, s, H-9), 7.76 (1H, dd, J = 2.8, 4.4 Hz, H-*), 7.50- 7.47 (2H, m, H-6 and H-7) 7.00 (1H, s, H-2), 4.03 (3H, s, OCH_3), 4.00 (3H, s, OCH_3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 + CD_3OD): δ (ppm) 170.2 (C=O), 154.1 (C-3), 151.2 (C-4), 134.6 (C-10), 134.1 (C-8a), 128.8 (C-8), 127.2 (C-7), 127.1 (C-5), 126.7 (C-4b), 125.6 (C-6), 123.9 (C-10a), 121.1 (C-4a), 120.5 (C-1), 109.2 (C-2), 106.2 (C-9), 60.0 (OCH_3), 56.5 (OCH_3).



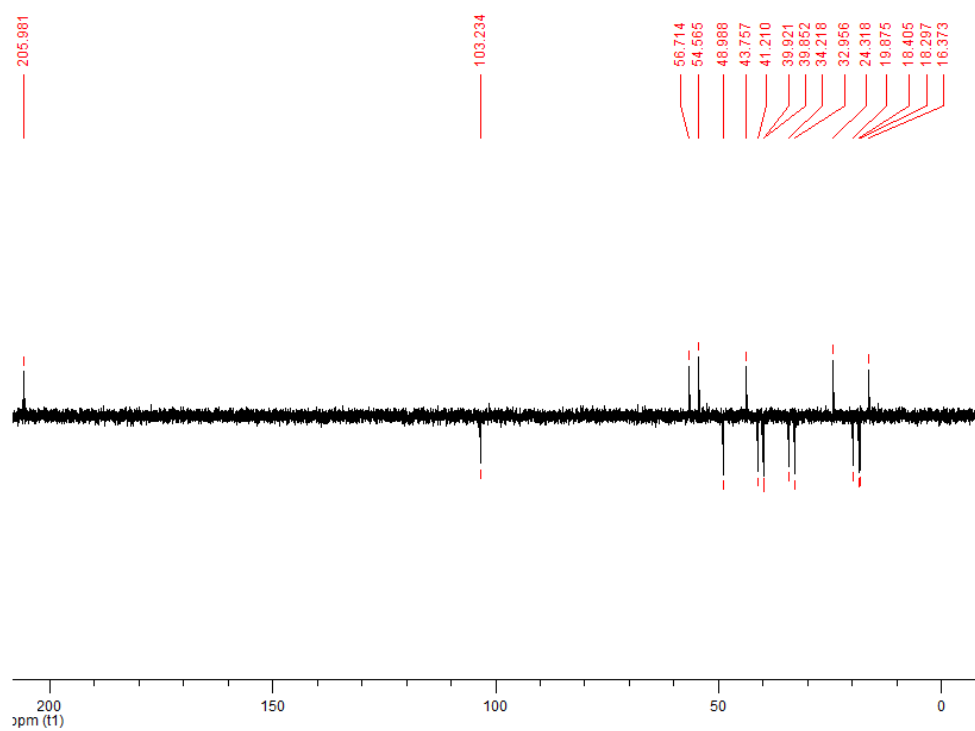


Fig. S3. *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

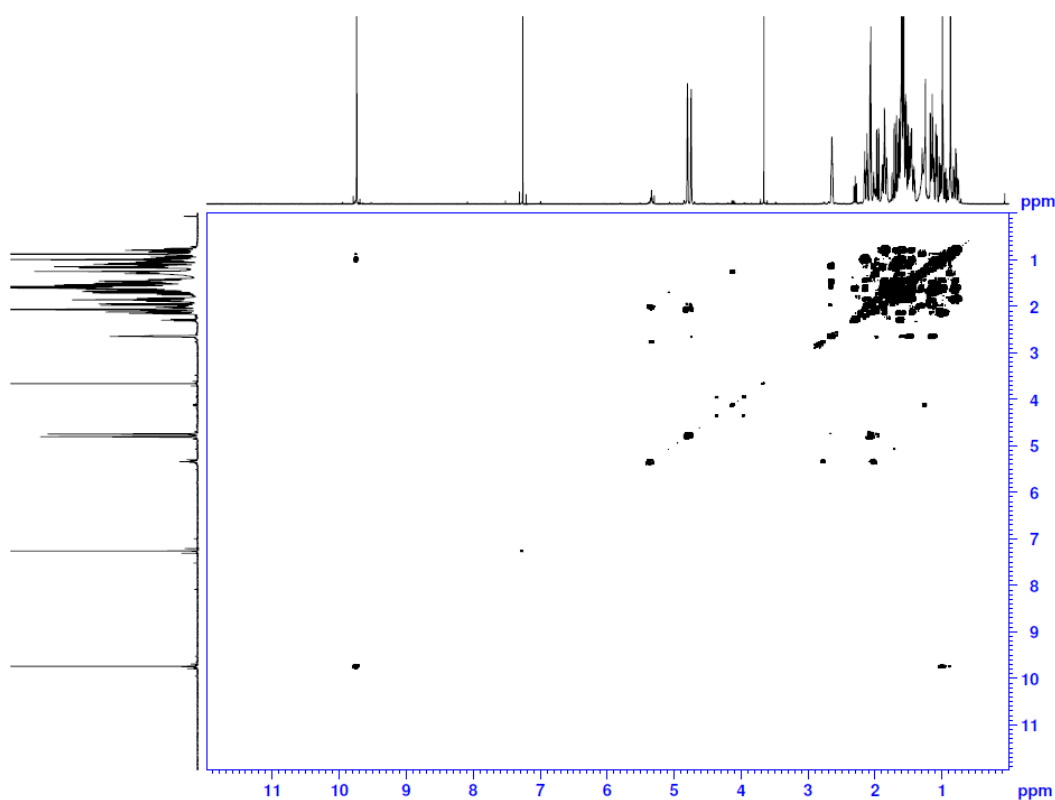


Figure S4. *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃)

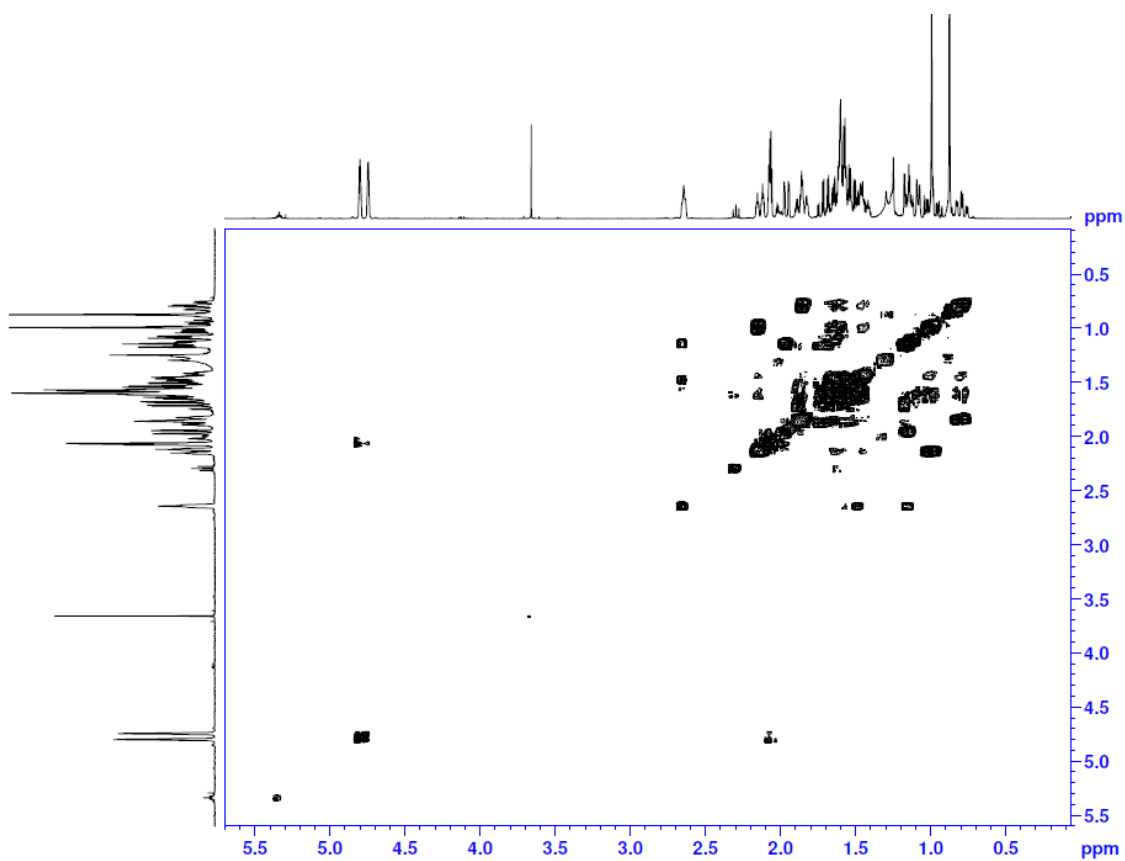


Figure S5. *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃) in the range of δ 6.0-0.0 ppm.

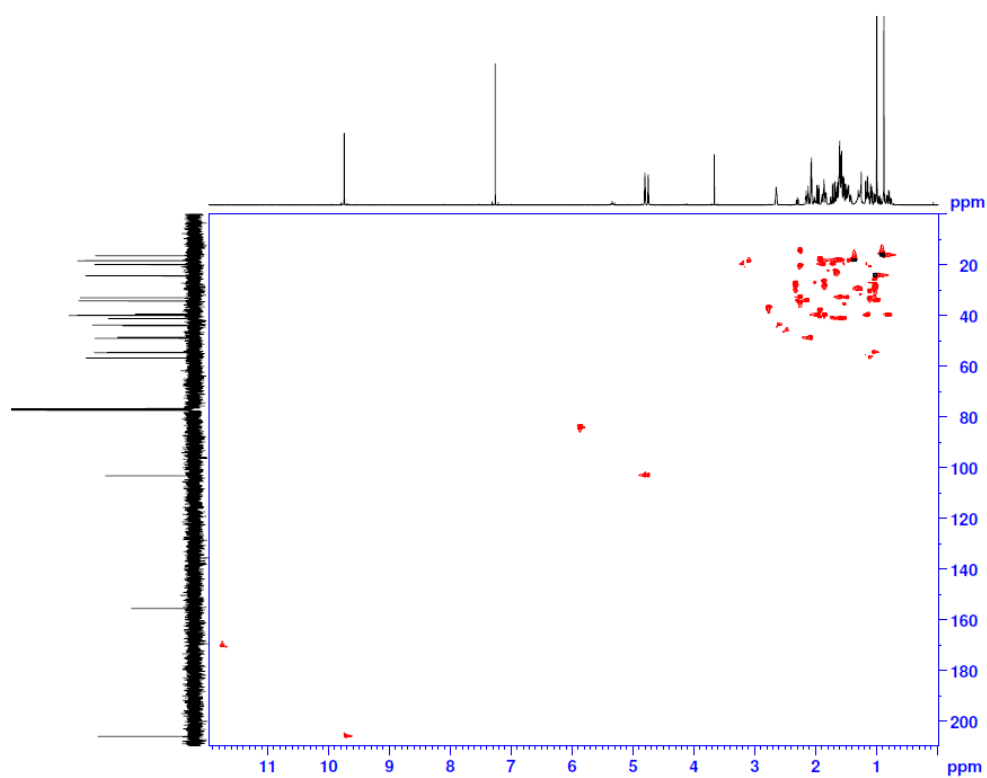


Figure S6. *ent*-Kaur-16-en-19-al (**1**) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

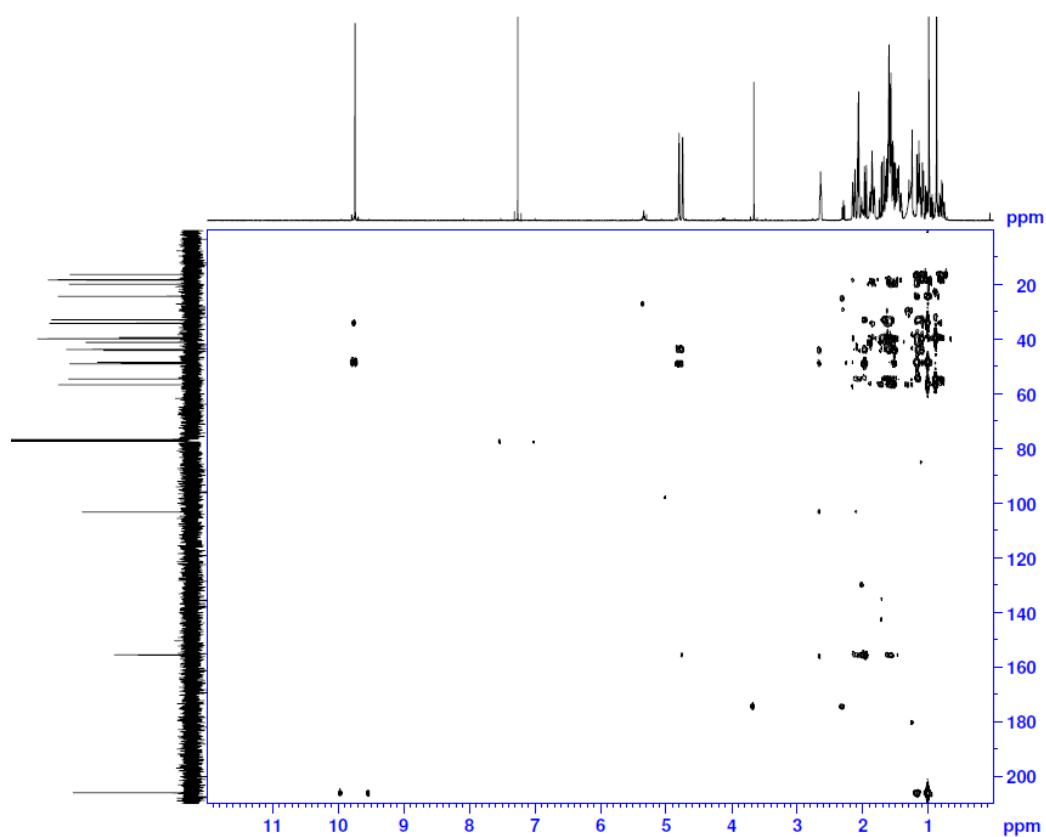


Figure S7. *ent*-Kaur-16-en-19-al (1) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

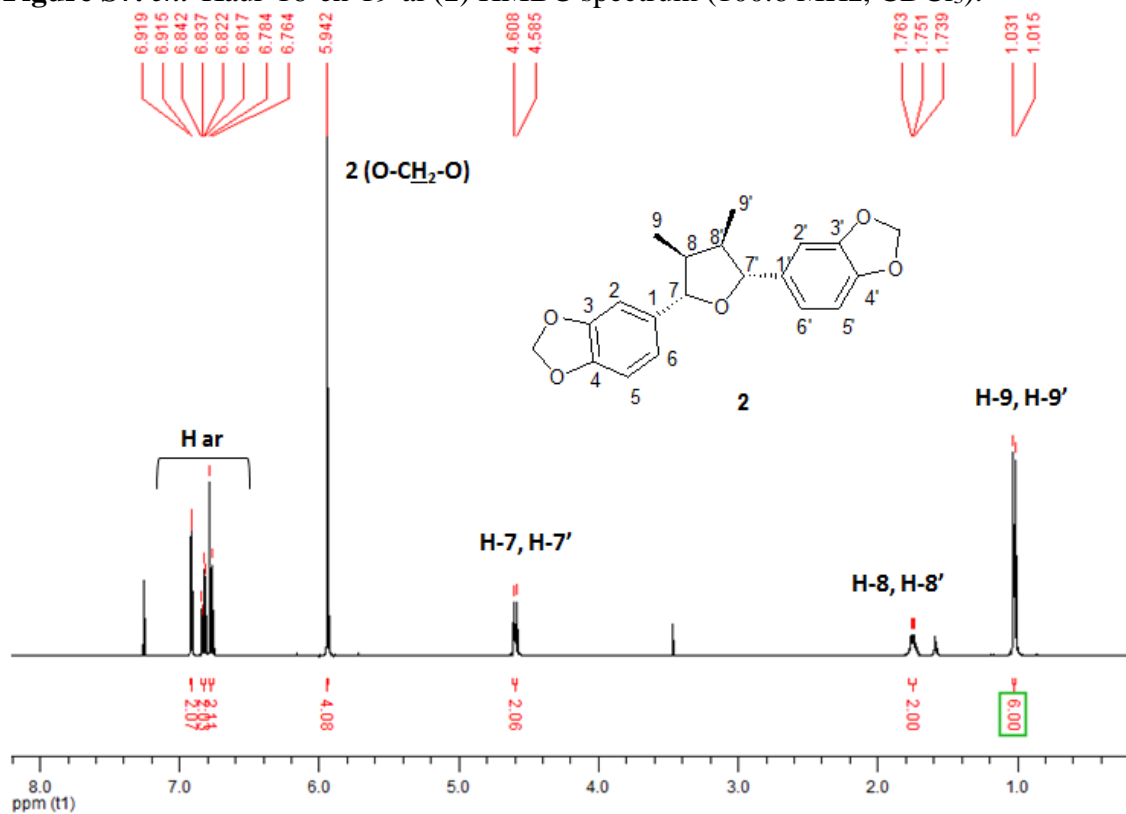


Figure S8. Zuonin B (2) ¹H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl₃).

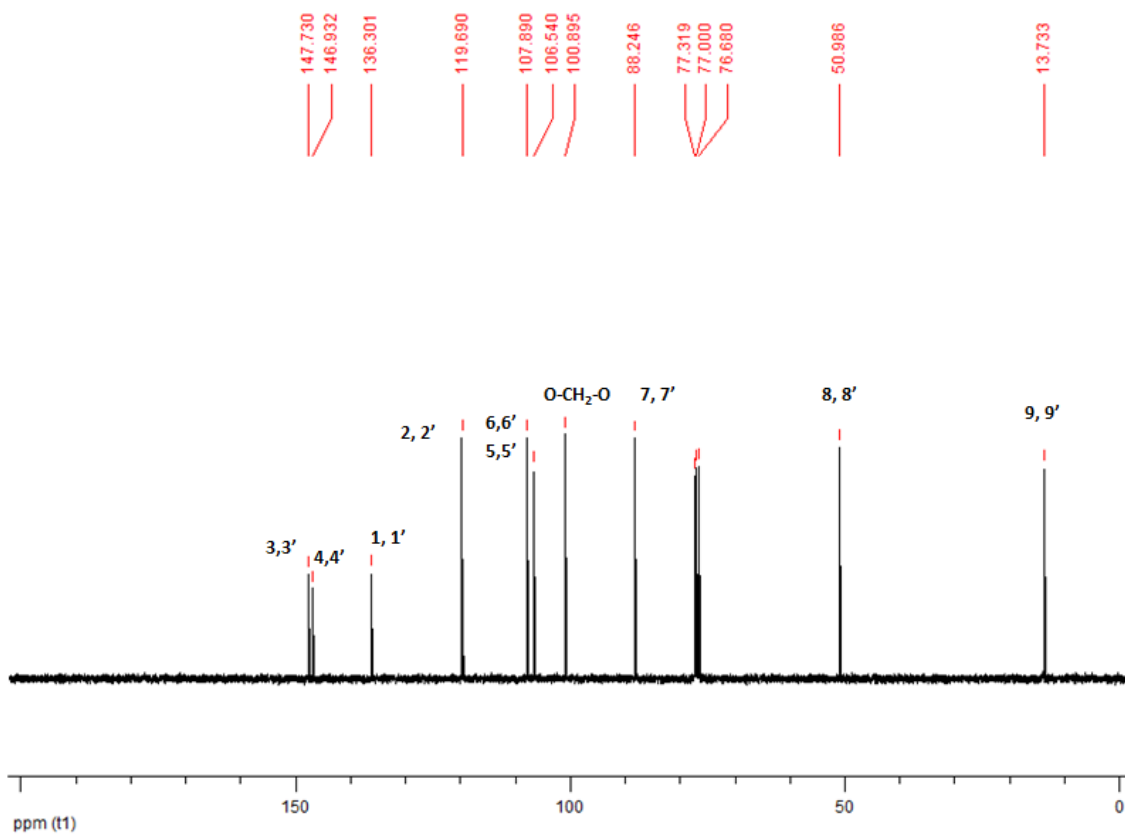


Figure S9. Zuonin B (2) ¹³C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

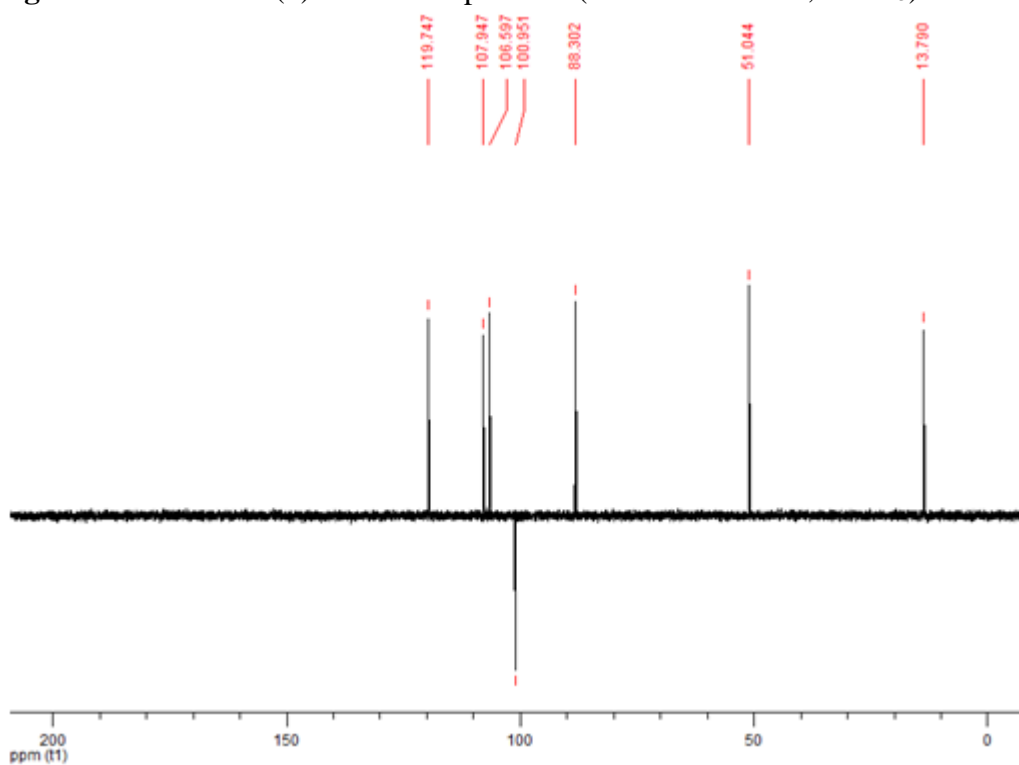


Figure S10. Zuonin B (2) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

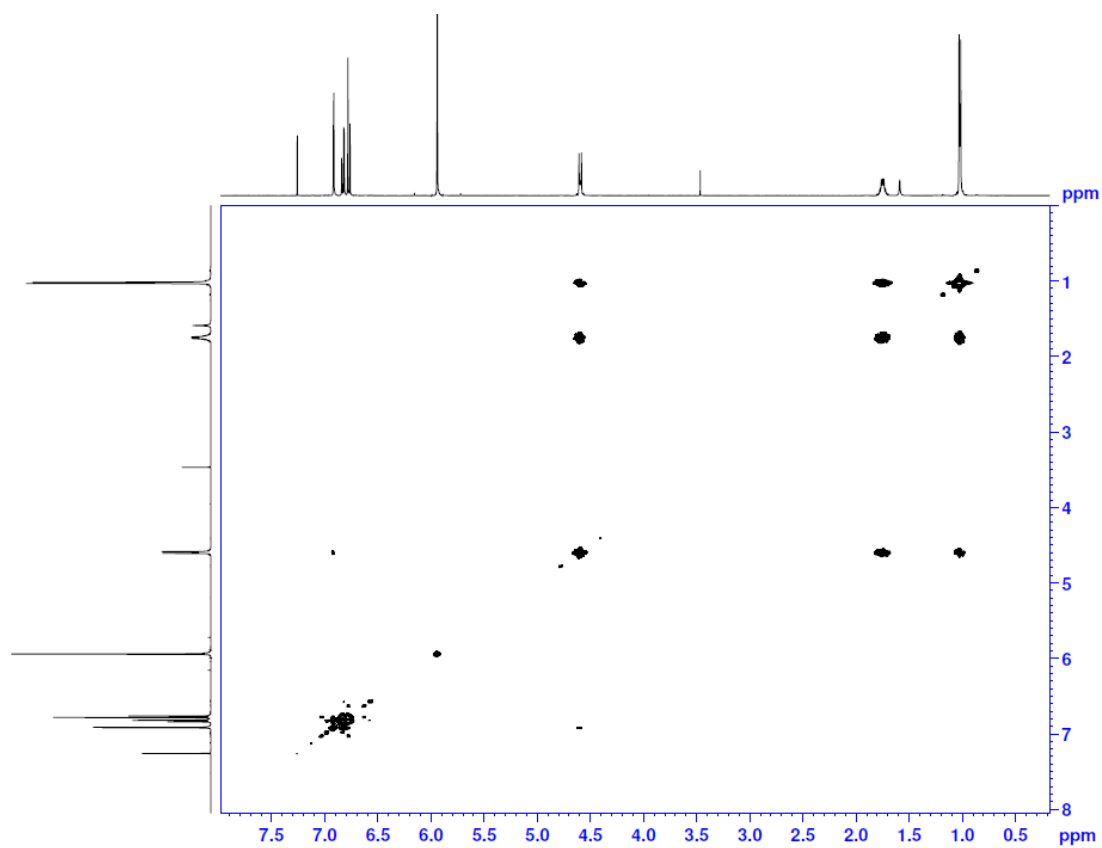


Figure S11. Zuonin B (2) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃).

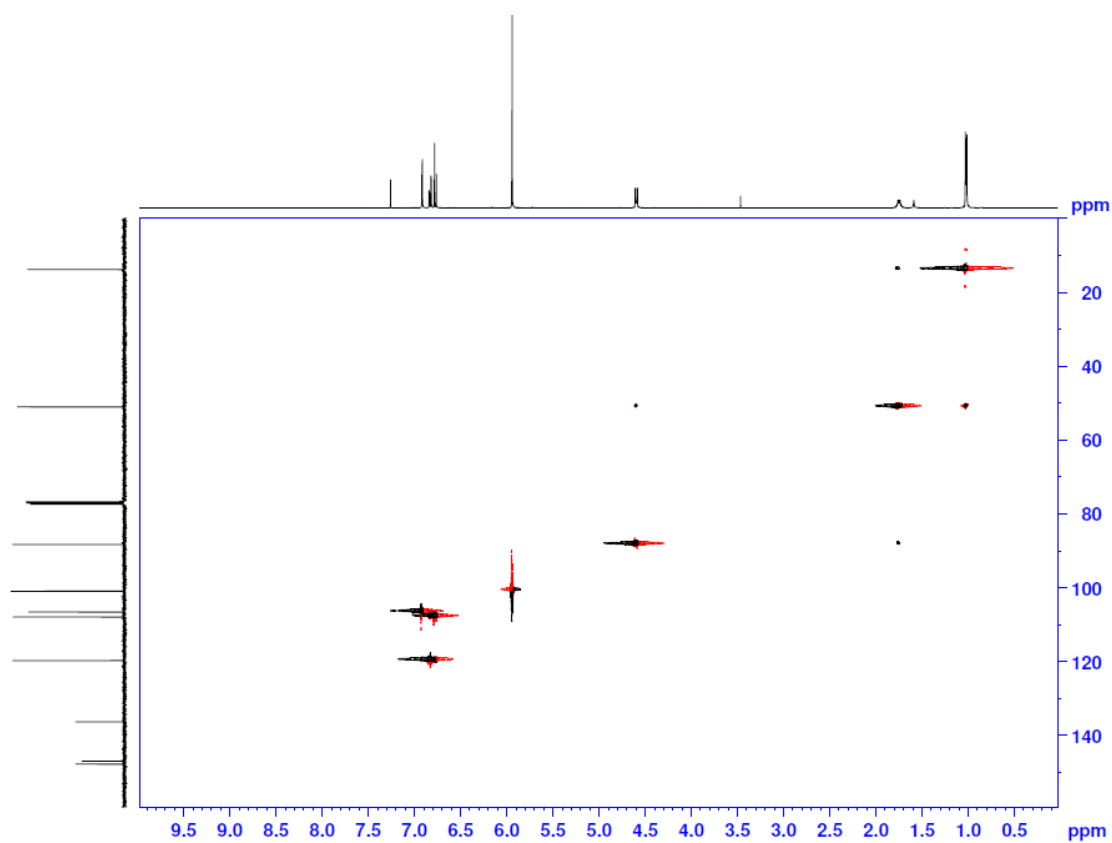


Figure S12. Zuonin B (2) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

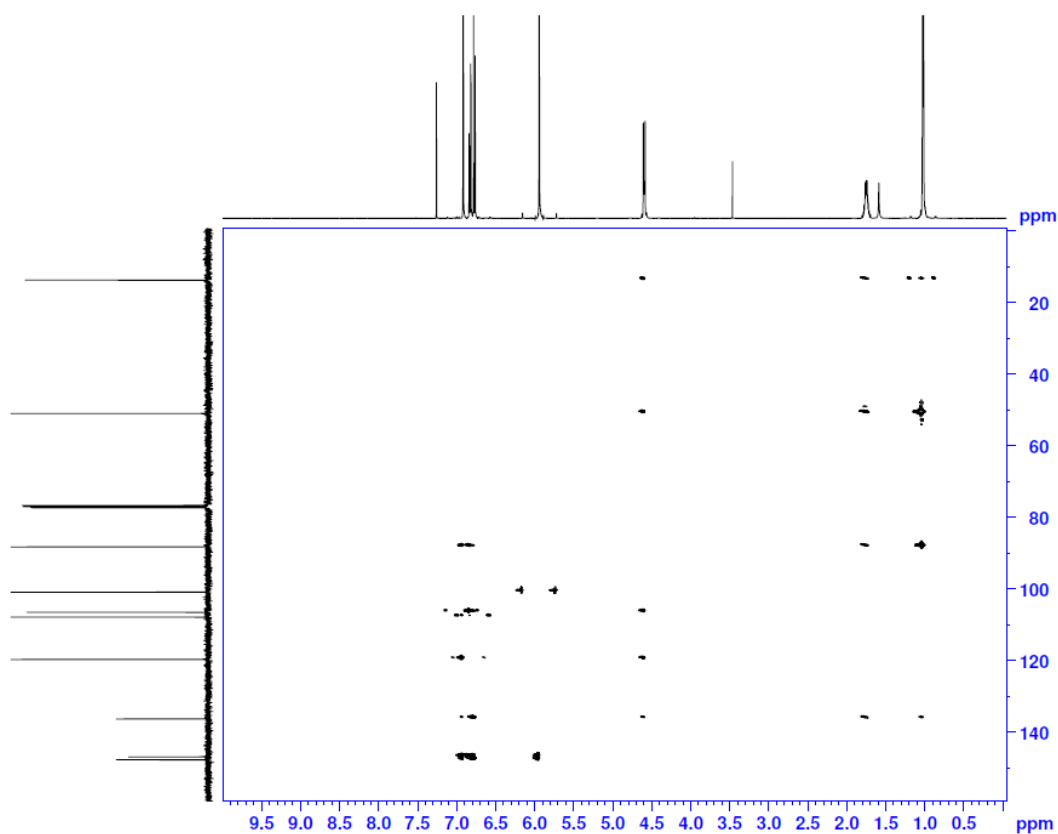


Figure S13. Zuonin B (2) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

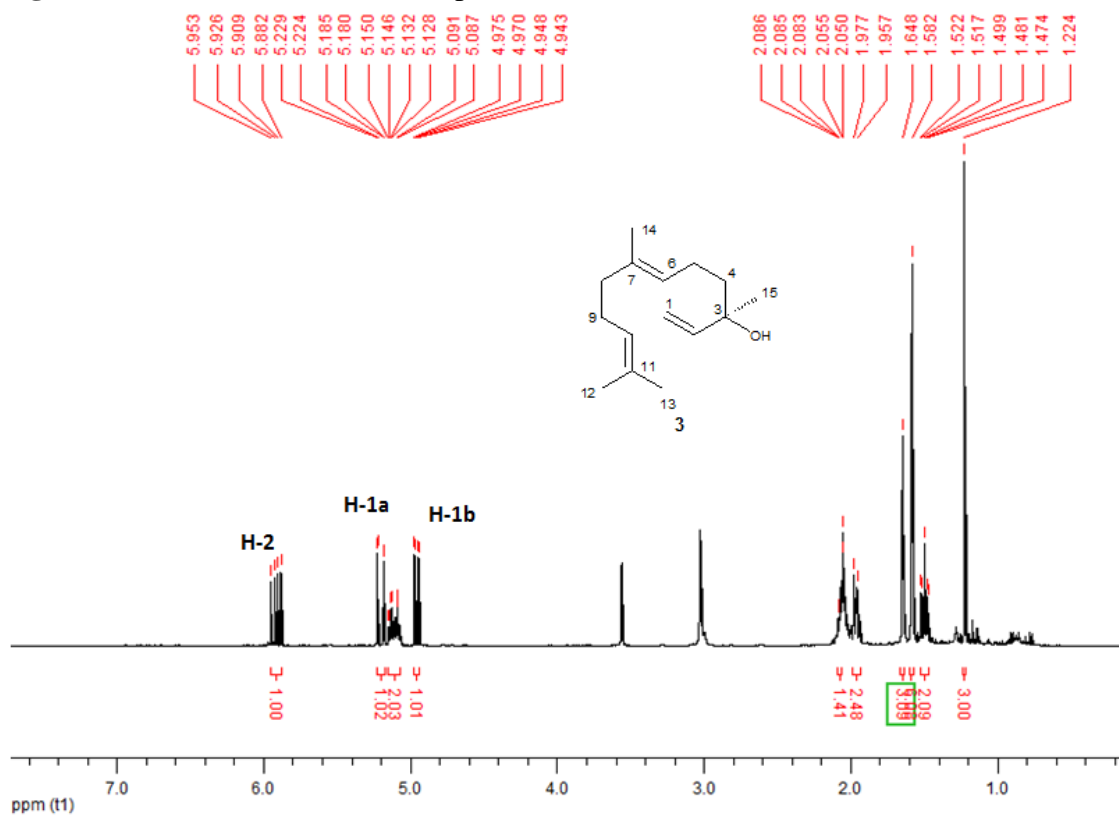


Figure S14. Nerolidol (3) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

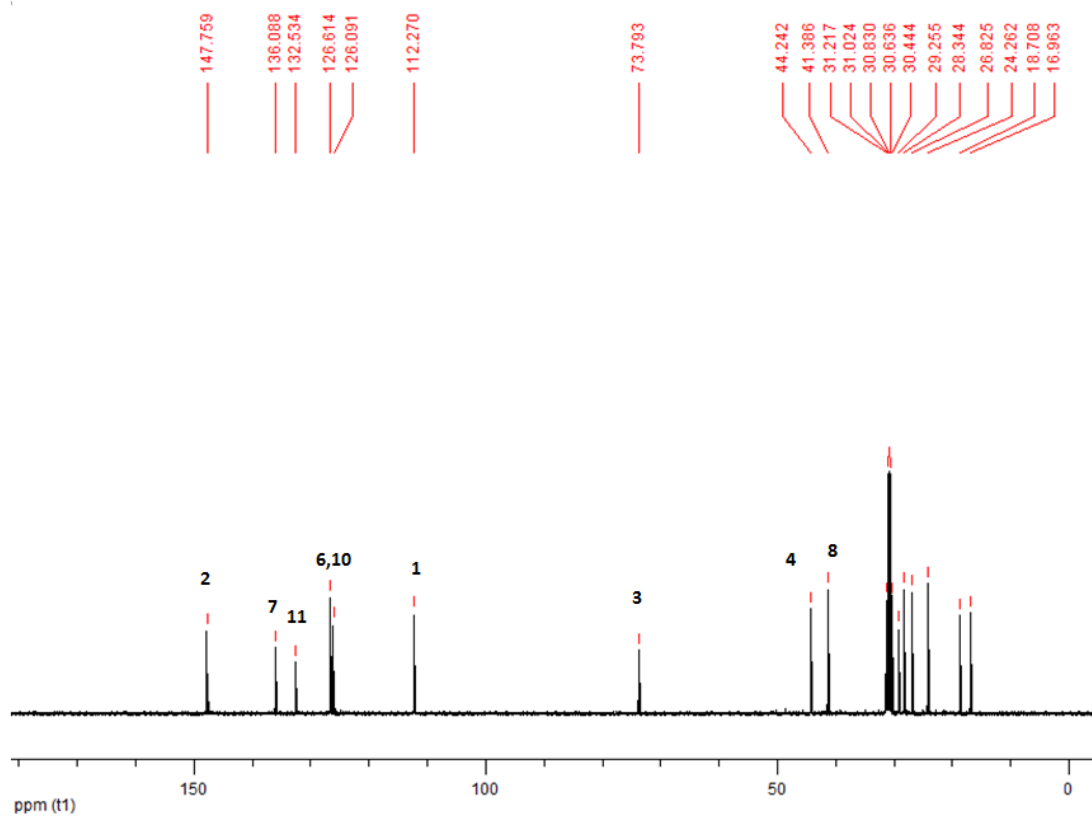


Figure S15. Nerolidol (**3**) ¹³C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

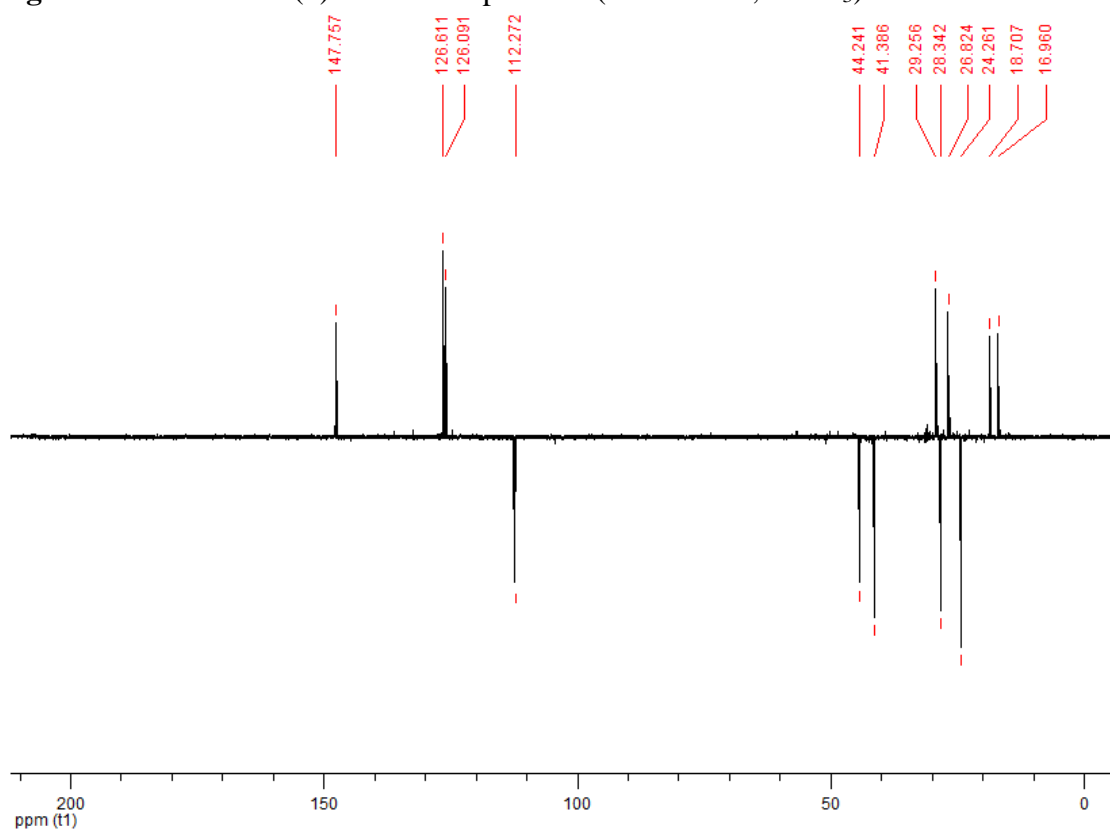


Figure S16. Nerolidol (**3**) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

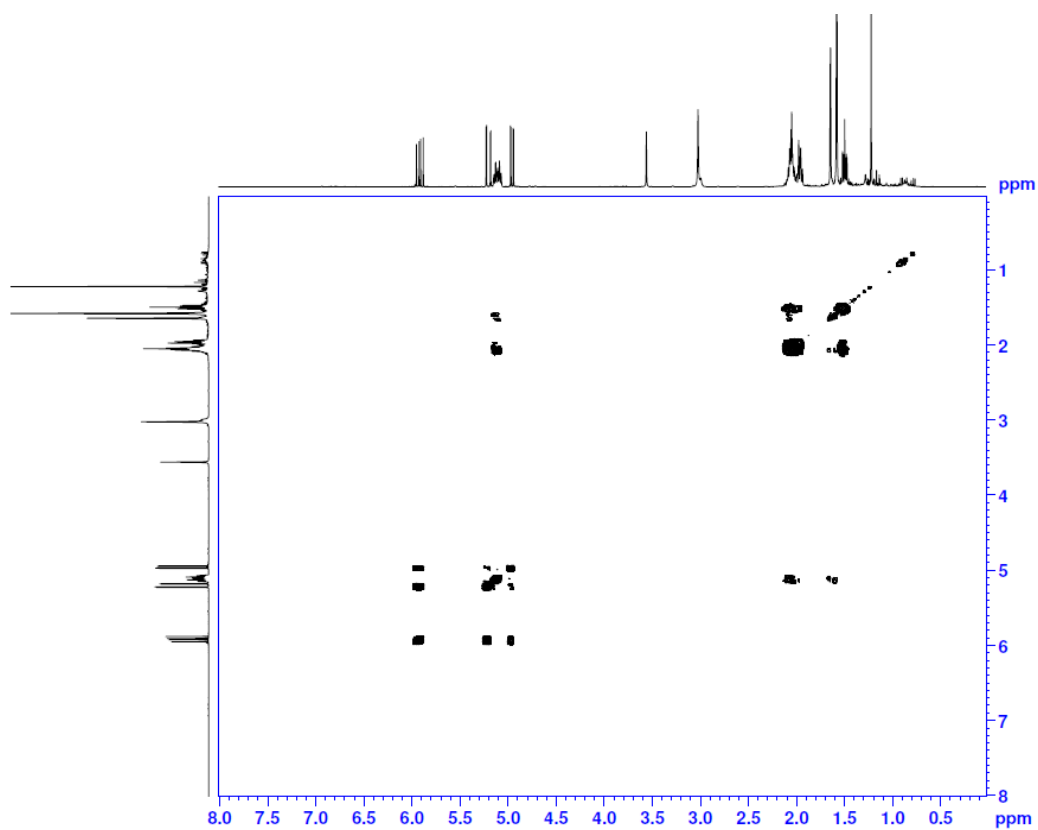


Figure S17. Nerolidol (3) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃).

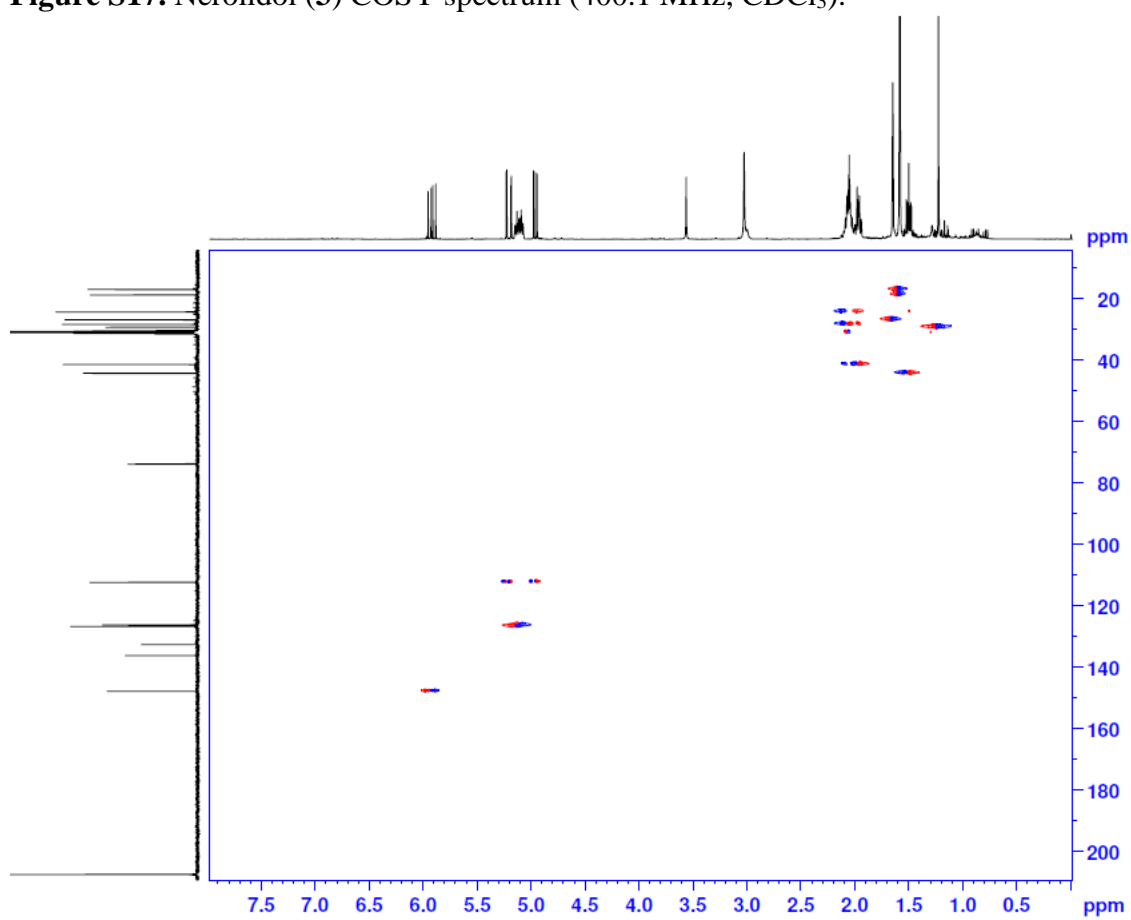


Figure S18. Nerolidol (3) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

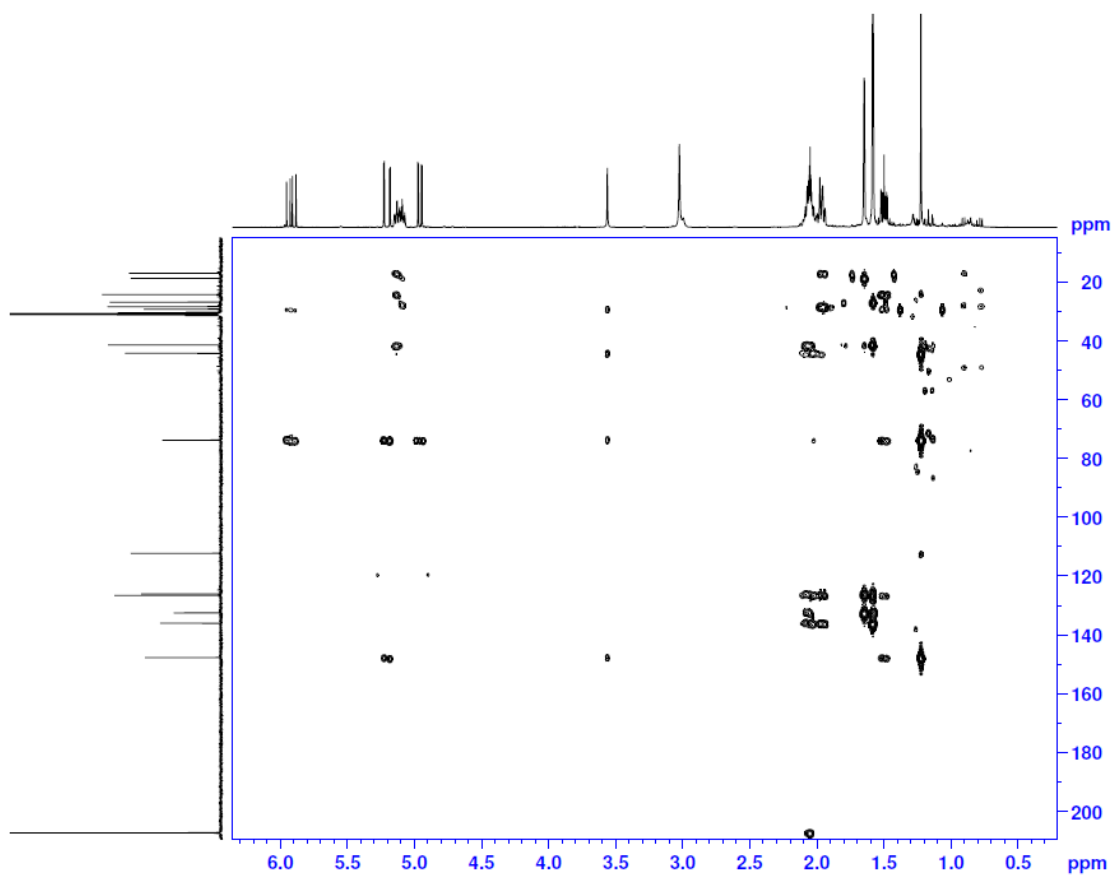


Figure S19. Nerolidol (3) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

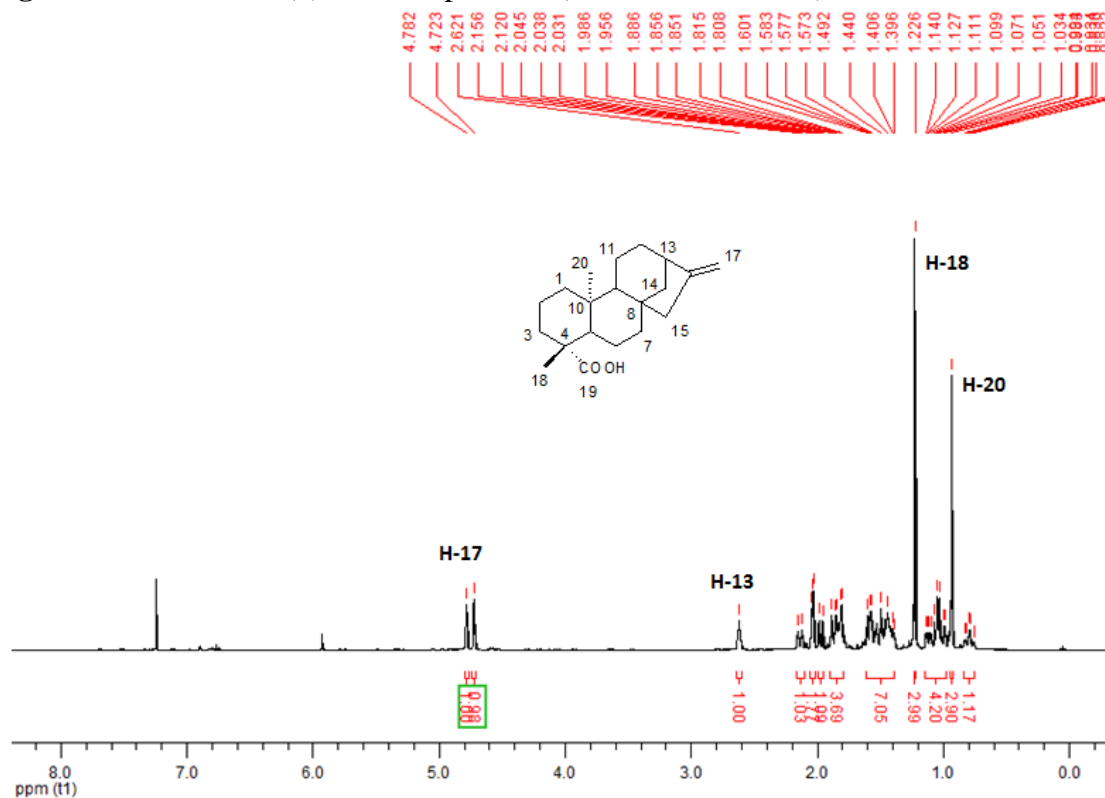


Figure S20. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (4) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl_3).

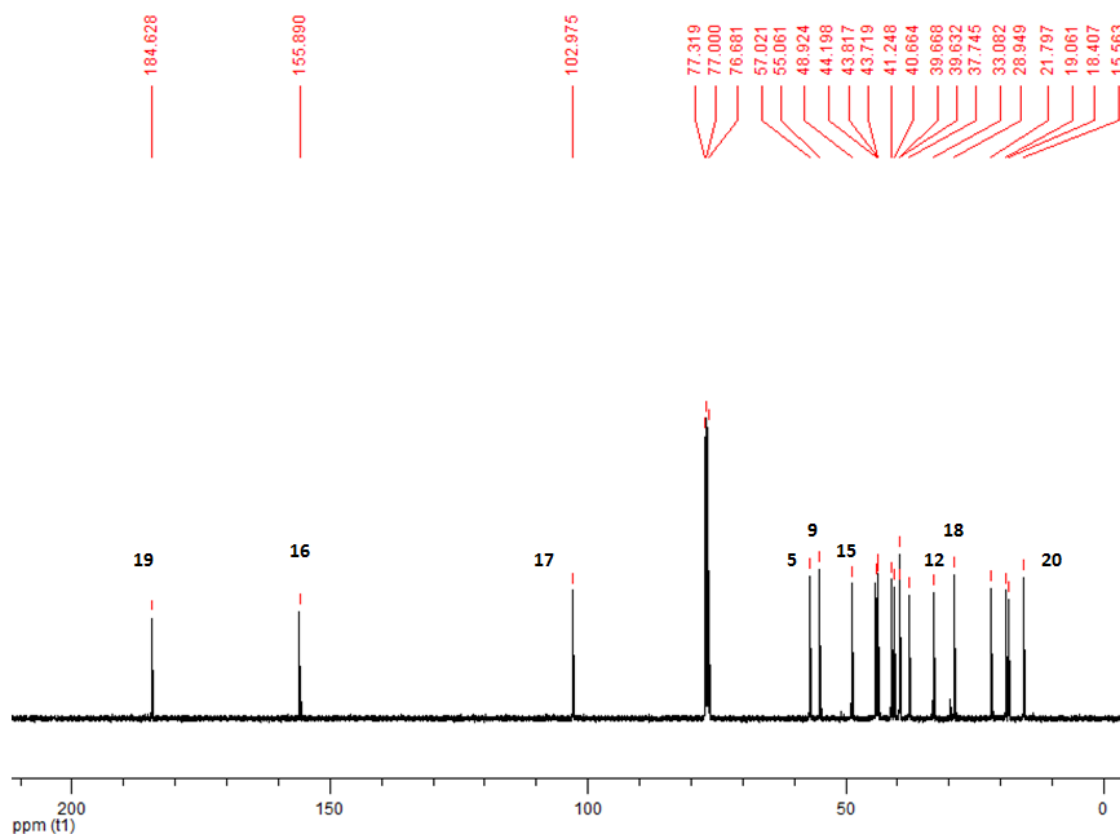


Figure S21. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) ^{13}C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

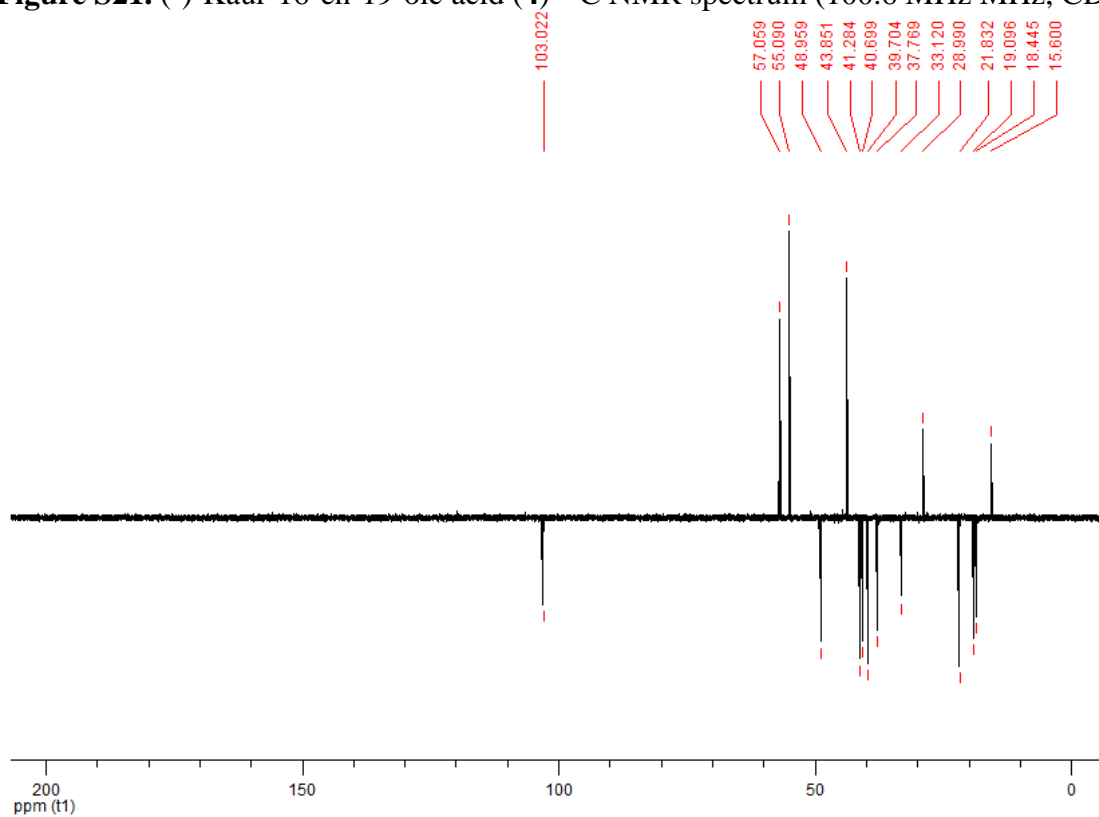


Fig. S22. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

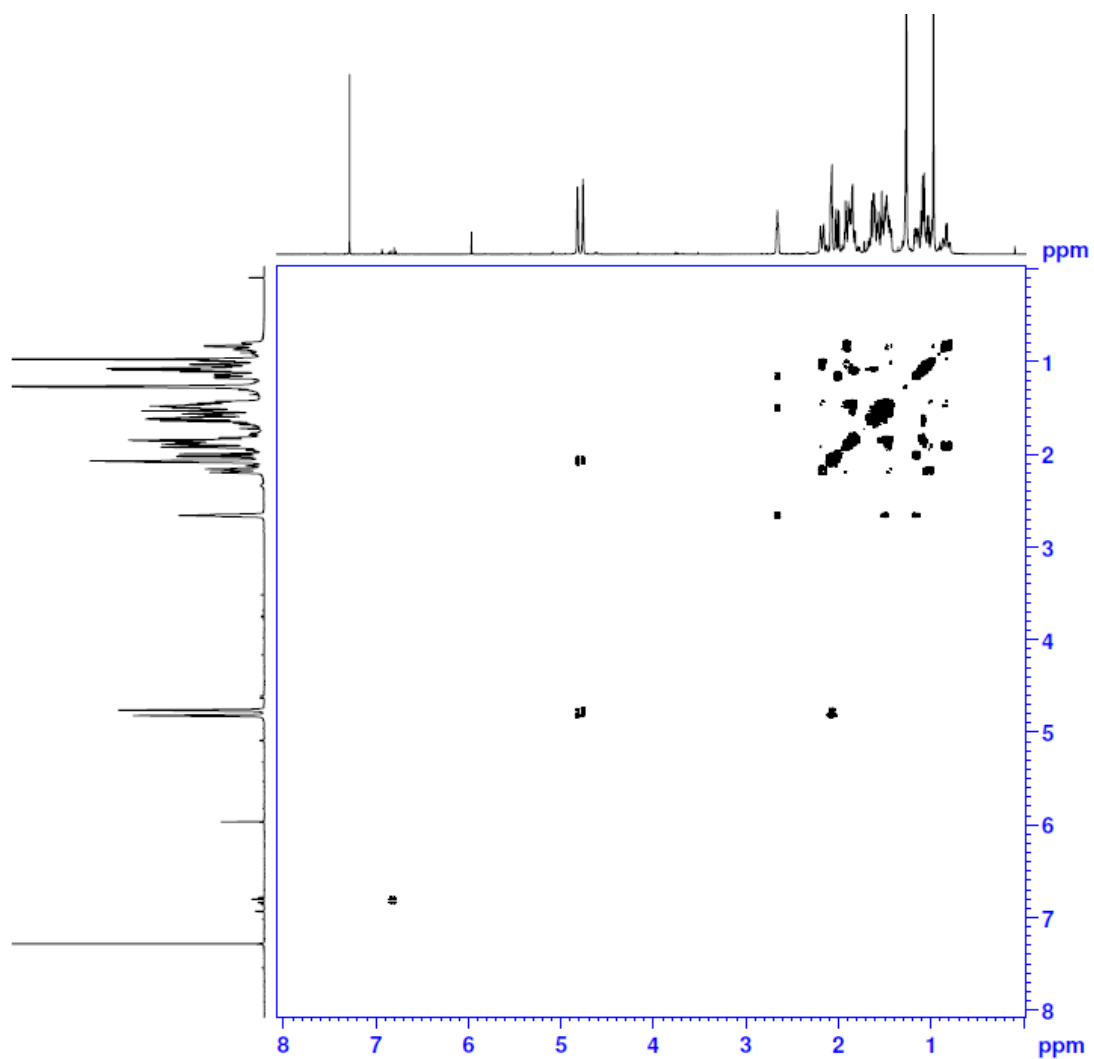


Figure S23. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl_3)

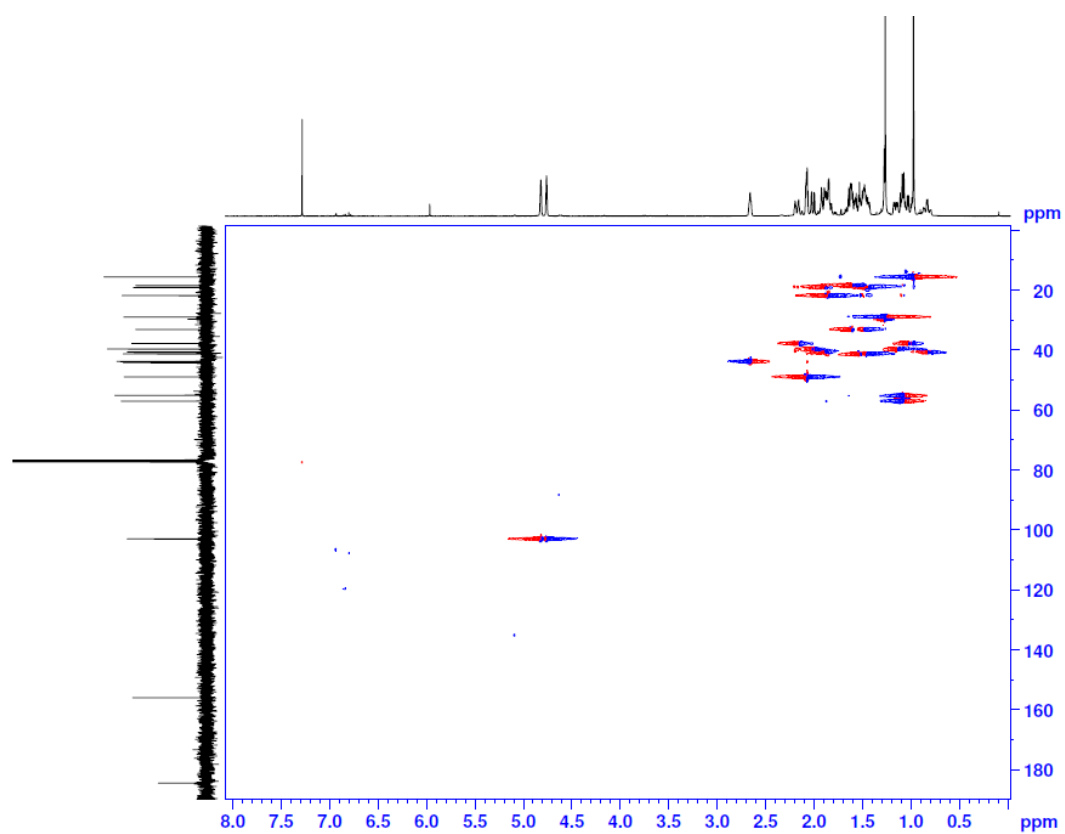


Figure S24. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

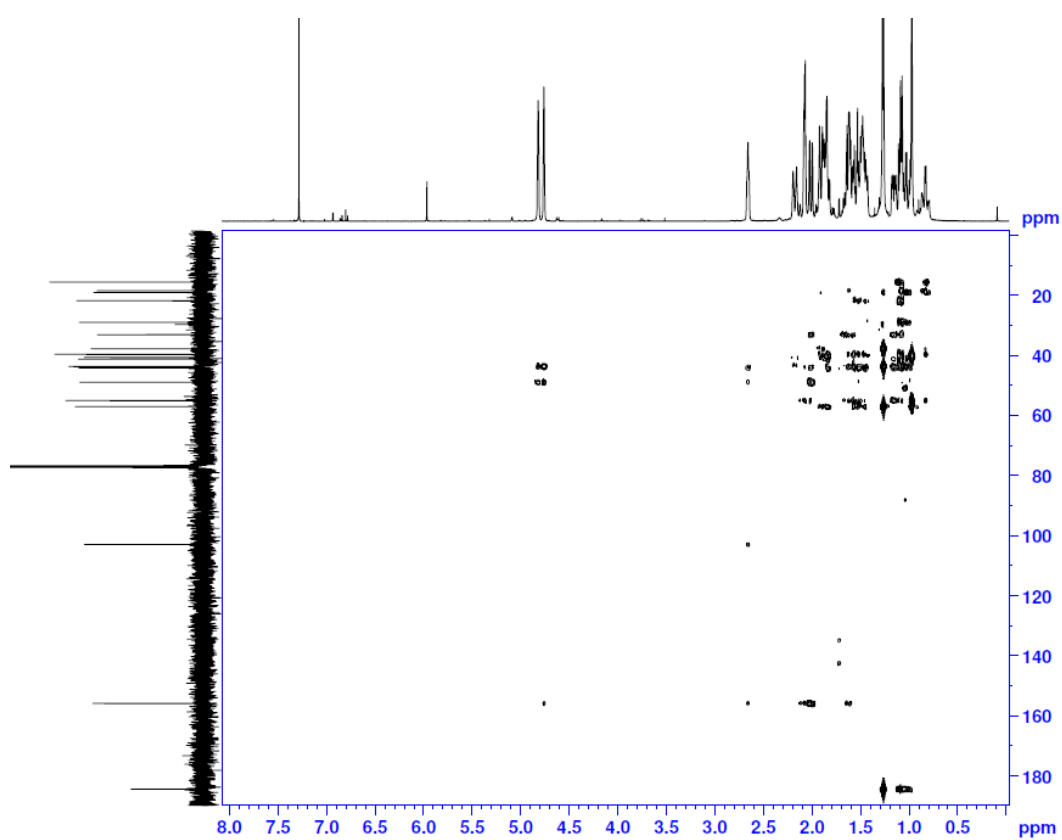


Figure S25. (-)-Kaur-16-en-19-oic acid (**4**) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

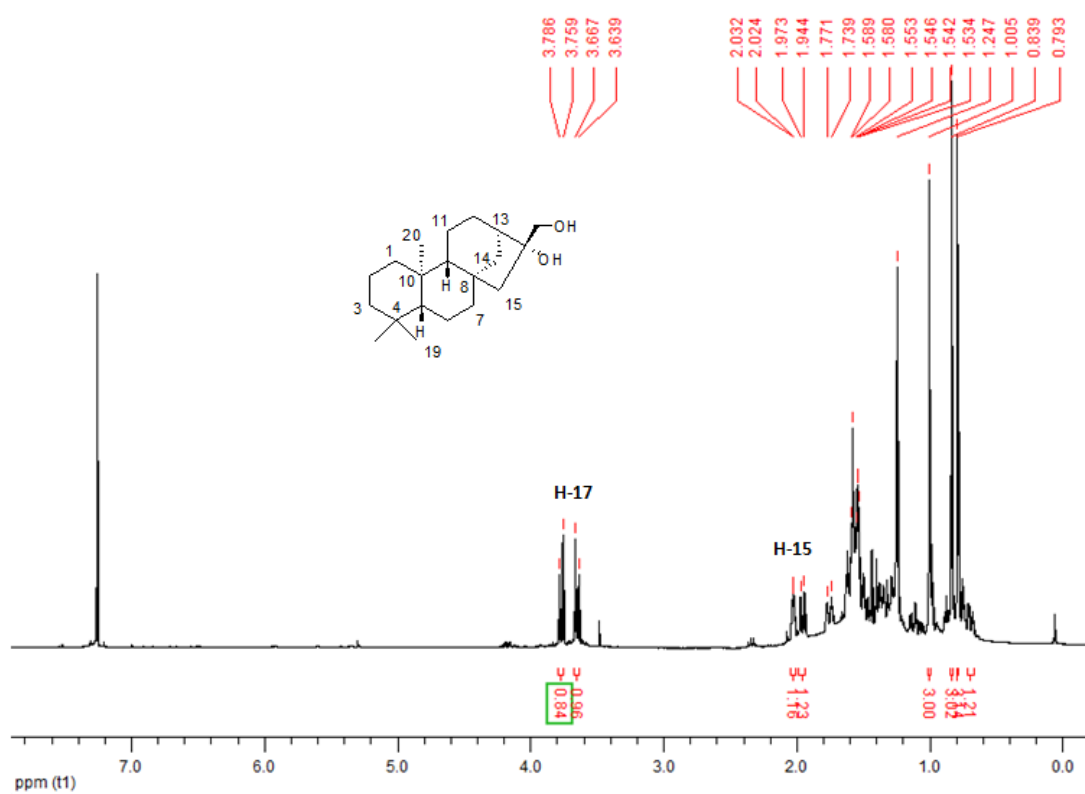


Figure S26. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl_3).

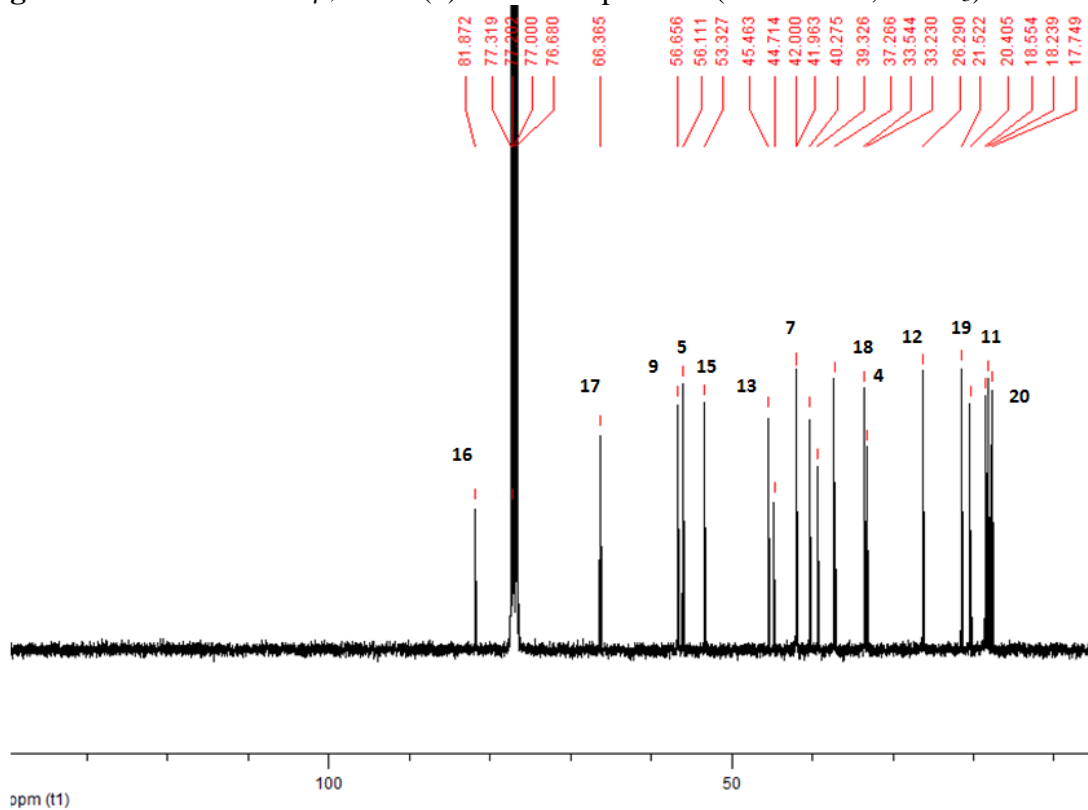


Figure S27. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) ^{13}C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

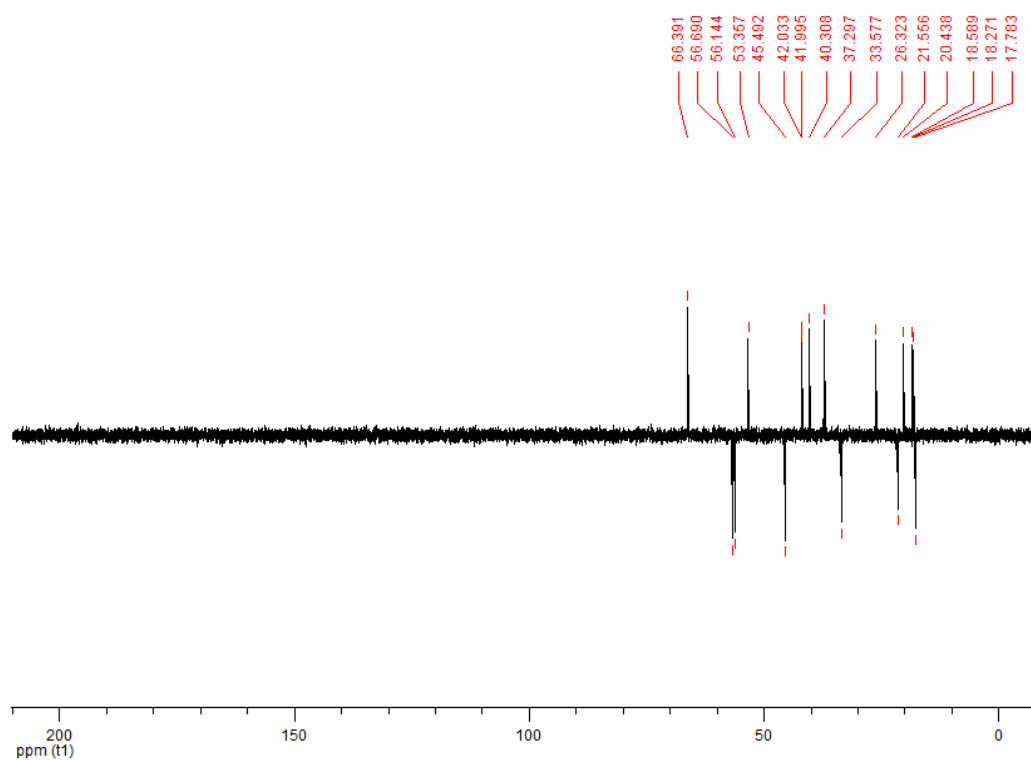


Fig. S28. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

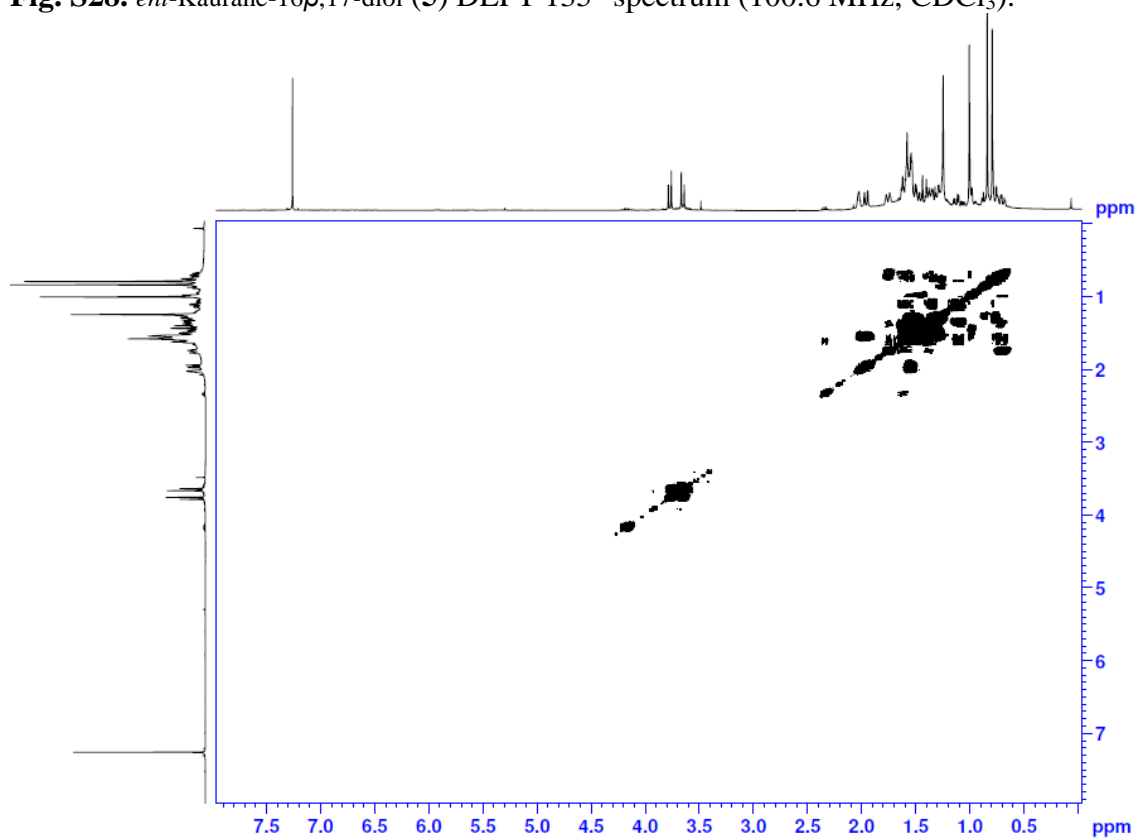


Figure S29. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃)

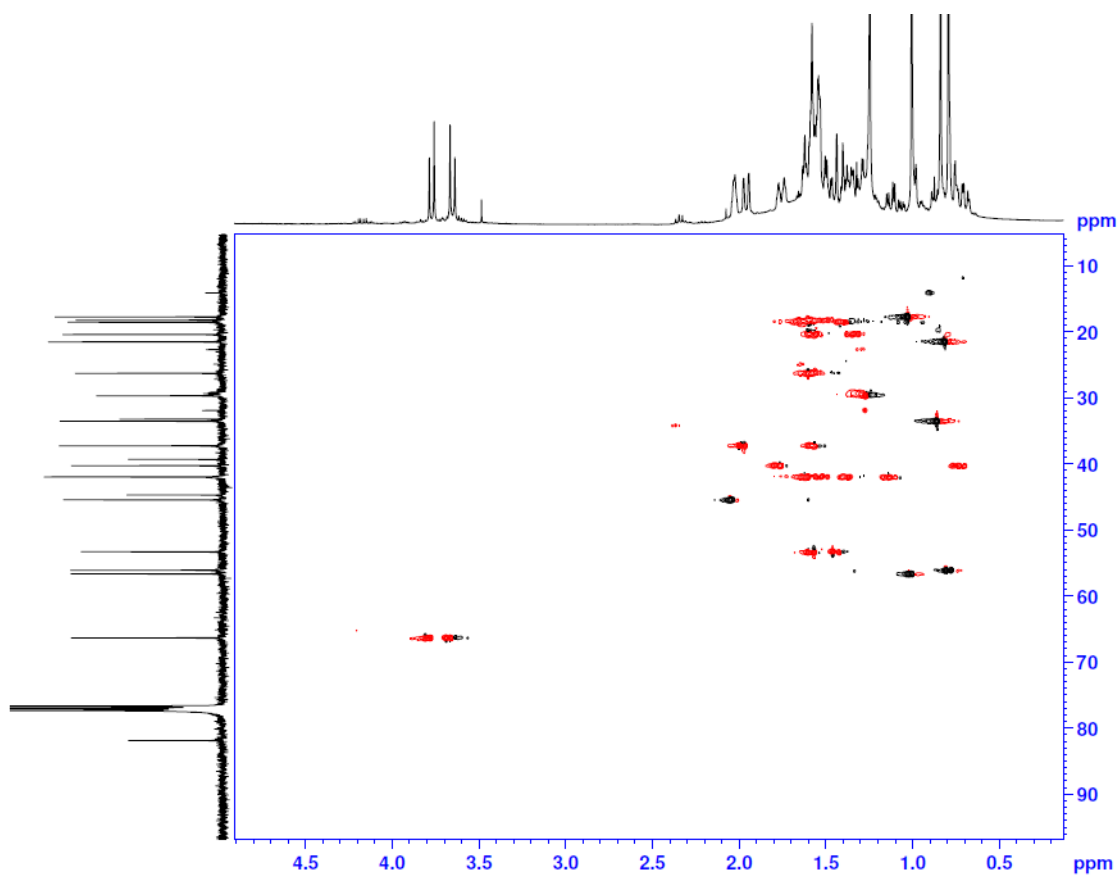


Figure S30. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

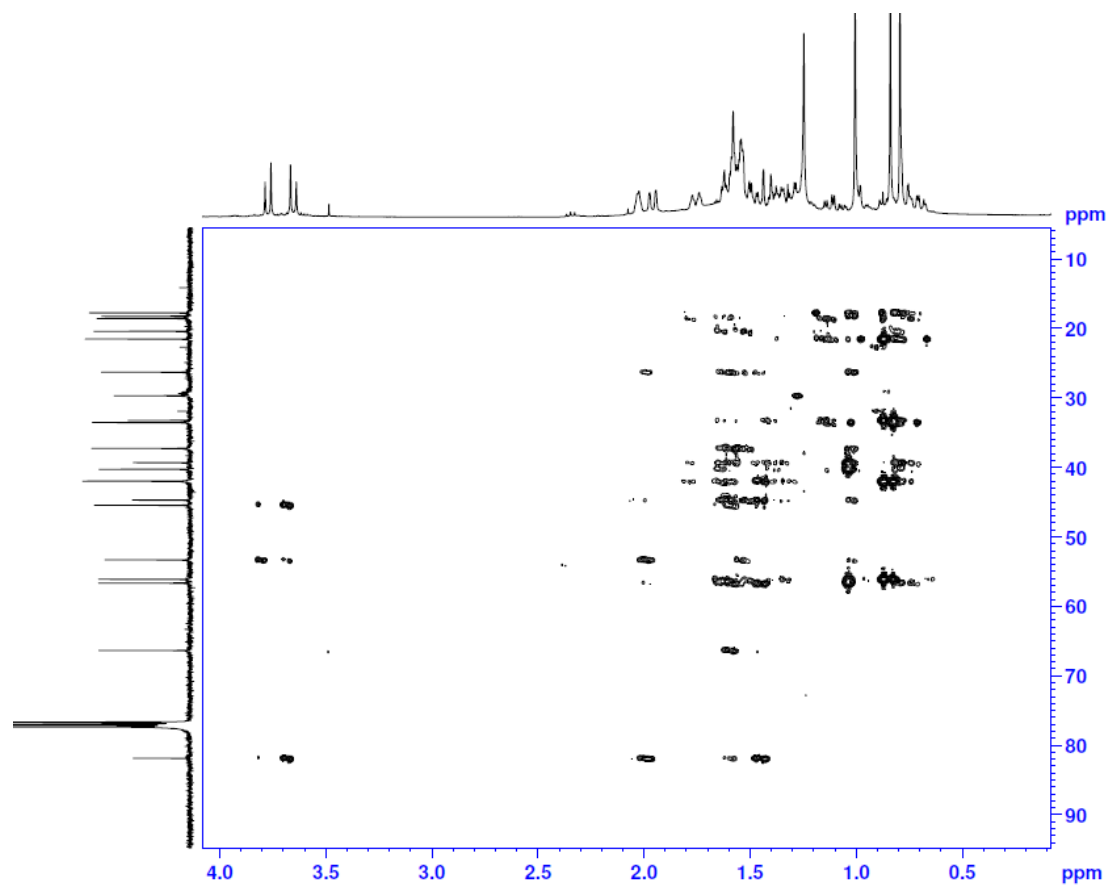


Figure S31. *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

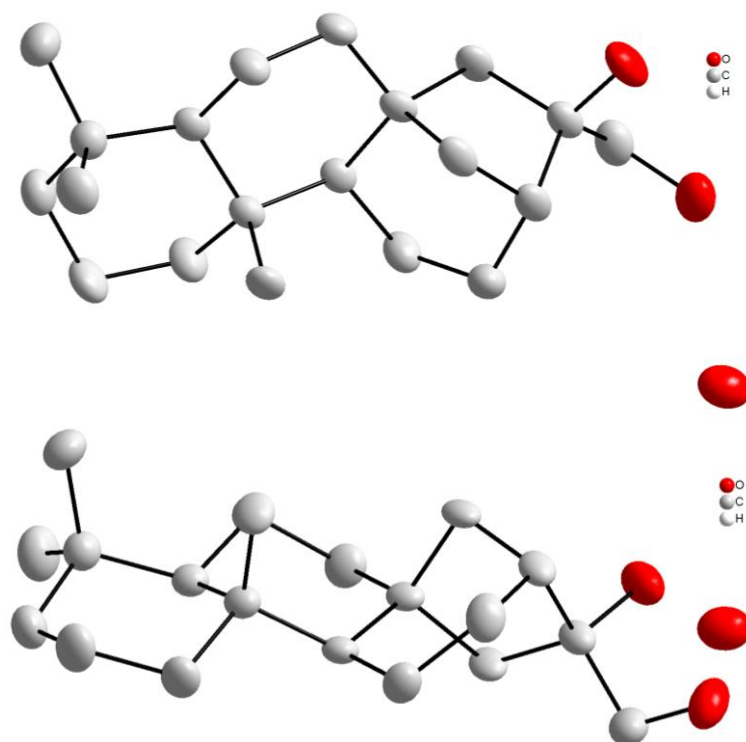


Figure S32. X-ray ORTEP drawing of *ent*-Kaurane-16 β ,17-diol (**5**).

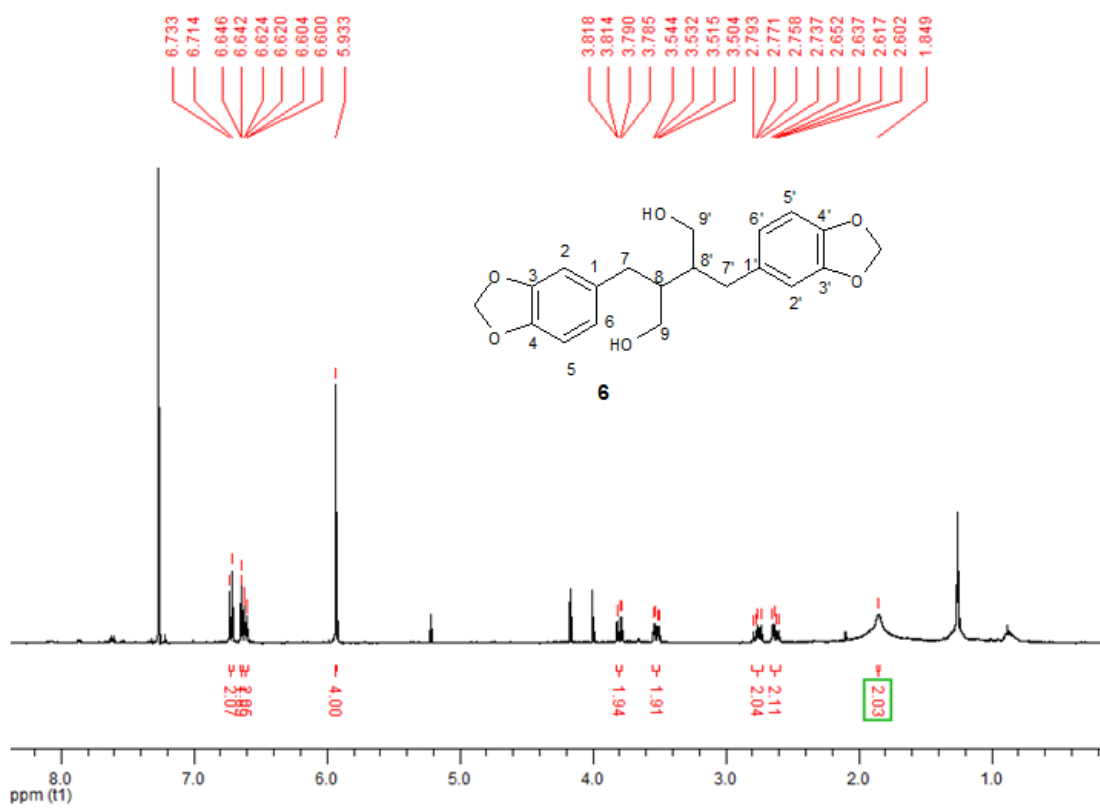


Figure S33. Dihydrocubebin (**6**) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl_3).

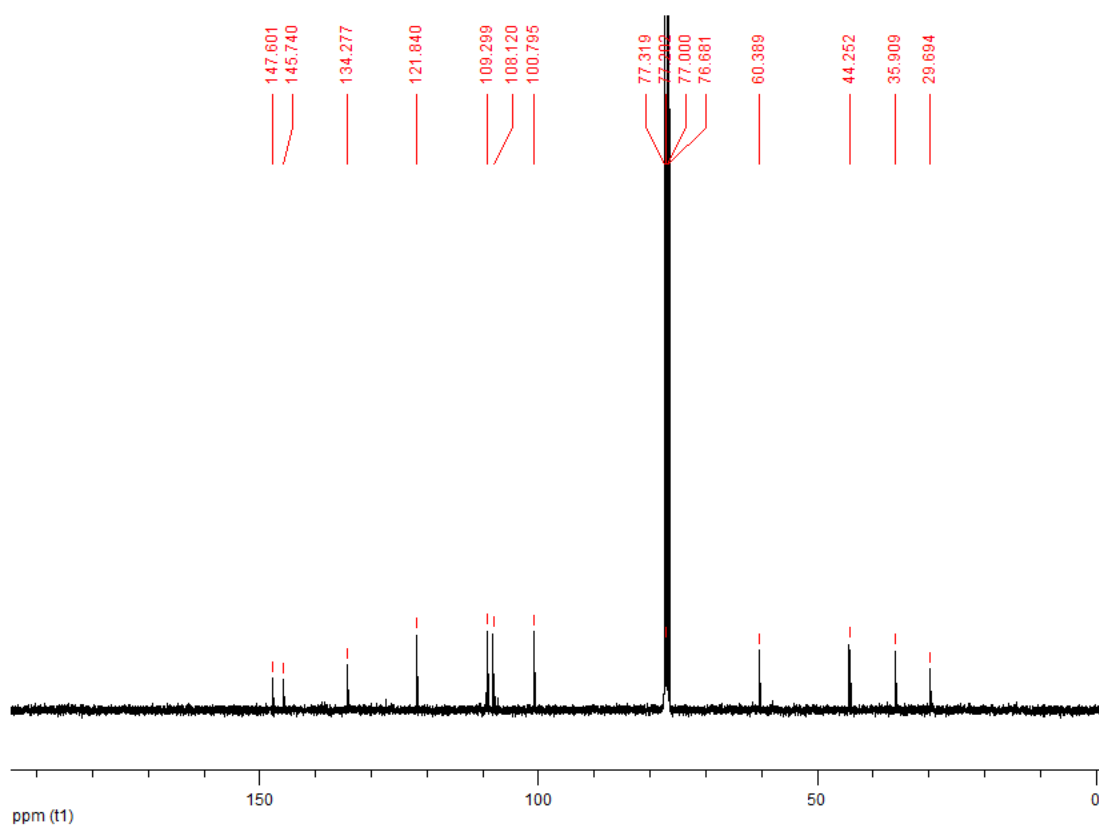


Figure S34. Dihydrocubebin (**6**) ¹³C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

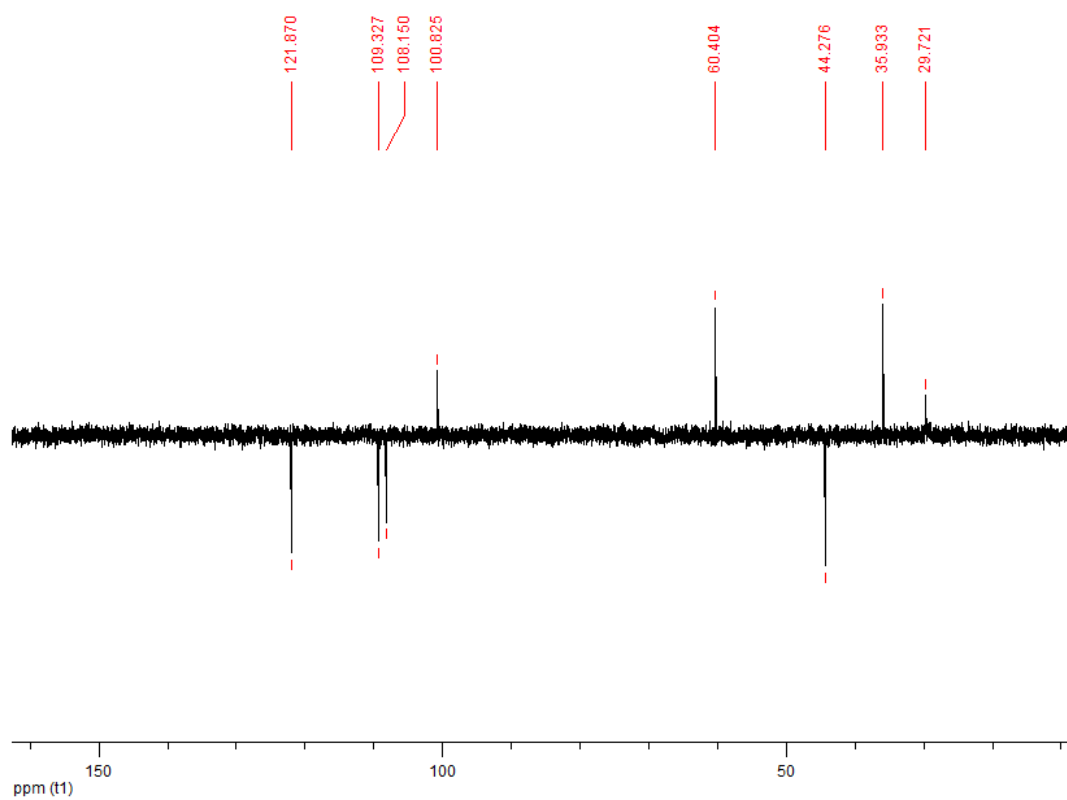


Fig. S35. Dihydrocubebin (**6**) DEPT 135° spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

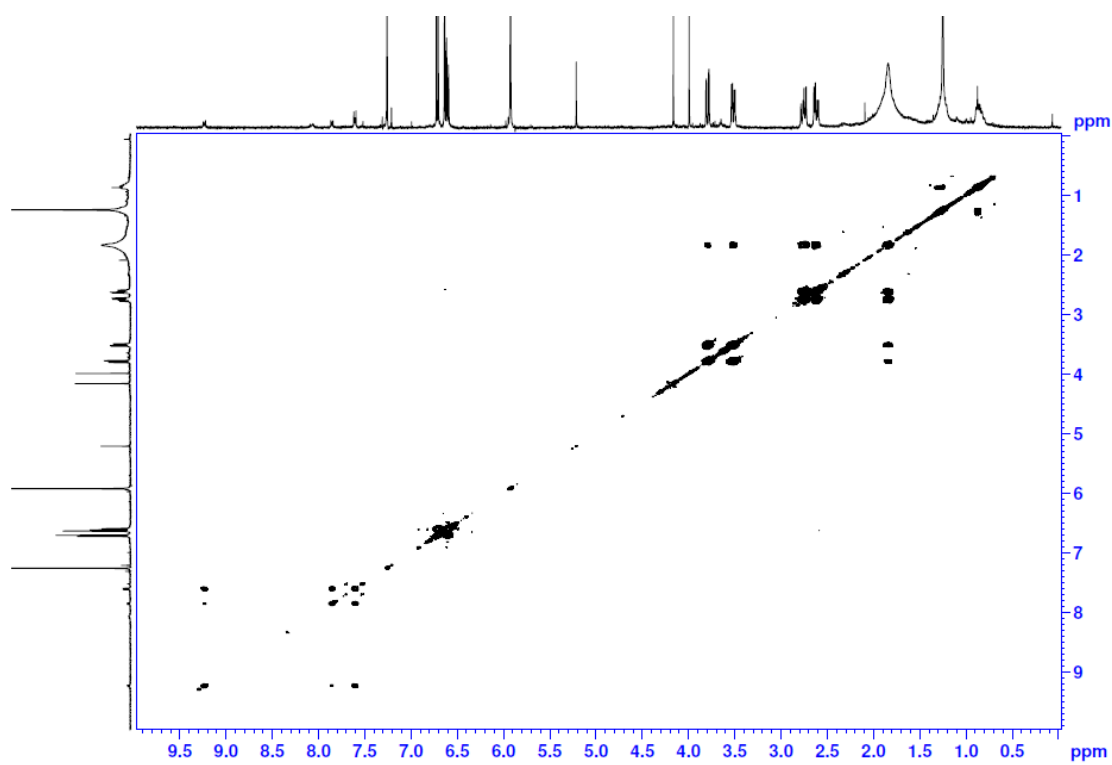


Figure S36. Dihydrocubebin (**6**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃)

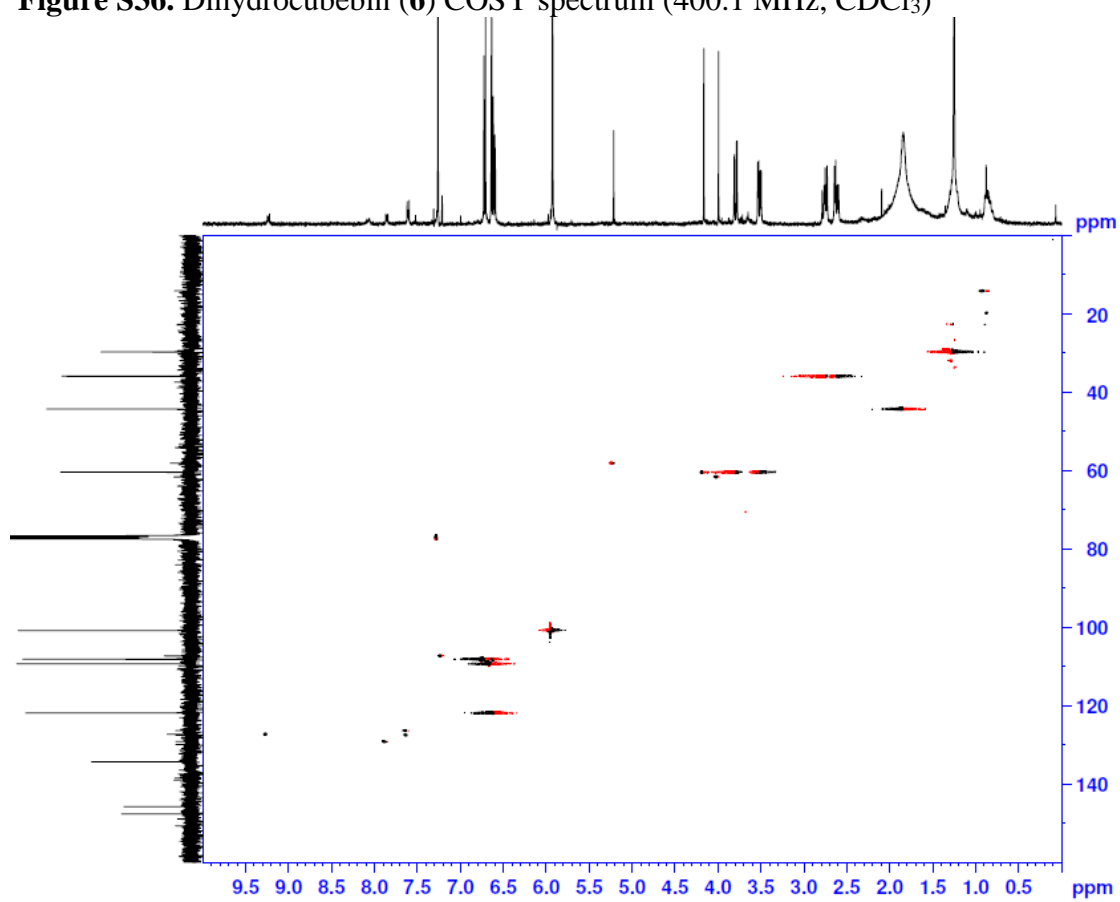


Figure S37. Dihydrocubebin (**6**) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

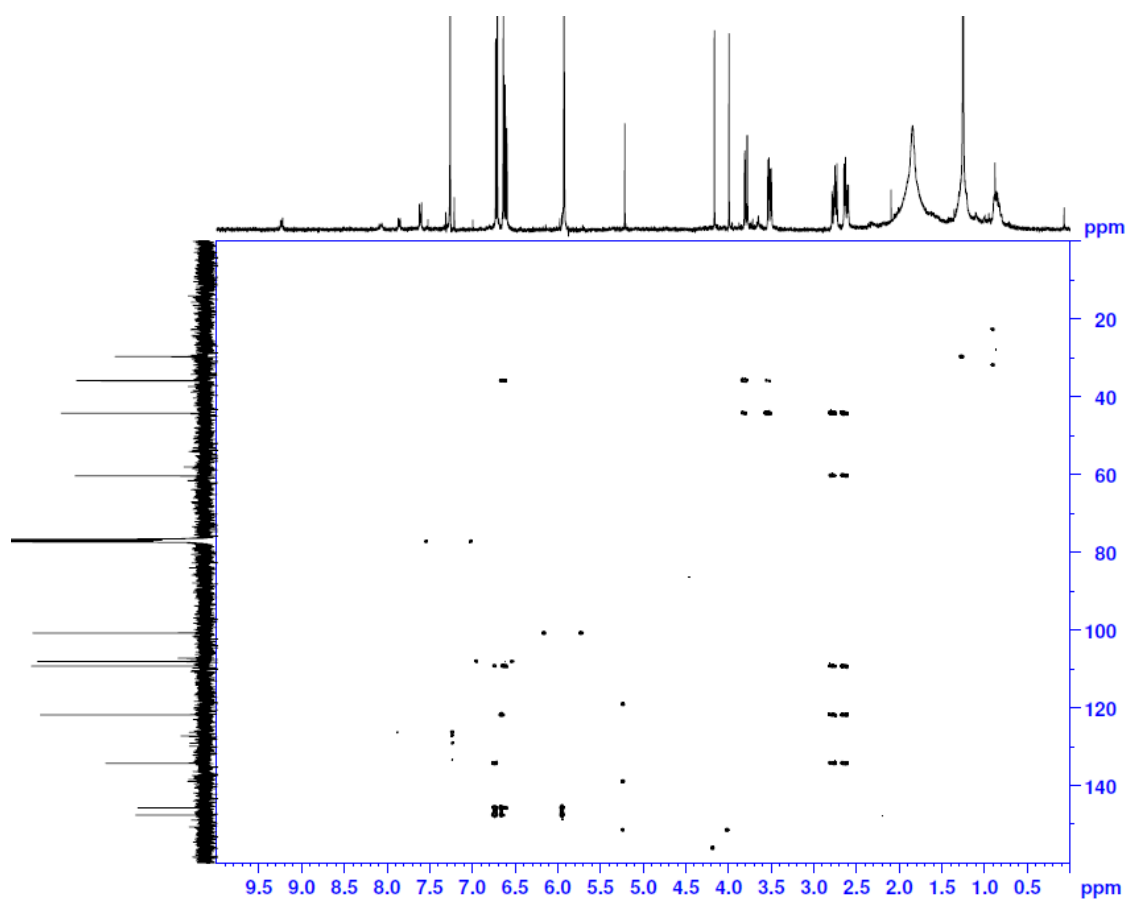


Figure S38. Dihydrocubebin (**6**) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

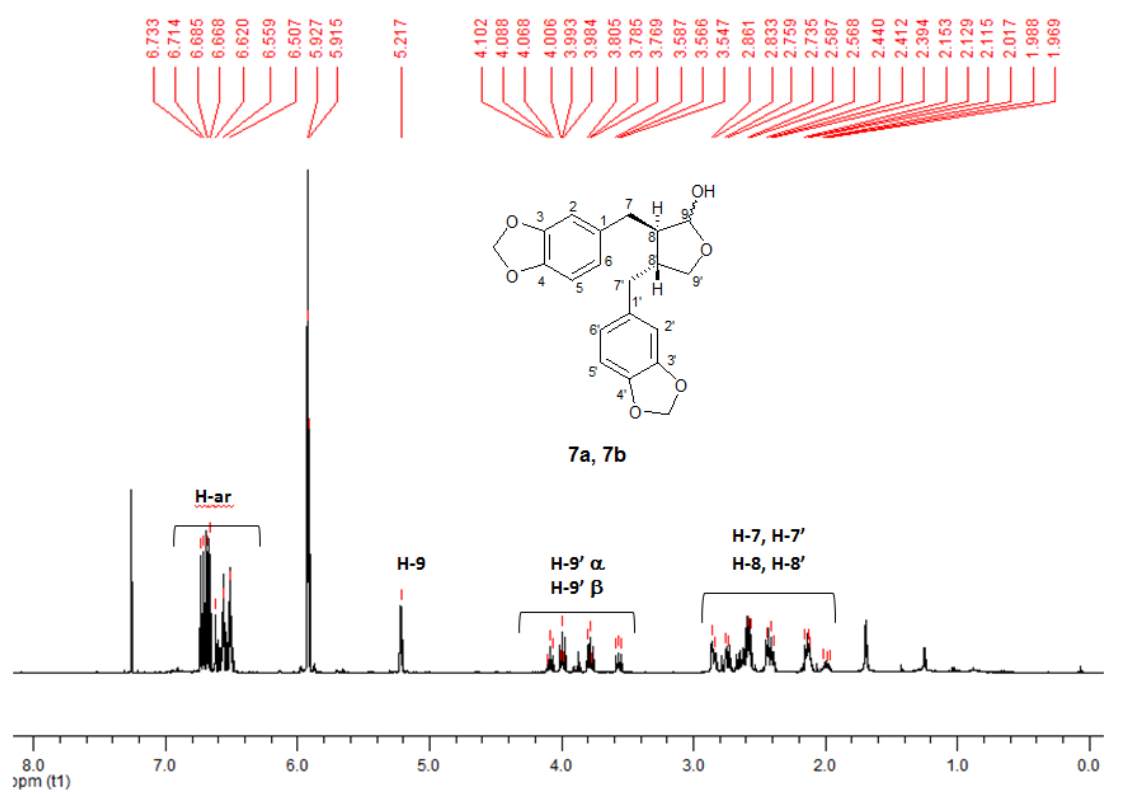


Figure S39. α and β -cubebin (**7a** + **7b**) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl_3).

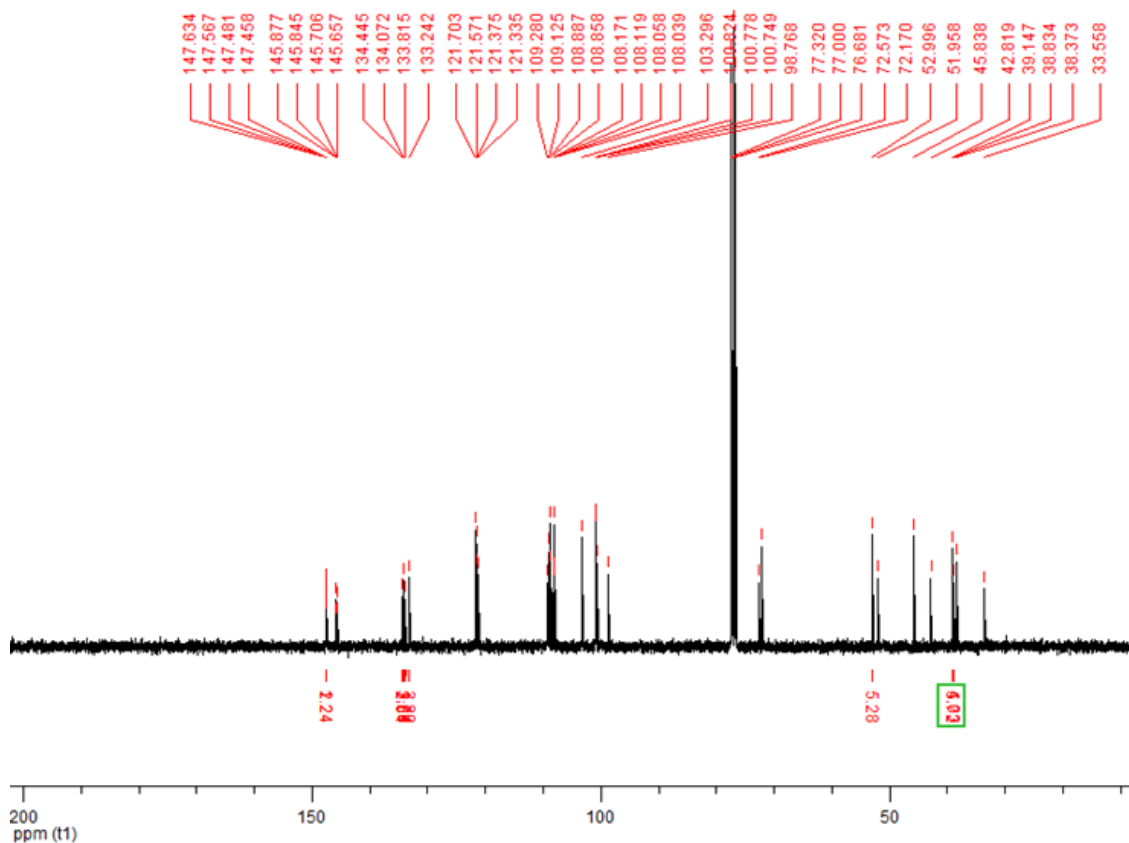


Figure S40. α and β -cubebin (**7a** + **7b**) ¹³C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

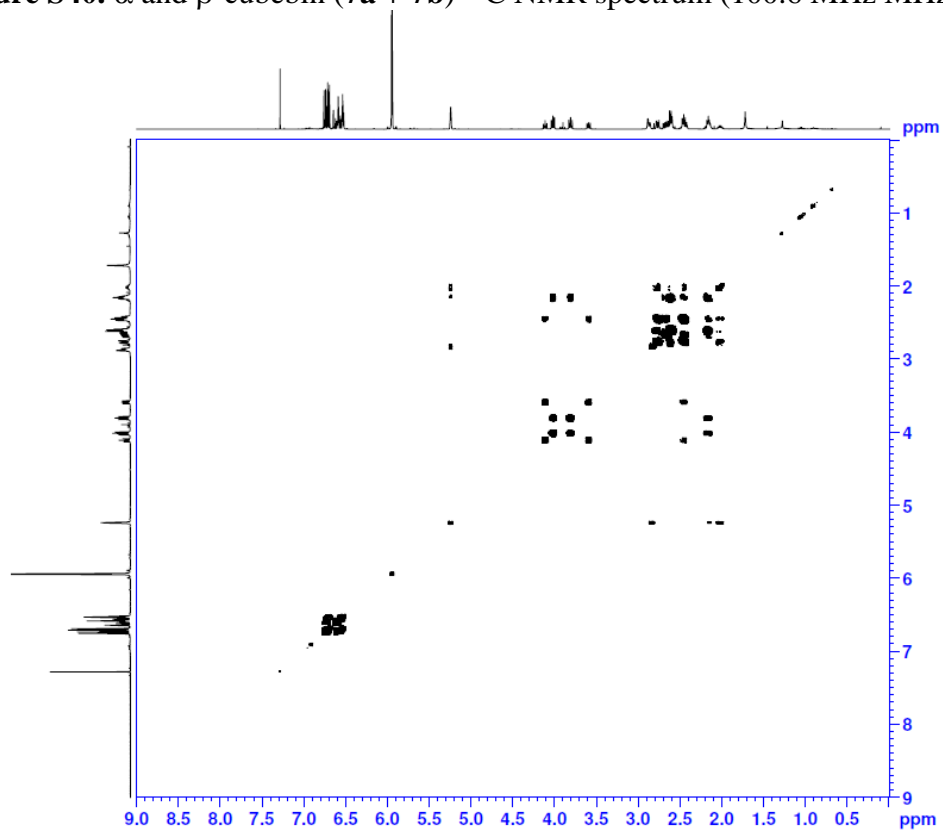


Figure S41. α and β -cubebin (**7a** + **7b**) COSY spectrum (400.1 MHz, CDCl₃).

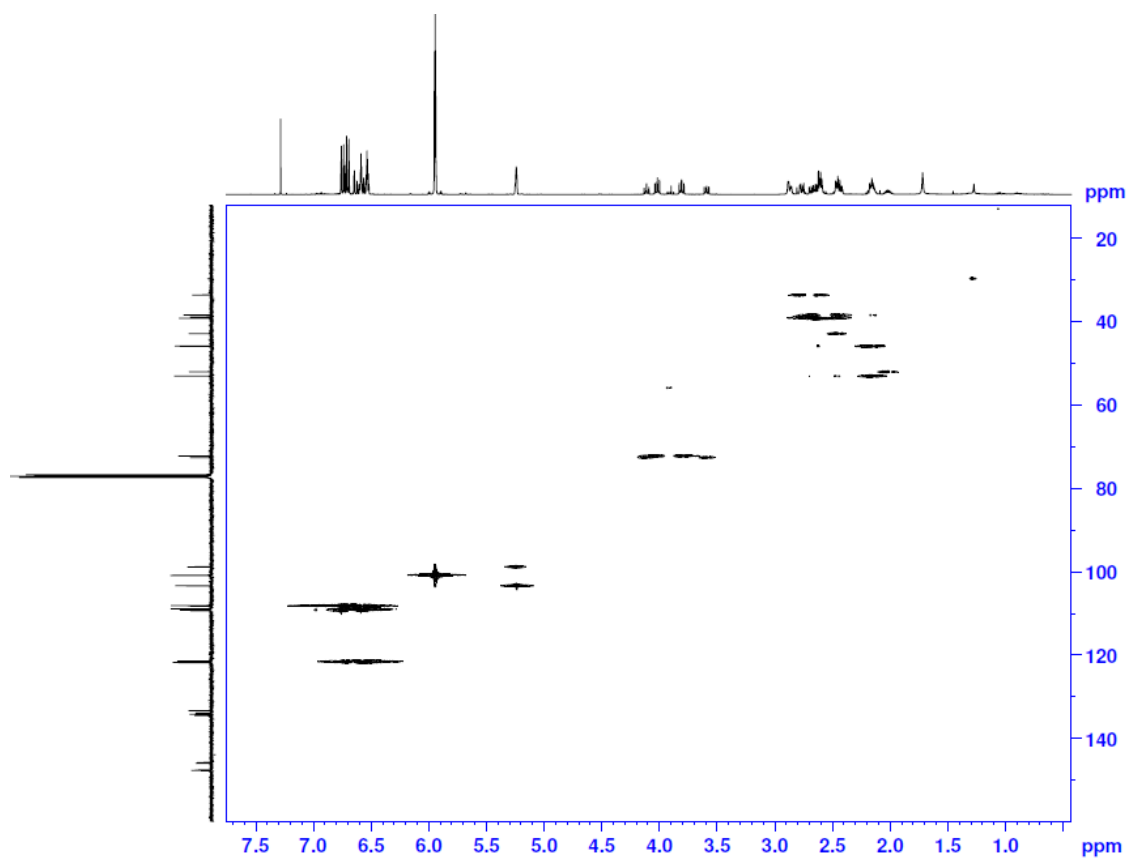


Figure S42. α and β -cubebin (**7a** + **7b**) HSQC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

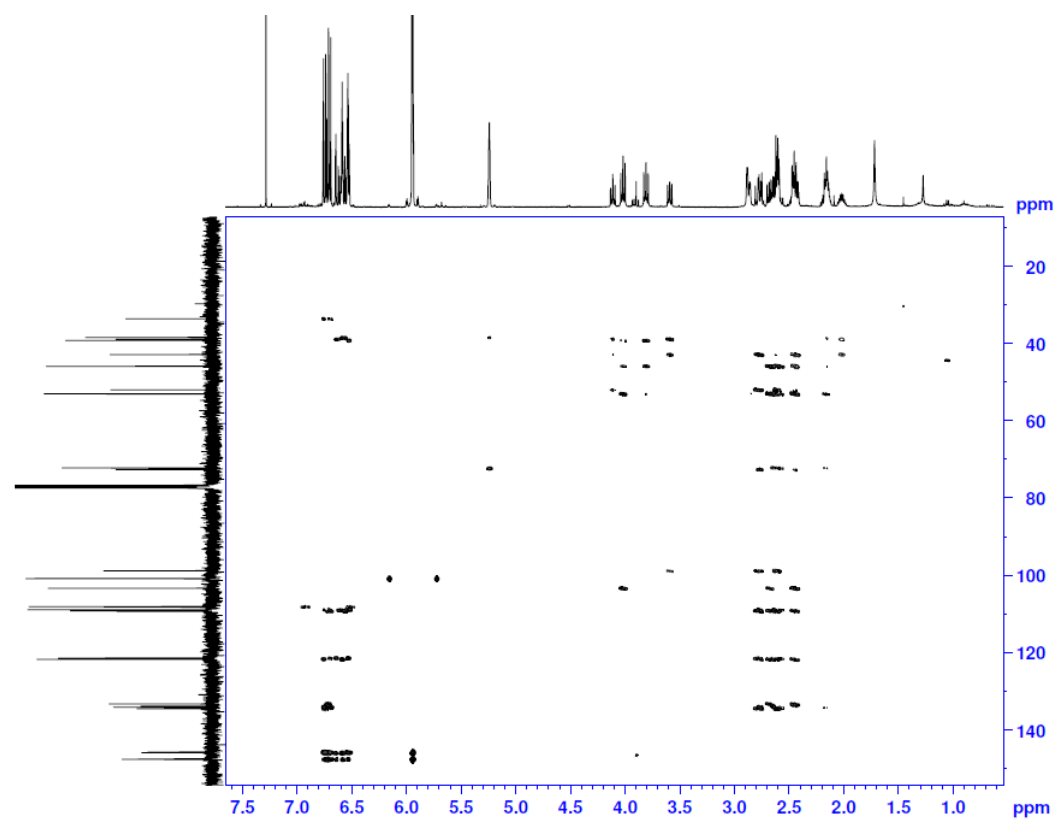


Figure S43. α and β -cubebin (**7a** + **7b**) HMBC spectrum (100.6 MHz, CDCl_3).

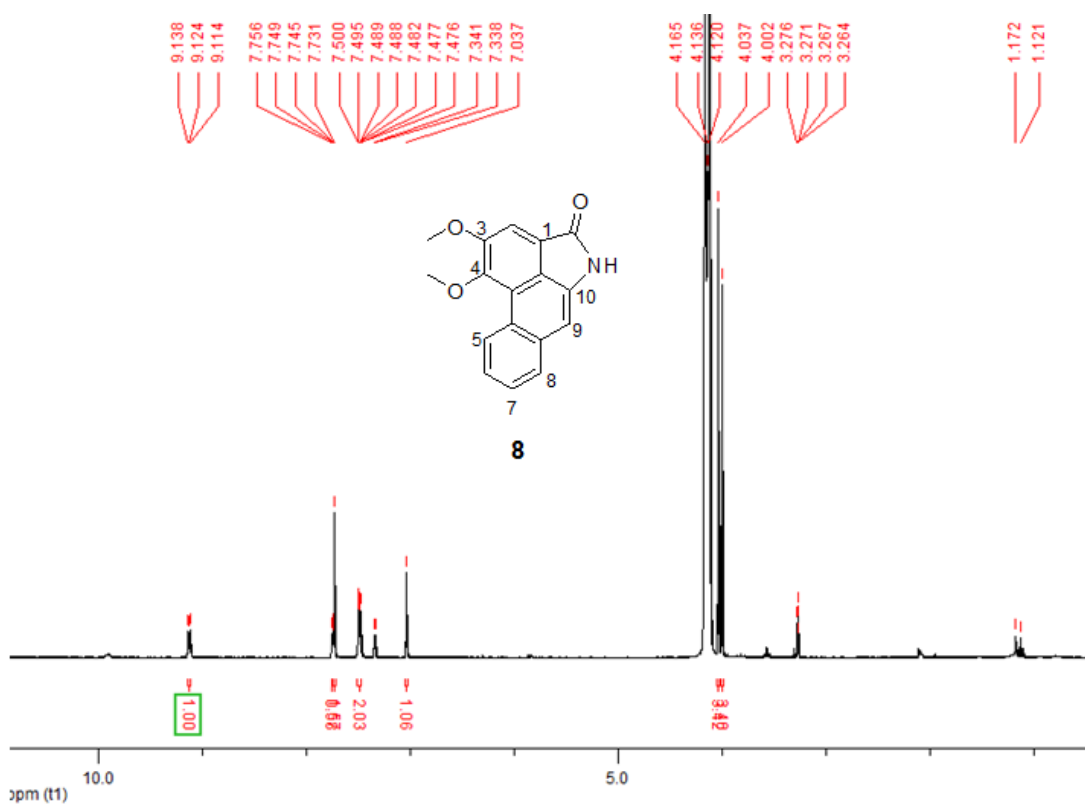


Figure S44. Aristolactam BII (**8**) ^1H NMR spectrum (400.1 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$).

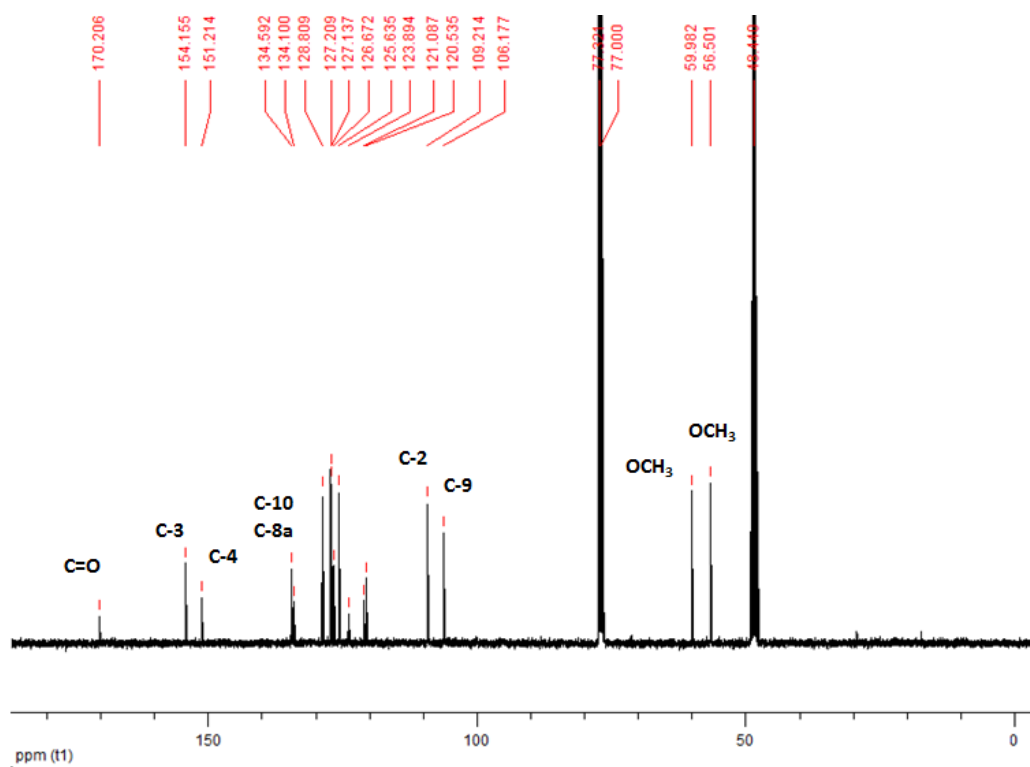


Figure S45. Aristolactam BII (**8**) ^{13}C NMR spectrum (100.6 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$).

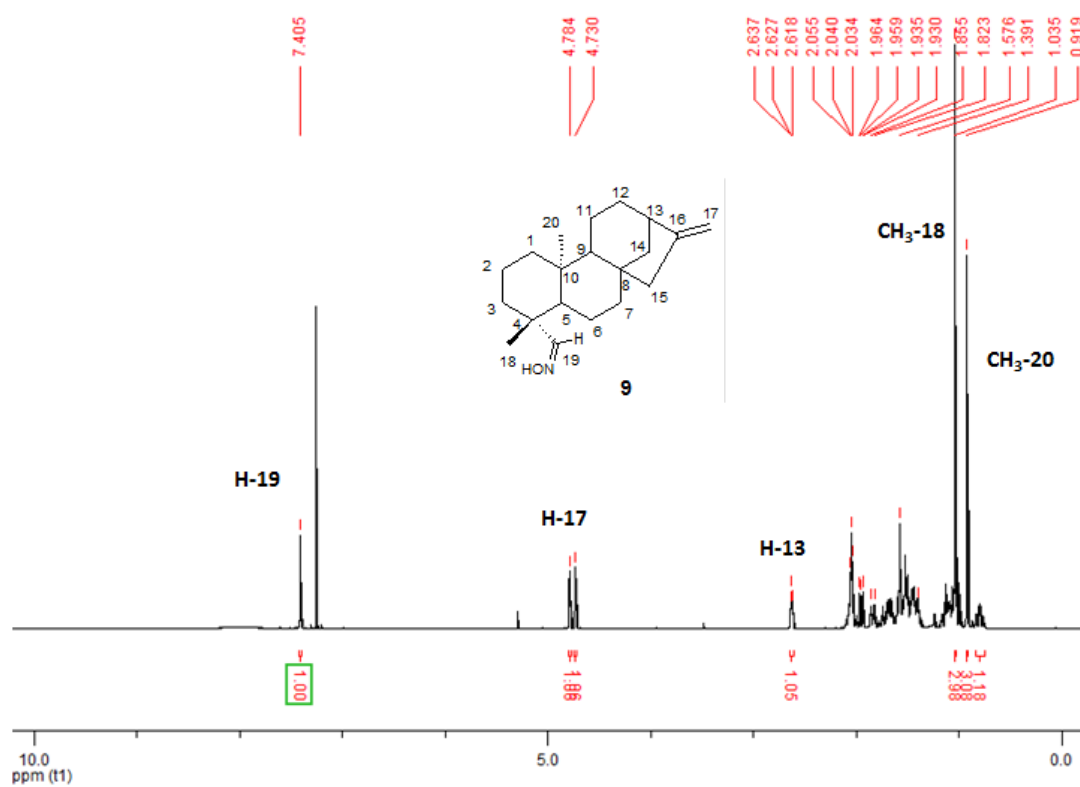


Figure S46. Oxime (9) ¹H NMR spectrum (400.1 MHz, CDCl₃).

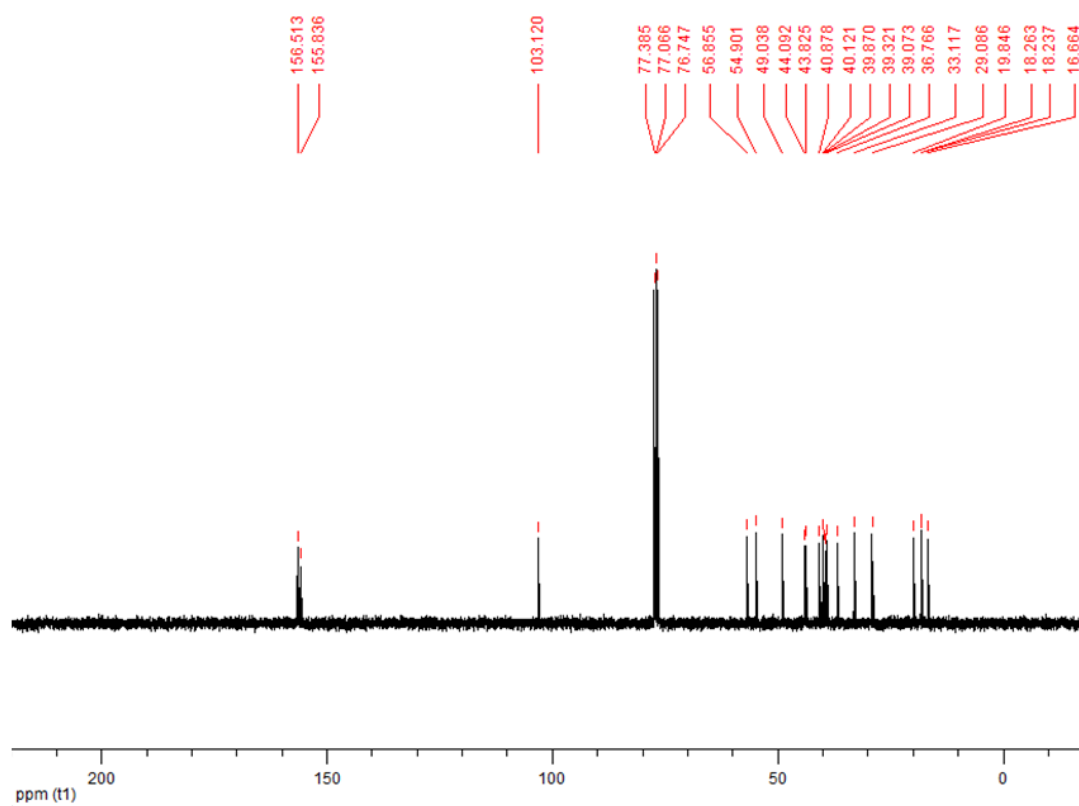


Figure S47. Oxime (9) ¹³C NMR spectrum (100.6 MHz, CDCl₃).

4.2 MANUSCRITO 2

***Aristolochia triangularis* evaluation in the acetylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition: dihydrocubebin as prolyl oligopeptidase inhibitor**

Alessandra O. Pereira^a, Ionara I. Dalcol^{a,*}, Janaína M. Ávila^a, Marco A. Mostardeiro^a, Ademir F. Morel^a

^a Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS 97105-900, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220-9621; fax: +55 55 3220 8031; e-mail: iidalcol@gmail.com

ABSTRACT

From the MeOH extract of *Aristolochia triangularis* Cham. rhizomes and stems, a Brazilian native species, nine compounds were isolated including the terpenoids nerolidol (**1**), ent-kaur-16-en-19-al (**2**), (-)-kaur-16-en-19-oic acid (**3**), ent-kauran-16 β ,17-diol (**4**), the lignans zuonin B (**5**), dihydrocubebin (**6**), a mixture of α and β -cubebin (**7a** + **7b**) with the alkaloid aristolactam BII (**8**). The extracts were tested for acetylcholinesterase (AChE) and prolyl oligopeptidase (POP) inhibitory activity, and the acidic ethereal fraction was the most active against AChE (48% inhibition at 200 $\mu\text{g/mL}$). At a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, all extract and fractions showed high POP inhibition capacity, with values between 70- 92%. Among the isolated compounds in a concentration of 150 $\mu\text{g/mL}$, dihydrocubebin (**6**) showed significant inhibitory activity against the enzyme prolyl oligopeptidase, with IC_{50} value of $15.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

Keywords: *Aristolochia triangularis* Cham.; Acetylcholinesterase; Prolyl oligopeptidase; Natural product; dihydrocubebin.

1. Introduction

Medicinal plants¹ are one of the main starting points for the discovery of bioactive compounds. Natural products (PNs) are one of the main sources of lead compounds for the development of new drugs. Drugs derived from PNs cover a wide range of therapeutic activities as: antitumor, anti-infective, antidiabetic, antimicrobial, among others, and they show great structural diversity, high degradation resistance against proteases and; in general, they are very selective, stable and present low toxicity.

Our research group has focused on the identification of natural products that may be effective to inhibit the prolyl oligopeptidase (POP) and acetylcholinesterase (AChE), both enzymes involved in central nervous system (CNS) dysfunctions. Because of this, in our laboratory we have investigated if the hydroalcoholic extract and fractions obtained from some South-Brazilian native medicinal plants (Pampa region and Atlantic Forest Biomes) could inhibit the activities of such enzymes. Some diseases that affect the CNS like Alzheimer's (AD), schizophrenia and the bipolar disorder, have a direct correlation with observed *abnormalities* of POP and AChE enzymes levels in the organism.²

Aristolochia triangularis Cham., popularly known in Brazil as “cipó mil-homens”, “angelicó” and “ypê-mi”³, is native of the Atlantic forest^{3,4}. Its use is reported in indigenous culture because of its curative effect.⁴ This plant is used to treat wounds and skin diseases^{4,5}, rheumatism, as an emmenagogue, antidote, and abortive⁶. It is also used for the treatment of the digestive and circulatory system⁷, diarrhoea⁸, antipyretic, diuretic, for malaria fevers⁴, as anti-helminthic, sedative and anti-inflammatory.³ Phytochemical studies of *A. triangularis* describe as its main constituents the following substances: alkaloids, aristololactams, aristolochic acid⁹, terpenoids⁵ and lignoids.¹⁰

In a previous study of our group, we obtained the crude extract of rhizomes and stems of *A. triangularis*, which was partitioned by acid-base extraction to obtain fractions. From these fractions it was isolated some secondary metabolites with significant antimicrobial activity.¹¹ As a sequence of the previously mentioned work, this study aimed to bring complementary information about the *A. triangularis* biological properties that may be useful to explain the sedative effects of this medicinal plant.

Tested materials obtained during our work included the crude extract (ME), acidic ethereal (AEF), basic ethereal (BEF), basic ethyl acetate (BAF) and aqueous (AF) fractions, as well as the compounds nerolidol (**1**), ent-kaur-16-en-19-al (**2**), (-)-kaur-16-en-19-oic acid (**3**), ent-kauran-16 β ,17-diol (**4**), zuonin B (**5**), dihydrocubebin (**6**), and a mix of α and β -cubebin (**7a** + **7b**) and aristolactam BII (**8**). All compounds structures were established on spectral analysis basis. Furthermore, as above described¹¹, it was obtained an oxime derivative (**9**) from the reaction of the compound **2** with $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COONa}$.

POP and AChE activities were determined in 96-well microplates following the procedures described by Toide et al.¹² and Ellman et al.¹³, respectively. Chlorogenic acid and eserine were used as the natural positive controls in the assays. Both crude extract and fractions displayed POP and AChE inhibitory properties. These properties were generally very high in POP assays but moderate in AChE ones. FEA, FEB and FAB fractions at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration showed the ability to inhibit AChE around 28-48%, while all fractions at the same concentration exhibited inhibitory capacity against POP ranging from 72-92% (Table 1).

All isolated compounds were tested for POP and AChE inhibitory activity. The AChE assay performed in this work with the pure isolates indicated that the compound alone was not able to inhibit this enzyme. Therefore, the observed AChE inhibitory activity of AEF, BEF and BAF fractions might happen due a synergic effect among the different compounds in these complex fractions.

Among the compounds isolated from *A. triangularis* extract, the lignan dihydrocubebin (**6**) showed the highest inhibitory capacity against POP, exhibiting > 99.8% of POP inhibition at the concentration of 150 μM . Based on this preliminary result, we determined its IC_{50} , as shown in Figure 1. As POP inhibitor, the compound **6** (IC_{50} = 15.2 μM) exhibited similar potency to chlorogenic acid (IC_{50} of 23 μM), the natural compound used as a reference in our study, having higher potency than berberine, it was a natural alkaloid with IC_{50} of 142 μM used as a positive standard by Siatka et al. (2017) in their studies with POP. In addition, the POP IC_{50} of the **6** was comparable with that of the natural flavonoid baicalin (IC_{50} = 12 μM) described by Tarragó et al.¹⁴ This is the first report of the outstanding POP inhibitory activity of dihydrocubebin **6**. Since low-molecular-weight compounds have become increasingly important in the pharmaceutical industry because of their potentially useful medicinal properties, this dibenzylbutanediol lignan could be an alternative or a lead compound for drugs design in the treatment of AD, schizophrenia and bipolar disorder.

Acknowledgments

This research was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The authors would like to thank Prof. Dr. Cristina Nogueira for providing us the microplate reader.

References

1. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:111.
2. Gomes NG, Campos MG, Orfão JM, et al. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:1372.
3. Corrêa, C., Biasi, L. R. *Bras. Agrocência.* 2003;9:233.
4. Scalon SPQ, Sene PAL, Zatti DA, et al. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2007;9:32.
5. Lopes LM, Bolzani VDS, Trevisan LM, et al. *Phytochemistry.* 1990;29:660.
6. Baptista MM., Ramos MA, Albuquerque UP, et al. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2013;9:1.
7. Ciccía G, Coussio J, Mongelli E. *J. Ethnopharmacol.* 2000;72:185.
8. Pirker H, Haselmair R, Kuhn E, et al. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2012;8:44.
9. Lin WH, Fu HZ, Hano Y, et al. *J. Chin. Pharm. Sci.* 1997;6:8.
10. Rücker G, Langmann B. *Tetrahedron Lett.* 1978;19:457.
11. Pereira AO, Dalcol II et al. 2018. submitted article- Manuscript 1.
12. Toide K, Iwamoto Y, Fujiwara H, et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995;274:1370.
13. Ellman GL, Courtney KD, Andres V. et al. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7:88.
14. Filho AG, Morel AF, Adolpho L, et al. *Phytother. Res.* 2012;26:1472.
15. Marques MR, Stüker C, Kichik N, et al. *Fitoterapia.* 2010;81:552.

Table 1. AChE and POP inhibition the extracts, fractions and secondary metabolites of *Aristolochia triangularis* Cham.*

	AChE Inhibition (%) [200 µg/mL]	POP Inhibition (%) [200 µg/mL]
ME	28.0 ± 0.9	70.1 ± 1.0
AEF	47.9 ± 1.5	86.8 ± 0.5
BEF	40.4 ± 0.0	92.5 ± 5.2
BAF	38.8 ± 0.8	82.8 ± 4.9
AF	8.6 ± 0.06	88.0 ± 0.1
	AChE Inhibition (%) [150 µM]	POP Inhibition (%) [150 µM]
<i>ent</i> -Kaur-16-en-19-al (1)	N.A.	17.0 ± 1.7
zuonin B (2)	8.2 ± 0.03	7.35 ± 0.4
nerolidol (3)	8.7 ± 0.8	9.47 ± 6.4
(-)-Kaur-16-en-19-oic acid (4)	N.A.	N.A.
<i>ent</i> -Kauran-16 β ,17-diol (5)	N.A.	N.A.
dihydrocubebin (6)	7.8 ± 0.3	> 99.8
α and β -cubebin (7a + 7b)	N.A.	28.4 ± 4.3
aristolactam BII (8)	13.0 ± 0.3	21.3 ± 0.7
Oxime derivative (9)	9.5 ± 1.0	28.3 ± 2.9
Eserine (12 µM)	86.5 ± 0.09	-
Chlorogenic acid (40 µM)**	-	86.4 ± 0.1

*N.A.: Not active. ** Chlorogenic acid IC₅₀: 23.0 ± 0.8

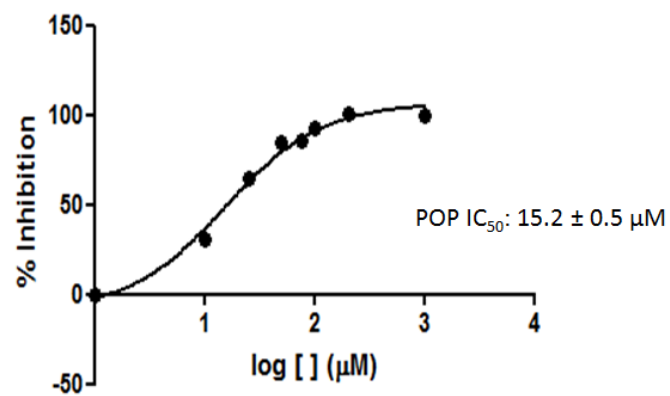
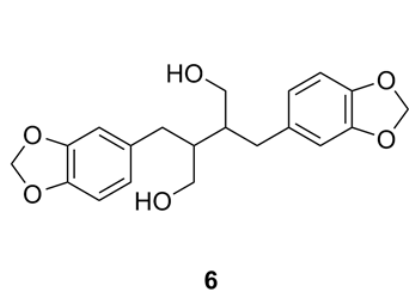
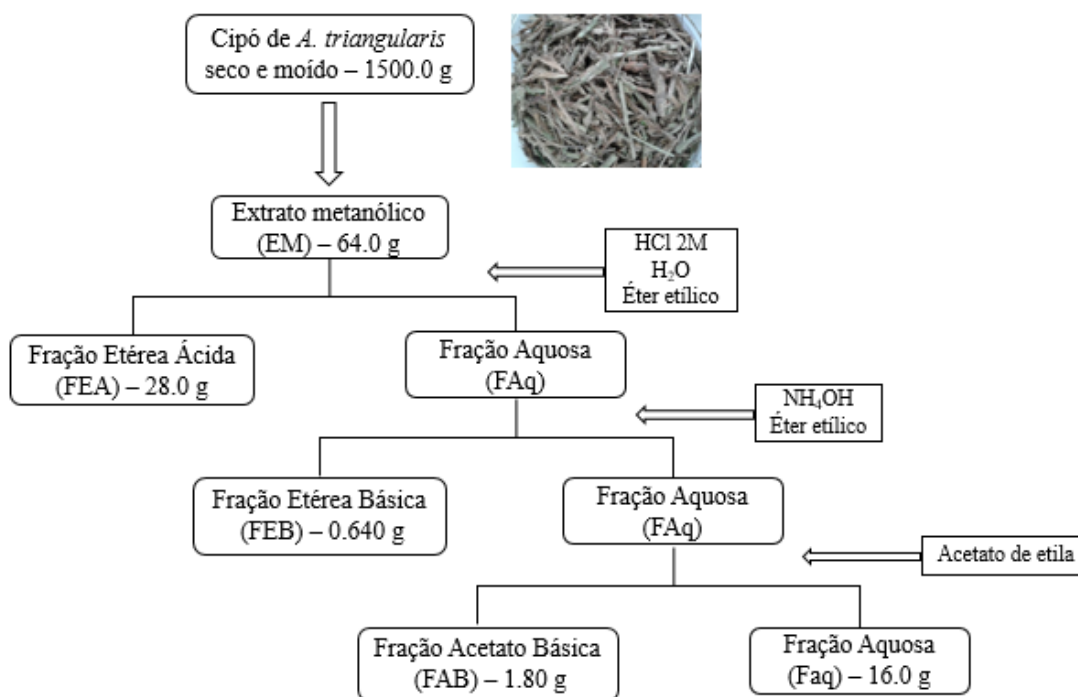


Figure 1. Dihydrocubebin (**6**) IC₅₀ against POP.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como primeira etapa a preparação do extrato bruto metanólico (EM) do cipó de *Aristolochia triangularis* Cham a partir do processo de maceração em temperatura ambiente, visando obter todos os componentes da planta sem correr riscos de degradação ou perdas. A escolha da espécie de trabalho, bem como sua parte a ser analisada, baseou-se no uso popular desta planta no Rio Grande do Sul e em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2015). Após a obtenção do EM, este foi particionado por fracionamento ácido-base, obtendo-se as frações etérea ácida (FEA), etérea básica (FEB), acetato básica (FAB) e aquosa (FAq), conforme descrito na Figura 6.

Figura 6 - Processo de fracionamento de *A. triangularis*.



Fonte: (PEREIRA, A. O.).

O extrato e as frações obtidas foram inicialmente organizadas para uma avaliação quanto aos seus potenciais antimicrobianos, antimicobacterianos e de inibição das enzimas AChE e POP, visando selecionar as frações mais ativas para a continuidade do trabalho. Conforme se pode observar nas tabelas Table 1 e Table 3 (Manuscrito 1) e Table 1 (Manuscrito 2), a fração mais ativa frente as atividades testadas foi a FEA. Diante disto, esta fração foi utilizada para início do trabalho de análise fitoquímica, a fim de se identificar quais os componentes ali presentes seriam os responsáveis pelas atividades anteriormente observadas.

O estudo fitoquímico foi realizado através da purificação cromatográfica da FEA, resultando no isolamento de nove compostos, entre eles três diterpenos (**1**, **4**, **5**), quatro lignanas (**2**, **6**, **7a**, **7b**), um sesquiterpeno (**3**) e um alcalóide (**8**). Os compostos (Figure 1, Manuscrito 1) foram identificados como ent-caur-16-en-19-al (**1**) (SILVA et al., 2012), zuonina B (**2**) (HERATH e PRIYADARSHANI, 1996), nerolidol (**3**) (SUAREZ et al., 2002), ácido (-)-caur-16-en-19-oico (**4**) (ZHANG et al., 2008), ent-caurano-16 β ,17-diol (**5**) (PACHECO et al., 2009), diidro cubebina (**6**) (CABANILLAS et al., 2010), uma mistura de α e β -cubebinas (**7a** + **7b**) (BLUMENTHAL et al., 1997) e a aristolactama BII (**8**) (KIM et al., 2008) através da comparação de seus dados espectroscópicos com os relatados na literatura. Além disso, foram obtidos neste trabalho por meio de cristalização seletiva, os dados de difração de raios-X dos compostos **5** e **7b**. Conforme previsto nos objetivos específicos desta dissertação, todos os compostos isolados foram identificados com a utilização de métodos espectroscópicos uni e bidimensionais, como RMN ^1H e ^{13}C , e através de espectrometria de massa.

Estudos já realizados mostram que o composto ent-caur-16-en-19-al (**1**) encontra-se como metabólito secundário das espécies *Helianthus annuus*, *Espeletopsis santanderensis*, *Casearia corymbosa* e *Aristolochia triangularis* (KHAN et al., 1990; PACHECO et al., 2009; PYREK, 1984; TORRENEGRA et al., 2003). São encontradas poucas atividades biológicas descritas deste composto, entre as quais sugere-se seus efeitos como antiviral, antimicrobiano e inibitório da contração da musculatura vascular (BABIKA et al., 2015; VILLARREAL et al., 2008).

Conforme observado na literatura, a lignana zuonina B (**2**) isolada de flores da espécie *Daphne genkwa*, segundo Lee et al. (2012), apresenta efeitos anti-inflamatórios devido a sua capacidade de suprimir níveis de óxido nítrico, prostaglandina E2, das citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α e a interleucina (IL-)6, além de inibir a expressão da cicloxigenase-2, tornando esta lignana um possível fármaco para doenças inflamatórias. Este composto também foi identificado no gênero *Machilus*, sendo isolado de partes aéreas da espécie *Machilus zuihoensis* var. *mushaensis* e das cascas do caule de *Machilus thunbergii* (LIN et al., 2014; PARK et al., 2004). Visto que na literatura se encontram poucos relatos de estudos biológicos de zuonina B, o presente trabalho buscou investigar as atividades antimicrobianas, antimicobacterianas e de inibição enzimática deste composto isolado pela primeira vez de *A. triangularis*.

O sesquiterpeno nerolidol (**3**) é encontrado em óleos essenciais de diversas plantas como *Baccharis dracunculifolia*, *Amaranthus retroflexus* e *Canarium schweinfurthii*, sendo também já isolado de plantas do gênero *Aristolochia* como *A. gigantea*, *A. gibertii*, *A. mollissima* e *A.*

triangularis (CANELA et al., 2004; HOLZBACH e LOPES, 2010; JAVED et al., 2016; LOPES et al., 1990; YU et al., 2007). Bastante empregados pela indústria farmacêutica na fabricação de fragrâncias em cosméticos, perfumes e produtos de higiene e limpeza, este composto também tem sido utilizado na terapêutica como agente antioxidante, anticancerígeno, antibacteriano, antifúngico, em casos de leishmaniose, malária e como neuroprotetor, podendo atuar na proteção de áreas do hipocampo, conforme descrito por Neto et al. (2013) e contra a neuroinflamação segundo Javed et al. (2016) (CEOLE et al., 2017; KUBO et al., 1992; SAITO et al., 2016).

O ácido (-)-caur-16-en-19-oico (**4**) é classificado como um diterpeno e encontra-se descrito na literatura como um metabólito secundário das espécies *Espeletia semiglobulata*, *Copaifera langsdorffii*, *Alepidea amatymbica*, *Xylopiya aethiopica* e *Aristolochia triangularis*, sendo também encontrado no própolis de mel de abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* (PACHECO et al., 2009; PAIVA et al., 2002; SOMOVA et al., 2001; SOSA-SEQUERA et al., 2010). Na literatura encontram-se relatos de atividades biológicas desta substância, sendo suas ações antiinflamatória, antitérmica, antioxidante, cardiovascular, diurética e principalmente antimicrobiana (CANALES et al., 2008; PAIVA et al., 2002; SOMOVA et al., 2001; SOSA-SEQUERA et al., 2010; ZGODA-POLS et al., 2002; YANG et al., 2016). Conforme Velikova et al. (2000), este diterpeno apresenta atividade inibitória moderada para algumas bactérias, sendo sua maior atividade frente a cepas de *S. aureus*

O metabólito secundário ent-caurano-16 β ,17-diol (**5**) é descrito na literatura como constituinte das espécies *A. elegans*, *A. pubescens* e *A. triangularis*, sendo também identificado nas plantas *Isodon flavidus* e *Chloranthus multistachys* (PACHECO et al., 2009; ZHAO et al., 1998; XU, 2013). Há poucos relatos de suas atividades biológicas, podendo-se citar seu efeito antimicrobiano já estudado (XIAO et al., 1992).

O composto diidrocubebina (**6**), da classe das lignanas, encontra-se descrito na literatura como pertencente aos metabólitos secundários de plantas do gênero *Piper*, sendo isolado das espécies *P. guineense* e *P. cubeba* (DWUMA-BADU et al., 1975; LAURENTIZ et al., 2015). Também encontrada dentre os metabólitos identificados em algumas espécies do gênero *Aristolochia*, como *A. constricta* e *A. pubescens*, esta substância apresenta resultados interessantes frente a atividades antimicobacterianas, analgésicas e antiasmáticas (BORSATO et al., 2000; KUO et al., 2012; LAURENTIZ et al., 2015; NASCIMENTO e LOPES, 2003; NUGROHO et al., 2010). No presente trabalho, o composto **6** foi isolado em muito pequena quantidade (0.005 g), o que impediu a realização dos ensaios de atividade aqui apresentados

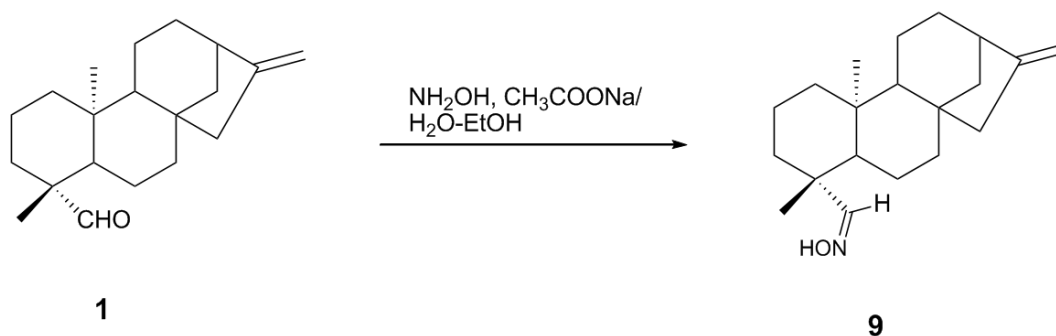
com o mesmo. Tal como o composto **2**, este é o primeiro registro de isolamento do composto **6** de *A. triangularis*.

A mistura de α e β -cubebinas (**7a** + **7b**) é amplamente distribuída por espécies do gênero *Aristolochia*, encontrada em *A. odoratissima*, *A. lagesiana*, *A. pubescens*, *A. esperanzae*, *A. elegans* e *A. triangularis*, sendo também descritas nas espécies *Piper cubeba*, *Drimys brasiliensis* e *Zanthoxylum naranjillo* (BASTOS et al., 2001; BRUNO-COLMENÁREZ et al., 2007; CLAUDINO et al., 2013; JIMÉNEZ-ARELLANES et al., 2012; PACHECO et al., 2013; PASCOLI et al., 2006; RÜCKER et al., 1981; WAHYUONO et al., 2005). Dentre as atividades biológicas já estudadas, a mistura destas lignanas é citada como possuindo propriedades analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimicobacteriana, anticancerígena e de inibição enzimática (ADFA et al., 2016; BASTOS et al., 2001; BRUNO-COLMENÁREZ et al., 2007; JIMÉNEZ-ARELLANES et al., 2012; SOMANI et al., 2017).

As aristolactamas são alcaloides característicos de diversas espécies de *Aristolochia*. As do tipo aristolactama BII (**8**) já foram isoladas das espécies *A. cucurbitifolia*, *A. kankauensis*, *A. moupinensis*, *A. cathcartii* e *A. triangularis*, sendo encontradas também em espécies vegetais como *Uvaria hamiltonii*, *Piper sanctum* e *Saururus cernuus* (HASAN et al., 2001; LIN et al., 1997; MATA et al., 2004; RAO e REDDY, 1990; TIAN-SHUNG et al., 1994; ZHANG et al., 2016; WU et al., 2000). Apresentam-se como compostos antibacterianos, antituberculosos, neuroprotetores e com importante atividade anticancerígena (CHOI et al., 2009; IQBAL et al., 2018; KIM et al., 2004; KISHORE et al., 2009).

Além destas substâncias isoladas, foi possível realizar uma reação química com o diterpeno ent-caur-16-en-19-al (**1**), com o objetivo de verificar a influência da presença de uma função aldeído ligada ao C-19 nas atividades antimicrobiana e de inibição enzimática, obtendo-se o derivado oxima **9** (Figura 7) com um rendimento de 83%.

Figura 7: Reação de formação de oxima (**9**) a partir de ent-caur-16-en-19-al (**1**).



Fonte: (PEREIRA, A. O.).

Como mostrado no Manuscrito 1 (Table 1) e no Manuscrito 2 (Table 1), a presença do grupo aldeído em C-19 do diterpeno ent-caur-16-en-19-al (**1**), parece ser importante para a manutenção da atividade antimicrobiana de **1**, porém não intensifica ou altera sua fraca capacidade de atividade de inibição das enzimas alvo do estudo. A partir desta reação, objetivava-se dar seguimento a obtenção de novos derivados de **1**, afim de aprofundar-se na tentativa de obtenção de novos compostos, buscando a modificação estrutural das substâncias como uma possível estratégia para alcançar moléculas ativas inéditas.

Tal como descrito nos Manuscritos aqui apresentados, após a etapa de identificação, os compostos isolados de *Aristolochia triangularis* foram analisados frente aos ensaios biológicos propostos nos objetivos específicos deste trabalho. As atividades antimicrobiana e antimicobacteriana foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo, onde determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para estas duas atividades, e a concentração letal mínima (CLM) que foi determinada somente na avaliação antimicrobiana das amostras, considerando que estes ensaios qualitativos foram realizados conforme o National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS, 2000). A CIM representa a menor concentração de amostra que leva a inibição do crescimento de microrganismos, ou seja, a amostra é considerada bacteriostática ou fungistática. Já o método CLM considera a menor concentração de amostra que alcança uma redução maior que 90% do número de unidades formadoras de colônia (UFC), ou seja, é considerada a menor concentração de uma amostra capaz de matar os microrganismos, sendo denominada bactericida ou fungicida (OSTROSKY et al., 2008).

A partir dos ensaios antimicrobianos, descritos no Manuscrito 1, a atividade inibitória mais significativa resultou ser a do ácido (-)-caur-16-en-19-oico (**4**) contra *Shigella sonnei*, sendo que este composto demonstrou possuir o mesmo potencial de atividade antimicrobiana do padrão utilizado, o cloranfenicol (CIMs <1,5 µg/mL). Além disso, **4** também exibiu

atividade bacteriostática e bactericida excepcional frente as cepas de *Enterobacter aerogenes* (CIM/CLM = 3,1 / 6,2 µg/mL), sendo considerado melhor bactericida do que os padrões testados, ampicilina e cloranfenicol. Seguindo os ensaios antimicrobianos, **4** apresentou alta atividade inibitória das bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* e das Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (CIM - 3,1 µg/mL). Em um estudo prévio, Mendoza et al. (1997) havia relatado a atividade antimicrobiana de **4** frente a *S. aureus* e *B. cereus*, apresentando CIMs de 16 e 125 µg/mL, respectivamente. Cepas de *Shigella flexneri* foram sensíveis aos compostos **1**, **4** (CIM - 6,2 µg/mL), **2** e **3** (CIMs - 12,5 µg/mL). Além disso, ent-caur-16-en-19-al (**1**) demonstrou atividade relevante contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter aerogenes* (CIMs - 12,5 µg/mL). Após análise na literatura, não se encontrou nenhum relato de atividade antimicrobiana do composto **1**. Em relação ao sesquiterpeno nerolidol (**3**), assim como foi observado por Bonikowski et al. (2015), neste trabalho as cepas Gram-negativas apresentam-se mais sensíveis do que as Gram-positivas a este composto. As substâncias **5**, **7a**, **7b** e **8** apresentaram moderada atividade antibacteriana, com valores de CIMs de 50 a 200 µg/mL. Em relação aos ensaios antifúngicos, os principais resultados são observados com os compostos **4** e **8**, que inibiram significativamente o crescimento de *Candida krusei*, com valores de CIM de 6,2 µg/mL.

O extrato hidroalcolólico de *A. triangularis* é descrito na literatura como sendo usado para o tratamento de doenças respiratórias, conforme conhecimento popular. Estudos avaliaram o potencial destes extratos frente à *Mycobacterium tuberculosis* e mostraram importante atividade de inibição desta cepa, com redução de duas ordens logarítmicas de magnitude no número de bactérias viáveis após trinta minutos de contato com micobactérias/extrato e ausência de micobactérias viáveis após uma hora contato (OLIVEIRA et al., 2009). Com base nestes dados, decidiu-se investigar pela primeira vez, a atividade antimicobacteriana do extrato (EM) e frações (FEA, FEB, FAB, FAq) de *A. triangularis* frente às cepas de *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense*. Uma vez que se observaram resultados promissores com o extrato e as frações analisadas, os compostos isolados em maior quantidade (**2**, **3** e **4**) foram testados frente às mesmas cepas (Table 3, Manuscrito 1), usando como referência os padrões claritromicina e sulfametoxazol (FLORES et al., 2016). Todas as amostras testadas apresentaram significativa atividade antimicobacteriana, principalmente contra *M. abscessus*, onde o EM, a FAq e a FEA apresentaram CIMs entre 4,8 e 21,4 µg/mL. O composto nerolidol (**3**) apresentou CIM de 4,9 - 19,9 µg/mL frente às três cepas estudadas, sendo o metabólito puro com maior atividade inibitória.

As atividades inibitórias das enzimas AChE e POP foram determinadas pelos métodos descritos por Ellman et al. (1961) e Toide et al. (1995), respectivamente. Os padrões utilizados nos ensaios foram os produtos naturais ácido clorogênico e eserina. Tanto o EM como as frações apresentaram capacidade de inibir das enzimas estudadas, sendo que se observou atividades inibitórias moderadas nos ensaios com AChE, em que as frações FEA, FEB e FAB a uma concentração de 200 µg/mL mostraram-se capazes de inibir a enzima em cerca de 38 a 48%, e apresentaram atividades inibitórias altas para a POP, onde todas as frações também a 200 µg/mL apresentaram resultados de percentual de inibição na faixa de 70-92% (Table 1, Manuscrito 2). Em relação aos compostos isolados neste trabalho, nenhum foi capaz de inibir a enzima AChE. Assim, a atividade inibitória moderada observada com as frações poderia ser consequência de um efeito sinérgico entre as várias substâncias presentes nestas amostras. Dentre os compostos isolados, a lignana diidrocubina (**6**) foi a substância pura que apresentou maior atividade inibitória frente a POP, apresentando um percentual de inibição superior a 99,8% na concentração de 150 µM. A partir deste resultado, determinou-se a IC₅₀ de **6**, com um resultado significativo de $15,2 \pm 0,5$ µM (Figure 1, Manuscrito 2). Conforme revisão da literatura, este é o primeiro relato da importante atividade inibitória da POP da lignana **6**, podendo este composto ser uma alternativa importante no estudo de novos tratamentos de doenças como esquizofrenia, transtorno bipolar e DA.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação, podemos concluir que:

- O estudo fitoquímico realizado com a espécie *Aristolochia triangularis* resultou no isolamento e identificação de nove compostos, entre eles, três diterpenos (ent-caur-16-en-19-al, ácido (-)-caur-16-en-19-oico e ent-caurano-16 β ,17-diol), quatro lignanas (zuonina B, diidroclubebina, α e β -clubebinas), um sesquiterpeno (nerolidol) e um alcaloide (aristolactama BII).
- O extrato (EM) e frações (FEA, FEB, FAB, FAq) da espécie *A. triangularis* foram testados quanto a atividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos e apresentaram resultados com CIM entre 15,6 e 500 $\mu\text{g/mL}$, sendo a FEA mais eficaz na inibição do crescimento de algumas cepas.
- Dentre os metabólitos secundários isolados, o ácido (-)-caur-16-en-19-oico apresentou uma significativa atividade inibitória frente *Shigella sonnei* (CIM <1,5 $\mu\text{g/mL}$) e importante atividade bacteriostática e bactericida frente *Enterobacter aerogenes* (CIM/CLM = 3,1 / 6,2 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios antifúngicos resultaram na inibição significativa de *Candida krusei* pelos compostos ácido (-)-caur-16-en-19-oico e aristolactama BII, com valores de CIM de 6,2 $\mu\text{g/mL}$.
- O ensaio antimicobacteriano com extrato (EM) e frações (FEA, FEB, FAB, FAq) de *A. triangularis* apresentou resultados promissores. Frente as cepas *Mycobacterium abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense*, os compostos zuonina B, nerolidol e ácido (-)-caur-16-en-19-oico apresentaram significativos valores de inibição, sendo do nerolidol o principal agente antimicobacteriano, com CIM de 4,9 a 19,9 $\mu\text{g/mL}$.
- As atividades inibitórias enzimáticas foram realizadas com AChE e POP, onde obteve-se atividade moderada das frações de *A. triangularis* nos ensaios da AChE e alta capacidade inibitória frente a POP. Dentre os compostos isolados, nenhum foi capaz de inibir a enzima AChE, contrapondo os resultados de inibição da enzima POP, onde a lignana diidroclubebina apresentou um percentual de inibição superior a 99,8% na concentração de 150 μM , obtendo-se como valor de IC₅₀, 15,2 \pm 0,5 μM , sendo o primeiro relato da importante atividade inibitória da POP por esta lignana.
- A análise inicial realizada com a espécie *A. triangularis* mostrou o uso popular desta planta medicinal, apresentando após este estudo sua relevância científica sendo fonte promissora de novos compostos principalmente como agentes antimicrobianos, antimicobacterianos e inibidores enzimáticos.
- Posteriormente a este trabalho, as perspectivas de estudo visam: a) a realização de novas reações químicas com os compostos isolados em maior quantidade, buscando observar a influência dos substituintes nos ensaios biológicos; b) analisar as atividades anti helmínticas e

inseticidas dos extratos, frações e compostos disponíveis; c) testar *in vivo* dos inibidores enzimáticos, buscando a observação do comportamento geral no SNC; e d) elucidar o mecanismo de ação das substâncias puras frente aos microrganismos estudados, objetivando sempre a busca de novos agentes terapêuticos mais eficientes e com menos toxicidade e efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, A. A.; AHMED, E. M.; ELTOHAMI, M. S. Isolation, characterization and quantity determination of aristolochic acids, toxic compounds in *Aristolochia bracteolata* L. **Environmental health insights**, v. 5, p. EHI S6292, 2011.
- ABHISHIKTHA, S. N. et al. Antimicrobial and radical scavenging efficacy of leaf and flower of *Aristolochia indica* Linn. **Science, technology and arts research journal**, v. 4(1), p. 103-108, 2015.
- ADFA, M. et al. Antileukemic activity of lignans and phenylpropanoids of *Cinnamomum parthenoxylon*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26(3), p. 761-764, 2016.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Módulo V. Detecção e identificação de bactérias de importância médica, 2004.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009**. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos, 2011.
- BABIAKA, S. B. et al. The chemistry and bioactivity of Southern African flora I: a bioactivity versus ethnobotanical survey of alkaloid and terpenoid classes. **RSC Advances**, v. 5(54), p. 43242-43267, 2015.
- BABKOVA, K. et al. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. **Future medicinal chemistry**, v. 9(10), p. 1015-1038, 2017.
- BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16(2), p. 258-285, 2006.
- BASTOS, J. K. et al. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of ethnopharmacology**, v. 75(2-3), p. 279-282, 2001.
- BLUMENTHAL, E.E.; SILVA, M.S.; YOSHIDA, M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 745-749, 1997.
- BONIKOWSKI, R.; ŚWITAKOWSKA, P.; KULA, J. Synthesis, odour evaluation and antimicrobial activity of some geranyl acetone and nerolidol analogues. **Flavour and fragrance journal**, v. 30, p. 238-244, 2015.
- BORSATO, M. L. et al. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55(7), p. 809-813, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008.
- BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic

nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

BRUNO-COLMENÁREZ, J. et al. Cubebin, a lignan isolated from *Aristolochia odoratissima* L. **Acta crystallographica section E: structure reports online**, v. 63(5), p. 2046-2047, 2007.

CABANILLAS, B.J. et al. Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguineispicum*. **Journal of natural products**, v. 73, p. 1884–1890, 2010.

CAHLÍKOVÁ, L. et al. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. **Fitoterapia**, v. 103, p. 192-196, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33(2), p. 179-189, 2000.

CANALES, M. et al. Antimicrobial activity of the extracts and essential oil of *Viguiera dentata*. **Pharmaceutical biology**, v. 46(10-11), p. 719-723, 2008.

CANELA, N. et al. Chemical composition of the essential oil of *Aristolochia gibertii* Hooker from Paraguay. **Journal of essential oil research**, v. 16(6), p. 566-567, 2004.

CARDOSO, A.M. **Surto de Infecção após videoscopias causado por *Mycobacterium massiliense* em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CAZARIM, M. D. S. et al. Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances. **São Paulo medical journal**, v. 134(4), p. 342-354, 2016.

CEOLE, L. F.; CARDOSO, M. D. G.; SOARES, M. J. Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-leishmania *braziliensis* activity. **Parasitology**, v. 144(9), p. 1179-1190, 2017.

CHEN, S. L. et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chinese medicine**, v. 11(1), p. 37, 2016.

CHOI, H. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-resistant *Mycobacterium massiliense* lung disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61(2), 2017.

CHOI, Y. L. et al. Synthesis of aristolactam analogues and evaluation of their antitumor activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19(11), p. 3036-3040, 2009.

CLAUDINO, V. D. et al. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 108(2), p. 140-144, 2013.

CORRÊA, C., BIASI, L. Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.). **Current agricultural science and technology**, v. 9(3), 2003.

CORTES, N. et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five *Amaryllidaceae* species: A comparative study. **Life sciences**, v. 122, p. 42-50, 2015.

CRAMER, A. O. et al. Major depression as a complex dynamic system. **PloS one**, v. 11(12), p. 1-20, 2016.

CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in neuro-psycho pharmacology and biological psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2016.

DATTA, D. et al. Calcium and superoxide-mediated pathways converge to induce nitric oxide-dependent apoptosis in *Mycobacterium fortuitum*-infected fish macrophages. **PloS one**, v. 11(1), 2016.

DAVIN-REGLI, A. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 392, 2015.

DE BARROS, F.; CAPELLARI JR, L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Aristolochiaceae. **Boletim de botânica da Universidade de São Paulo**, v. 22(1), p. 15-18, 2004.

DELAPPE, N. et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an area of low incidence of infection **Journal of clinical microbiology**, v. 41(5), p. 1919-1924, 2003.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista multiCiência**, v. 7(1), p. 1-16, 2006.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DWUMA-BADU, D.; AYIM, J. S.; DABRA, T. T. Constituents of west African medicinal plants. IX. Dihydrocubebin, a new lignan from *Piper guineense*. **Journal of natural products**, v. 38(4), p. 343-345, 1975.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Documento 316- Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Pelotas, RS, 2010.

FERREIRA, M. L. et al. Aporphine and bisaporphine alkaloids from *Aristolochia lagesiana* var. *intermedia*. **Phytochemistry**, v. 71(4), p. 469-478, 2010.

FILHO, A.G. et al. Inhibitory effect of Verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex spreng on Prolyl Oligopeptidase activity. **Phytotherapy research**, v. 26, p. 1472-1475, 2012.

FLORES, V.C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 229-235, 2016.

FRANÇA, V.C. et al. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 15(4), p. 326-330, 2005.

GARCIA, M. H. O. Investigação de surto de infecção hospitalar associado a micobactérias de crescimento rápido, Rio de Janeiro. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, p. 39, 2007.

GARCÍA, V. M. N. et al. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. **Pharmaceutical biology**, v. 44(4), p. 297-300, 2006.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

HASAN, C. M.; ASHA, K. N.; RASHID, M. A. Aristolactams from the stem bark of *Uvaria hamiltonii*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 29(2), p. 207-208, 2001.

HEINRICH, M. et al. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 - a global assessment based on bibliographic sources. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125(1), p. 108-144, 2009.

HELLINGER, R. et al. Inhibition of human prolyl oligopeptidase activity by the cyclotide psysol 2 isolated from *Psychotria solitudinum*. **Journal of natural products**, v. 78(5), p. 1073-1082, 2015.

HERATH B.H.M.T., PRIYADARSHANI, A.M.A. Two lignans and an aryl alkanone from *Myristica dactyloides*. **Phytochemistry** v. 42, p. 1439-1442, 1996.

HINRICHSEN, S.L. Micobactéria de crescimento rápido – MCR. **Prática hospitalar**. v.53, p.106-111, 2007.

HOLZBACH, J. C. **Aristolactamas e alcanidas isoladas de *Aristolochia gigantea* Mart.**, Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. Aristolactams and alkamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15(12), p. 9462-9472, 2010.

INGEN, J. et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug resistance updates**, v. 15(3), p. 149-161, 2012.

IQBAL, E. et al. Isolation and characterization of aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their biological activities. **Journal of King Saud University-Science**, v. 30(1), p. 41-48, 2018.

IRAZUSTA, J. et al. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. **Neurochemistry international**, v. 40(4), p. 337-45, 2002.

JALKAMEN, A. J. et al. Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine – treated rats. **Basic and clinical pharmacology and toxicology**, v. 100, n. 2, p. 132-138, 2006.

JAVED, H. et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. **BMC Neuroscience**, v. 17(1), p. 58, 2016.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A. et al. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of pure compounds from *Aristolochia elegans* rhizomes. **Evidence-Based complementary and alternative medicine**, v. 1, 2012.

JUNIOR, V. C. P. et al. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 39(2), p. 230-232, 2006.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28(3), p. 519-528, 2005.

KAMARAJ, C. et al. Insecticidal and larvicidal activities of medicinal plant extracts against mosquitoes. **Parasitology research**, v. 107(6), p. 1337-1349, 2010.

KHAN, M. R. et al. Clerodane diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29(11), p. 3591-3595, 1990.

KIM, J.K. et al. Total synthesis of aristolactams via a one-pot Suzuki-Miyaura coupling/aldol condensation cascade reaction. **Organic letters**, v. 10, p. 3544-3546, 2008.

KIM, S. R. et al. Aristolactam BII of *Saururus chinensis* attenuates glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures probably by inhibiting nitric oxide production. **Planta medica**, v. 70(05), p. 391-396, 2004.

KISHORE, N. et al. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. **Fitoterapia**, v. 80(3), p. 149-163, 2009.

KOH, W. J. et al. Oral macrolide therapy following short-term combination antibiotic treatment of *Mycobacterium massiliense* lung disease. **Chest**, v. 150(6), p. 1211-1221, 2016.

KOTLOFF, K. et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the world health organization**, v. 77 (8), p. 651-66, 1999.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40(2), p. 245-248, 1992.

KUO, P. C.; LI, Y. C.; WU, T. S. Chemical constituents and pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 *mădōu ling*) species. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 2(4), p. 249-266, 2012.

LAURENTIZ, R. et al. Avaliação da atividade antimicobacteriana da lignana diidroscubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17(1), p. 782-789, 2015.

LEE, M. Y. et al. Zuonin B inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation via downregulation of the ERK1/2 and JNK pathways in RAW264. 7 macrophages. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 1, p. 1-8, 2012.

LEÓN-DÍAZ, R. et al. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 105(1), p. 45-51, 2010.

LI, H. et al. Eleven aristolochic acid derivatives from *Aristolochia cinnabarina*. **Phytochemistry**, v. 37(1), p. 237-239, 1994.

LIN, R. J. et al. Phytochemical investigation and cytotoxic evaluation of components of leaves and stems of *Machilus zuihoensis* var. *mushaensis*. **Chemistry of natural compounds**, v. 50(6), p. 978-981, 2014.

LIN, W. H. et al. Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (I). **Journal of chinese pharmaceutical sciences**, v. 6, p. 8-13, 1997.

LIU, H. R. et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22(21), p. 6124-6133, 2014.

LOPES, L. M. et al. Terpenes from *Aristolochia triangularis*. **Phytochemistry**, v. 29(2), p. 660-662, 1990.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

MACEDO, J. L. S; MAIEROVITCH, C.; HENRIQUES, C. M. P. Postoperative infections due to rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Brazilian journal of plastic surgery**. v. 24, n. 4, p. 544-551, 2009.

MACHADO, M. B. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Aristolochia ridícula***, Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 69(18), p. 3095-3102, 2008.

MAES, M. et al. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. **Psychiatry research**, v. 58(3), p. 217-225, 1995.

MATA, R. et al. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **Journal of natural products**, v. 67(12), p. 1961-1968, 2004.

MATHEW, J. E. et al. Anti-inflammatory, antipruritic and mast cell stabilizing activity of *Aristolochia indica*. **Iranian journal of basic medical sciences**, v.14(5), p. 422, 2011.

MAZZANTI, C. M. et al. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência rural**, v. 34(3), p. 803-807, 2004.

MENDOZA, A.; WILKENS, M; URZFLA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 58, p. 85-88, 1997.

MONGELLI, E. et al. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71(1-2), p. 145-151, 2000.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14(4), p. 624-628, 2012.

MUSCHIETTI, L. et al. The antiinflammatory effect of some species from South America. **Phytotherapy research**, v. 10(1), p. 84-86, 1996.

NAJAFI, Z. et al. Novel tacrine-1, 2, 3-triazole hybrids: In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 125, p. 1200-1212, 2017.

NAKANISHI, T. et al. Aristolosite, an aristolochic acid derivative from stems of *Aristolochia manshuriensis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1759-1762, 1982.

NASCIMENTO, D. S.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 24(2), p. 414-422, 2010.

NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 63(8), p. 953-957, 2003.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. Approved Standard, 5th Ed, NCCLS Document M7-A4, 2000.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139(1), p. 81-89, 2012.

NESSAR, R. et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67(4), p. 810-818, 2012.

NETO, J. D. N. et al. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. **Neurochemical research**, v. 38(9), p. 1861-1870, 2013.

NGUTA, J. M. et al. Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. **International journal of mycobacteriology**, v. 4(3), p. 165-183, 2015.

NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. Nitro derivatives and other constituents of *Aristolochia melastoma*. **Química nova**, v. 35(4), p. 780-782, 2012.

NONAKA, F. C. et al. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37(2), p. 125-132, 2008.

NUGROHO, A. E. et al. Effects of dihydrocubebin, a lignan isolated from Indonesian plant *Piper cubeba*, on the histamine release from rat mast cells. **Oriental pharmacy and experimental medicine**, v. 10(3), p. 200-207, 2010.

OLIVEIRA, D. G. et al. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 28(2), p. 165-169, 2009.

OLIVEIRA, M. H. et al. Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. IX(1), p. 62-88, 2012.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18(2), p. 301-307, 2008.

ÖZTAŞKIN, N. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. **Bioorganic chemistry**, v. 60, p. 49-57, 2015.

PACHECO, A. G. **Estudo fitoquímico de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae)**, Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PACHECO, A. G. et al. ^{13}C -NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14(3), p. 1245-1262, 2009.

PACHECO, A. G. et al. Theoretical study of structural α - and β -cubebin isolated from *Aristolochia esperanzae* Kuntze. **Planta medica**, v. 79(13), p. 5, 2013.

PADOVEZE, M. C. et al. Outbreak of surgical infection caused by nontuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal of hospital infection**, v. 67, n. 2, p. 161-167, 2007.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular pharmacology**, 39(6), 303-307, 2002.

PARK, B. Y. et al. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 27(8), p. 1305-1307, 2004.

PASCOLI, I. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 67(7), p. 735-742, 2006.

PEREIRA, A. O. **Estudos das atividades antimicrobiana, de inibição enzimática e análise fitoquímica de *Aristolochia triangularis* Cham. e *Aristolochia gigantea* Mart.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25(1), p. 45-61, 2002.

PITOMBO, M. B.; LUPI, O.; DUARTE, R. S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**. v. 31 (11), p.529-533, 2009.

- POLGÁR, L. The Prolyl Oligopeptidase family. **Cellular and molecular life sciences**, v. 59(2), p. 349-362, 2002.
- PYREK, J. S. Neutral diterpenoids of *Helianthus annuus*. **Journal of natural products**, v. 47(5), p. 822-827, 1984.
- RAO, K. V.; REDDY, G. C. S. Chemistry of *Saururus cernuus*, V. sauristolactam and other nitrogenous constituents. **Journal of natural products**, v. 53(2), p. 309-312, 1990.
- RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 11(2), p. 57-69, 2001.
- RÜCKER, G., LANGMANN, B.; SIQUEIRA, N. S. Inhaltsstoffe von *Aristolochia triangularis*. **Planta medica**, v. 41(02), p. 143-149, 1981.
- SAITO, A. Y. et al. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48(6), p. 641-646, 2016.
- SANTOS, D.R.S. et al. Resistance profile of strains of *Mycobacterium fortuitum* isolated from clinical specimens. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 42(4), p. 299-301, 2016.
- SANTOS, M. Z. **Avaliação da inibição da prolil oligopeptidase, dipeptidil peptidase e acetilcolinesterase por constituintes de plantas nativas do bioma pampa-RS. Parâmetros bioquímicos e comportamentais de *Phyllanthus tenellus***. 2016. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- SCALON, S.P.Q. et al. Temperatura, luz e substrato na germinação de sementes de cipó mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 9(4), p. 32-38, 2007.
- SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. **Microbiology spectrum**, v. 3(5), 2015.
- SHI, L. S. et al. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12(2), p. 439-446, 2004.
- SHINODA, M. et al. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β -protein in NG108-15 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 235(3), p. 641-645, 1997.
- SIATKA, T. et al. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). **Molecules**, v. 22(7), p. 1181, 2017.
- SILVA, D.M. et al. *ent*-Kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Química nova**, v. 35, p. 1570-1576, 2012.
- SILVA, F. H. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* infection - an unusual pathogen in the ICU. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 23(1), p. 108-111, 2011.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOMANI, G. S. et al. Neuroprotective effect of Cubebin: a dibenzylbutyrolactone lignan on scopolamine-induced amnesia in mice. **Indian journal of medical research**, v. 146(2), p. 255, 2017.

SOMOVA, L. I. et al. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopiya aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 77(2-3), p. 165-174, 2001.

SOSA-SEQUERA, M. C.; SUAREZ, O.; DALO, N. L. Kaurenic acid: an in vivo experimental study of its anti-inflammatory and antipyretic effects. **Indian journal of pharmacology**, v. 42(5), p. 293, 2010.

SUAREZ, L.C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F.D. Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 13, p. 339-344, 2002.

TARRAGÓ, T. et al. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. **Bioorganic e medicinal chemistry**, v. 16, p. 7516-7524, 2008.

TIAN-SHUNG, W. et al. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. **Studies in natural products chemistry**, v. 32, p. 855-1018, 2005.

TIAN-SHUNG, W.; LI-FEI, O.; CHE-MING, T. Aristolochic acids, aristolactam alkaloids and amides from *Aristolochia kankauensis*. **Phytochemistry**, v. 36(4), p. 1063-1068, 1994.

TOIDE, K. et al. JTP-4819: a Novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 274, p. 1370-1378, 1995.

TORRENEGRA, R. D. et al. Zoapatlin and ent-kaurane derivatives from *Espeletiopsis santanderensis*. **Revista latinoamericana de química**, v. 31(2), p. 69-73, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Ed. Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. Ed Atheneu, 2008.

ULU, A. C. et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: a serious threat in ICUs. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 219, 2015.

VIANA-NIERI, L. K. V. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of clinical microbiology**. v. 46, n. 3, p. 850-855, 2008.

VELIKOVA, M. et al. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71(6), p. 693-696, 2000.

VIEGAS, C. J. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal

- de Alzheimer. **Química nova**, v. 27(4), p. 655-660, 2004.
- VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29(2), p. 326-337, 2006.
- VILLARREAL, S. et al. Composition and in vitro antibacterial activity of essential oil of *Oyedaea verbesinoides* DC from Venezuela. **Journal of essential oil bearing plants**, v.11(6), p. 643-648, 2008.
- WAHYUONO, S. et al. Identification of cubebin and epicubebin isolated from *Piper cubeba* Lf fruits with two D-NMR spectroscopy. **Indonesian journal of pharmacy**, v. 1, p. 232-238, 2005.
- WANKE, C. Pathogenic *Escherichia coli*. **Retrieved february**, v. 18, 2015.
- WENZEL, R. P. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. **Clinical infectious diseases**, v. 45(1), p. 85-88, 2007.
- WU, T. S. et al. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural product reports**, v. 21(5), p. 594-624, 2004.
- WU, T. S.; CHAN, Y. Y.; LEU, Y. L. The constituents of the root and stem of *Aristolochia cucurbitifolia* hayata and their biological activity. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 48(7), p. 1006-1009, 2000.
- XIAO, C. P. et al. Antimicrobial activity (in vitro) of the constituents of *Bulbus Fritillariae*. **Journal of China Pharmaceutical University**, v. 23, p. 188-189, 1992.
- XU, Y. J. Phytochemical and biological studies of *Chloranthus* medicinal plants. **Chemistry & biodiversity**, v. 10(10), p. 1754-1773, 2013.
- YANG, Y. et al. Biological activity of extracts and active compounds isolated from *Siegesbeckia orientalis* L. **Industrial crops and products**, v. 94, p. 288-293, 2016.
- YU, J. Q. et al. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 23(2), p. 162-167, 2007.
- ZACHOW, L. L. et al. Chemical composition and evaluation of prolyl oligopeptidase and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Leonurus sibiricus* L. from Brazil. **Natural product research**, v. 31(12), p. 1459-1463, 2017.
- ZGODA-POLS, J. R. et al. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. **Fitoterapia**, v. 73(5), p. 434-438, 2002.
- ZHANG, G. et al. Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. **Journal of natural products**, v. 71, p. 1167-1172, 2008.

ZHANG, H. C. et al. Aristolactam-type alkaloids and aristolochic acids from *Aristolochia moupinensis* and *Aristolochia cathcartii*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 65, p. 198-201, 2016.

ZHANG, Y. T.; JIANG, J. Q. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). **Helvetica chimica acta**, v. 89(11), p. 2665-2670, 2006.

ZHAO, Q. S. et al. Diterpenoids from *Isodon flavidus*. **Phytochemistry**, v. 48(6), p. 1025-1029, 1998.

ZHOU, Z. B. et al. Bioactive benzofuran neolignans from *Aristolochia fordiana*. **Planta medica**, v. 79(18), p. 1730-1735, 2013.