



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

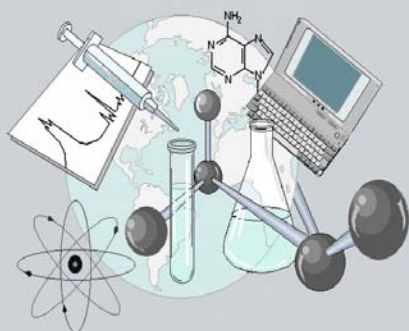
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudo químico e avaliação do potencial moluscicida da espécie vegetal
Serjania glabrata Kunth (Sapindaceae)”**

Dissertação apresentada por
Viviane Letícia Grzesiuk ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química

CECE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, ABRIL/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

Dissertação de Mestrado

**“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MOLUSCICIDA DA ESPÉCIE
VEGETAL *Serjania glabrata* Kunth (SAPINDACEAE)”**

Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti

Mestranda: Viviane Leticia Grzesiuk

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G895e Grzesiuk, Viviane Leticia
Estudo químico e avaliação do potencial moluscicida da espécie vegetal *Serjania glabrata* Kunth (sapindaceae) / Viviane Leticia Grzesiuk. -- Maringá, 2008.
91 f. : il., figs. (algumas color), tabs.

Orientador : Prof. Dr. Gentil José Vidotti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, 2008.

1. *Serjania glabrata* Kunth - Estudo químico. 2. *Serjania glabrata* Kunth - Avaliação do potencial moluscicida. 3. Sapindaceae. I. Vidotti, Gentil José, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada. III. Título.

CDD 21.ed. 547.71

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Clara e Tadeu, aos meus irmãos Maurício e Priscila pelo incentivo, muitas vezes ofertado em um olhar, apoio e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por todos os momentos e etapas, e, principalmente, pela minha vida.
- Ao Professor Dr. Gentil José Vidotti pela paciência, orientação, disponibilidade, apoio e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais.
- À minha mãe que me ensinou ser perseverante, ter coragem e bom humor em todos os momentos.
- Ao meu pai que me ensinou ter paciência, pelo incentivo e apoio.
- Aos meus irmãos pelo amor e incentivo.
- Ao meu companheiro Inácio Jorge da Silva Junior, pela ajuda incondicional.
- A todos os professores da UEM que contribuíram direta e indiretamente com a minha formação acadêmica.
- Aos professores Maria Helena Sarragiotto, Clara Megumi Abe Tanaka e Adley Forti Rubira pelo apoio e contribuições para o trabalho.
- À professora Dra. Lucília Motinha Zamuner pela supervisão no teste moluscicida.
- À técnica Ivânia pela realização das análises de RMN e disposição para esclarecimentos de dúvidas.
- À Janaina de Castro Marchi Medina pela amizade, paciência, apoio e companheirismo.
- À Juliana Luna Bilheiro Peixoto pela disposição, apoio e amizade.
- Ao Claudemir e Cristina da secretaria de pós-graduação de química.
- Aos colegas de laboratório pelo companheirismo.

- Aos amigos e colegas de laboratório Ana Paula, Andrelson, Elídia, Jacqueline, Juliana, Luiz Henrique, Marcos H. Kunita (Marcão), Raissa e Tatiana pela força, incentivo e pelos momentos de descontração.
- Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá por possibilitar a realização deste trabalho.
- E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação da coleta das diferentes partes da planta e dos extratos obtidos.....	19
Tabela 2: Dados do fracionamento da fração SG-A por coluna cromatográfica.	25
Tabela 3: Massas e códigos das frações reunidas da CC de SG-AI.....	26
Tabela 4: Códigos e massas das frações reunidas da CC de SG-AI.1.....	27
Tabela 5: Massas e códigos das frações reunidas da CC SG-AI.4.....	29
Tabela 6: Eluentes utilizados e frações obtidas na coluna cromatográfica realizada com de SG-D.	31
Tabela 7: Dados do fracionamento da fração SG-D por coluna cromatográfica.....	32
Tabela 8: Dados do fracionamento do extrato SG-E por coluna cromatográfica.....	35
Tabela 9: Dados do fracionamento cromatográfico da fração SG-E.2.....	36
Tabela 10: Códigos e massas das frações reunidas da CC de SG-E.2.....	37
Tabela 11: Dados da coluna cromatográfica realizada com o precipitado SG-FpA.....	39
Tabela 12: Massas e códigos das frações reunidas da CC de SG-FpA.	40
Tabela 13: Dados de letalidade de <i>Artemia salina</i> para os extratos e frações obtidos da espécie vegetal <i>Serjania glabrata</i> kunth (Sapindaceae) (LC ₅₀ em µg.mL ⁻¹)	42
Tabela 14: Tempo de retenção das substâncias presentes em SG-1 para CG-EM.....	44
Tabela 15: Tempo de retenção das substâncias presentes em SG-2 para CG-EM.....	46
Tabela 16: Dados de deslocamento de carbono para SG-3 em CDCl ₃ e comparação com dados da literatura para β-amirina.	48

Tabela 17: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-4.	51
Tabela 18: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H para a substância n-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina (M4HP) ¹⁵ e SG-4.	52
Tabela 19: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-5.	56
Tabela 20: Valores de deslocamento de ^{13}C , ^1H da substância SG-5 e cianolipídio.....	57
Tabela 21: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-6.	60
Tabela 22: Dados espectrais de ^1H , ^{13}C para as substâncias Quebrachitol e SG-6.....	61
Tabela 23: Valores de deslocamento de ^1H e ^{13}C das substâncias β -sitosterol glicosilado e SG-7.....	63
Tabela 24: Valores de LC_{50} e LC_{90} para os extratos de <i>Serjania glabrata</i> testados frente ao caramujo de <i>B. glabrata</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalhe das sementes de <i>Serjania glabrata</i> Kunth (Sapindaceae)	10
Figura 2: Ciclo da esquistossomose.	11
Figura 3: Foto de <i>Biomphalaria glabrata</i>	13
Figura 4: <i>Artemia salina</i> na fase adulta e em forma de náupilo.	14
Figura 5: Procedimento empregado para obtenção dos extratos das folhas (---), galhos (---) das sementes (---) e atividades realizadas (---): 1- Toxicidade com <i>Artemia salina</i> e 2- Atividade moluscicida.....	18
Figura 6: Materiais usados no laboratório de Produtos Naturais para a realização do ensaio de mortalidade de <i>Artemia salina</i>	21
Figura 7: Esquema para teste de atividade moluscicida frente ao caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i>	22
Figura 8: Procedimentos empregados no isolamento dos constituintes químicos da planta <i>Serjania glabrata</i> Kunth.....	24
Figura 9: Procedimento empregado no isolamento dos constituintes químicos dos galhos da planta <i>Serjania glabrata</i> Kunth.....	30
Figura 10: Procedimentos empregados no isolamento dos constituintes químicos das sementes da planta <i>Serjania glabrata</i> Kunth	34
Figura 11: Fotos da diálise realizada com o precipitado do extrato etanólico das sementes de <i>Serjania glabrata</i> Kunth. (a) logo após o sistema ter sido montado; (b) após 24 h de diálise frente água destilada.	38

Figura 12: Cromatograma de CG-EM de SG-1.....	44
Figura 13: Cromatograma de CG-EM de SG-2.....	46
Figura 14: Cromatograma de CG-EM de SG-5.....	54
Figura 15: Conformação da substância SG-6, quebrachitol.....	59

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-1.....	68
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5 MHz) de SG-1.....	69
Anexo 3: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75.5 MHz) de SG-1.....	70
Anexo 4: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-2.....	71
Anexo 5: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5 MHz) de SG-2.....	72
Anexo 6: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-3.....	73
Anexo 7: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3.....	74
Anexo 8: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3.....	75
Anexo 9: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3.....	76
Anexo 10: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-4.....	76
Anexo 11: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.....	77
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.....	78
Anexo 13: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.....	79
Anexo 14: Espectro de RMN2D COSY (^1H - ^1H , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.....	80
Anexo 15: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-5.....	81
Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5MHz) de SG-5.....	82
Anexo 17: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.....	82
Anexo 18: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.....	83
Anexo 19: Espectro de RMN2D COSY (^1H - ^1H , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.....	84

Anexo 20: Espectro de RMN ^1H (δ , D_2O , 300 MHz) de SG-6.	85
Anexo 21: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.	86
Anexo 22: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.	86
Anexo 23: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.....	87
Anexo 24: Espectro de RMN2D COSY-45 (^1H - ^1H , δ , D_2O , 300 MHz) de SG-6.....	88
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-7.....	89
Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-7.....	90
Anexo 27: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-7.....	90

ABREVIATURAS

B.....	Biomphalaria
CC.....	Cromatografia em Coluna
CCD.....	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP.....	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG.....	Cromatografia Gasosa
CG-EM.....	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
d.....	Dubleto
DEPT.....	Melhoramento sem distorção por transferência de polarização
EM.....	Espectrometria de massas
Fig.....	Figura
J.....	Constante de acoplamento
m.....	Multiplete
M ⁺	Íon molecular
m/z.....	Relação massa carga
min.....	Minuto
Mult.....	Multiplicidade
p.....	Página
R.....	Radical Substituente
RMN2D.....	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
s.....	Singleto

S.....Serjania
SG-A.....Extrato hexânico obtido das folhas
SG-B.....Extrato etanólico obtido das folhas
SG-C.....Extrato hexânico obtido dos galhos
SG-D.....Extrato etanólico obtido dos galhos
SG-E.....Extrato hexânico obtido das sementes
SG-F.....Extrato etanólico obtido das sementes
SG-G.....Extrato aquoso obtido das sementes
UEM.....Universidade Estadual de Maringá
 δDeslocamento químico em ppm
 ϕ_iDiâmetro Interno da Coluna
1D.....Uma dimensão
RMN de ^1HRessonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
2D.....Duas dimensões
RMN de ^{13}CRessonância Magnética Nuclear de carbono 13

RESUMO

Palavras-chaves: *Serjania glabrata*, Sapindaceae, moluscicida.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo químico e a avaliação do potencial moluscicida da espécie vegetal *Serjania glabrata* Kunth, pertence à família Sapindaceae. Esta família caracteriza-se pelo acúmulo de quebrachitol e saponinas triterpênicas (geralmente tóxicas) em seus tecidos parequimáticos, e nas suas sementes uma classe incomum de compostos, os cianolipídios. A planta foi separada em folhas, galhos e sementes e submetida a diferentes metodologias de extração e purificação. O fracionamento extrato hexânico das folhas em diferentes solventes utilizando técnicas cromatográficas resultou no isolamento de duas misturas de hidrocarbonetos insaturados e do triterpeno β -amirina. O aminoácido n-metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina foi isolado do extrato etanólico dos galhos após fracionamento em coluna cromatográfica. Do extrato hexânico das sementes foi isolado um cianolipídio de tipo I, o 1-ciano-2-hidroximetilpropil-2-en-1-ol-diéster. Também foi empregada, a metodologia de precipitação de saponinas e posterior diálise do precipitado com o extrato etanólico das sementes. Do fracionamento em coluna cromatográfica foi isolada a substância quebrachitol. A avaliação do potencial moluscicida dos extratos indicou o hexânico dos galhos como sendo ativo e hexânico das sementes como sendo muito ativo, com valor de LC_{50} de $137,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $28,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

ABSTRACT

Keywords: *Serjania glabrata*, Sapindaceae, molluscicidal.

The present work was aimed at the chemical study and evaluation of molluscicidal potential of the vegetable species *Serjania glabrata* Kunth, which belongs to the family Sapindaceae. This family is characterized by the accumulation of quebrachitol and triterpenic saponins (often toxic) in their parenchymatous tissues, and their seeds an unusual class of compounds, the cyanolipids. The plant was separated into leaves, twigs and seeds and subjected to different methods of extraction and purification. The fractionation of hexane extract from the leaves in different solvents using chromatography techniques resulted in the isolation of two mixtures of unsaturated hydrocarbons and triterpene β -amyrin. The amino acid N-methyl-trans-4-hydroxyl-L-proline was isolated from the ethanolic extract of branches after fractionation in column chromatography. With the hexane extract of the seeds was isolated a cyanolipid type I, the 1-cyano-2-hydroxymethylprop-2-en-1-ol-diester. It was also employed the methodology of precipitation saponins and subsequent dialysis of the precipitate of the ethanolic extract of the seeds. Through the column chromatography fractionation was isolated the substance quebrachitol. The evaluation of the molluscicidal potential indicated the hexane extracts of branches as active and hexane extract of the seeds as very active, with the LC_{50} value of $137,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $28,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

OBJETIVOS DO TRABALHO

- Realizar o estudo químico da espécie vegetal *Serjania glabrata* Kunth visando o isolamento e caracterização dos principais componentes.
- Caracterizar, a partir do estudo químico guiado por bioensaios, as substâncias responsáveis pela atividade moluscicida.
- Avaliar o potencial desta como agente moluscicida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família Sapindaceae	3
1.2.1. <i>Serjania glabrata</i> kunth	9
1.4. Atividade Moluscicida e Esquistossomose	10
1.5. Teste de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	14
3. PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1. Materiais e métodos.....	15
3.2. Preparação dos extratos e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal <i>Serjania glabrata</i> kunth (Sapindaceae)	17
3.2.1. Coleta e secagem da planta.....	17
3.2.2. Teste de mortalidade de <i>Artemia salina</i>	20
3.2.3. Teste de atividade moluscicida	21
3.2. Estudo Fitoquímico	23
3.2.1. Estudo das Folhas.....	23
3.2.1.1. Fracionamento do extrato hexânico das folhas e Isolamento das substâncias SG-1 e SG-2.....	24
3.2.1.2. Estudo da fração SG-A.1.4 e Isolamento da substância SG-3.....	28
3.2.2. Estudo dos Galhos	30
3.2.2.1. Fracionamento do extrato etanólico dos galhos e Isolamento de SG-4	30
3.2.2.2. Partição do extrato etanólico dos galhos.....	33
3.2.3. Estudo das Sementes	34

3.2.3.1. Fracionamento de SG-E.....	34
3.2.3.2. Precipitação de saponinas do extrato etanólico SG-F.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i>	41
4.1. Caracterização de SG-1	43
4.2. Caracterização de SG-2	45
3.3. Caracterização de SG-3	47
3.4. Caracterização de SG-4	49
4.5. Caracterização de SG-5	53
4.6. Caracterização de SG-6	58
3.14. Caracterização de SG-7	62
3.15. Estudo da avaliação da atividade moluscicida.....	64
4. CONCLUSÕES	66
5. BIBLIOGRAFIA	91

1. INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos o homem tem feito uso de plantas medicinais para produzir remédios destinados ao tratamento de seus males. Estas têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, através do isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias ⁽¹⁾. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde ⁽²⁾.

Muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular. Mesmo com os avanços da farmacologia, na produção de medicamentos e produtos sintéticos, podemos perceber que esta prática ainda persiste no tempo, principalmente entre as comunidades mais carentes. Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento ⁽²⁾.

Vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observada na última década ⁽¹⁾.

Esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia. A Fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal, cuja abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social ⁽³⁾.

A utilização de plantas não se dá somente para o tratamento de forma direta das enfermidades humanas, mas como também de forma indireta. O controle de doenças evitando sua propagação através do rompimento de seus ciclos. Como exemplo, muitas plantas têm sido avaliadas como agentes moluscicidas.

Certamente o Brasil possui uma das maiores ou a maior biodiversidade do planeta ⁽⁴⁾. O estudo químico de plantas medicinais, visando à obtenção de novos compostos bioativos, constitui uma linha de pesquisa de grande interesse na área de Produtos Naturais, sendo que a descoberta destes tem estimulado pesquisadores a buscarem isolar e identificar novos compostos de interesse medicinal.

1.1. Família Sapindaceae

A planta em estudo, *Serjania glabrata* Kunth, pertence à família Sapindaceae, a qual compreende cerca de 140 gêneros e 1500 espécies. Seus representantes apresentam-se como árvores, arbustos ou trepadeiras. Geralmente são plantas taniníferas, comumente produzem proantocianinas, às vezes ácido cianogênico. Acumulam em seus tecidos parenquimáticos quebrachitol e saponinas triterpênicas, que geralmente são tóxicas.

Encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais, podendo ter alguns membros encontrados em região de clima temperado. O maior gênero são as trepadeiras *Serjania*, com cerca de 220 espécies, e *Paullinia*, com cerca de 150 espécies ⁽⁵⁾.

No Brasil, essa família tem como maior e mais representativa área de dispersão a região amazônica, de onde se distribui por todas as outras Unidades da Federação. Particularmente, na região Centro-Oeste brasileira, constituída pelos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal ⁽⁶⁾.

Muitas espécies de plantas da família Sapindaceae são usadas na medicina tradicional em várias partes do mundo devido ao seu conjunto de atividades biológicas: como diurético, estimulante, expectorante, surfactante natural, sedativo, vermífugo, contra dores de estômago e dermatites ⁽⁷⁾.

Sapindus saponaria é conhecido como saboeiro, sabão-de-soldado, jequitinhaçu, entre outros, tem sua casca, raiz e frutos utilizados na medicina popular como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo

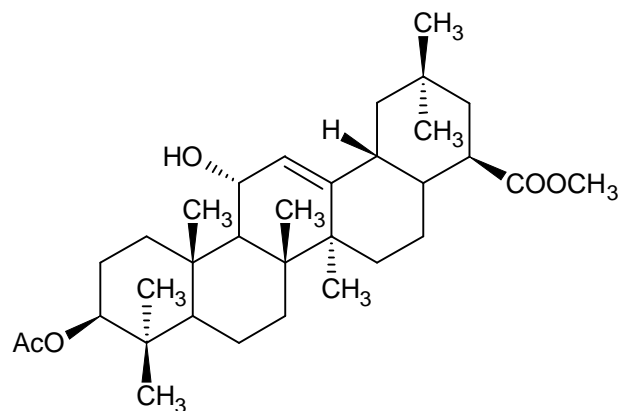
do sangue e contra a tosse ⁽⁷⁾. Os frutos servem para a lavagem de roupas por possuírem saponinas.

A lichia (*Litchi chinensis*), originária da China, possui frutos de casca rugosa e de cor vermelha, a polpa é gelatinosa e translúcida e são conhecidos como morango chinês.

O guaraná é um arbusto originário da Amazônia, encontrado no Brasil e Venezuela, cultivado principalmente no município de Maués-Am e na Bahia. Seu nome científico é *Paullinia cupana* e pertence a família Sapindaceae. Sua fruta possui uma substância parecida com a cafeína (guaraína) e devido a essa propriedade estimulante é usada para a fabricação de xaropes, barras, pós e refrigerantes.

Saponinas, diterpenos, flavonóides, compostos cianogênicos e aminoácidos, entre outros compostos, têm sido caracterizados deste grupo de plantas ⁽⁸⁾.

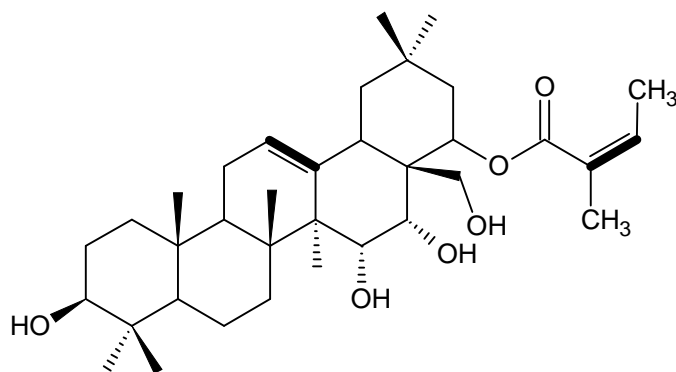
A planta *Serjania triquetra* Radlk é usada na medicina popular mexicana como diurético e seu estudo resultou no isolamento de uma sapogenina, 11 α -hidroperoxi-hederagenina (**1**), considerada intermediário chave na biossíntese de muitos triterpenos ⁽⁸⁾.



(1)

Glicosídeos de hederagenina são reportados em estudo realizados com as plantas *Pometia eximia*⁽⁹⁾, *Elattostachys apetala*⁽¹⁰⁾, *Sapindus trifoliatus*⁽¹¹⁾ e *Sapindus mukorossi*⁽¹²⁾.

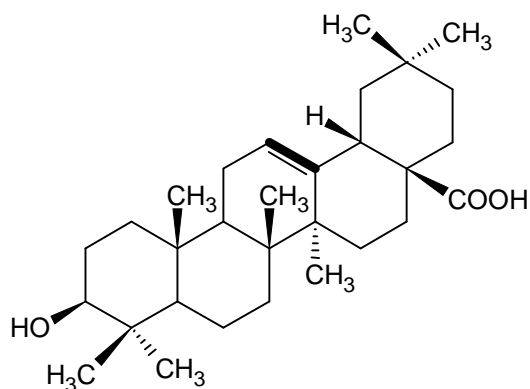
Harpullia cupanioides⁽¹³⁾ foi selecionada para estudo por suas saponinas apresentaram atividade hemolítica alta. Este estudo resultou no isolamento de cinco saponinas que possuem como aglicona o 22-O-angeloil-A1-barrigenol (2).



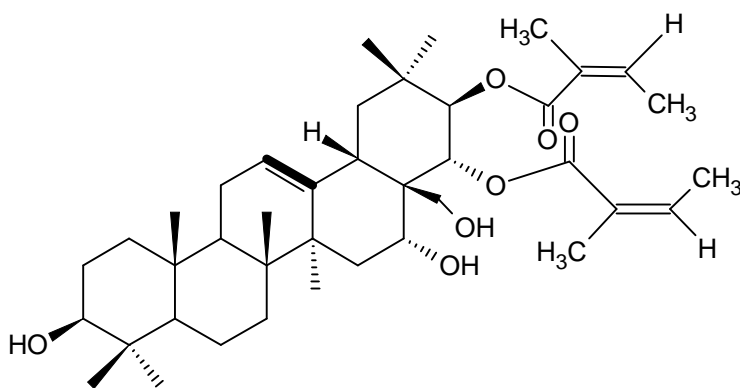
(2)

As saponinas isoladas de *Pometia ridleyi*⁽¹⁴⁾ e *Harpullia austro-caledonica*⁽¹⁵⁾ também apresentaram atividade hemolítica. As saponinas de *P. ridleyi*, que

possuem o ácido oleanóico (**3**) como aglicona, causaram 50% de hemólise em solução de 10% de eritrócitos a uma concentração de 23 $\mu\text{g/ml}$. A atividade hemolítica para a mistura de saponinas de *H. austro-caledonica* foi de 100% para uma suspensão de 10% de eritrócitos a uma concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$. A aglicona destas saponinas é o 22 α -di-O-angeloilbarringtogenol (**4**).



(3)

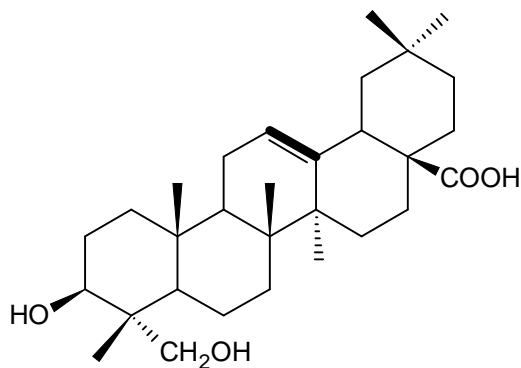


(4)

O estudo da espécie *Serjania salzmanniana* ⁽¹⁶⁾ levou ao isolamento de saponinas monodesmosídicas que possuem como aglicona a gipsogenina,

hederagenina (5) ou o ácido oleanóico (3). Todas estas saponinas causaram morte de 70-100% a 10 ppm para *Biomphalaria alexandrina*, vetor do *Schistosoma mansoni* no Vale do Nilo.

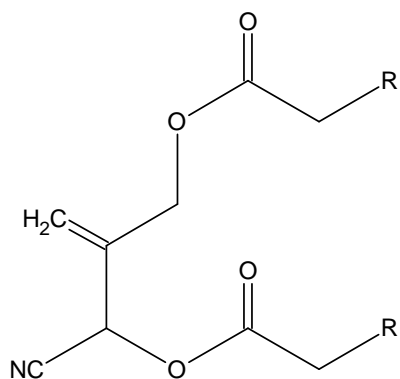
Extratos de *Sapindus mukorossi* ⁽¹²⁾ mostraram efeitos moluscidas frente *Pomacea canaliculata* Lamark, caracol dourado usado em aquários que se tornou uma praga em países Asiáticos, com valores de LC₅₀ de 85, 22 e 17 ppm após contato por 24, 48 e 72 h com a solução. O estudo químico resultou no isolamento de saponinas monodesmosídicas que possuem como aglicona a hederagenina (5).



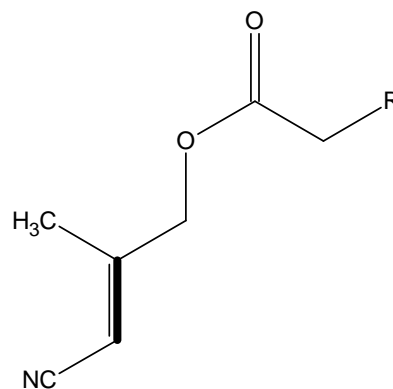
(5)

As sementes de muitas espécies de Sapindaceae são ricas em óleos que contêm acilgliceróis e uma classe incomum de lipídios de plantas, os cianolipídios, que são derivados do aminoácido leucina ⁽¹⁷⁾. Quatro tipos de estruturas de cianolipídios têm sido reportados em plantas desta família, 1-ciano-2-hidroxi-3-metilprop-2-en-1-ol-diéster (6); 1-ciano-2-metilprop-1-en-3-ol-éster (7); 1-ciano-2-hidroxi-3-metilprop-1-en-3-ol-diéster (8); 1-ciano-2-metil-prop-2-en-1-éster

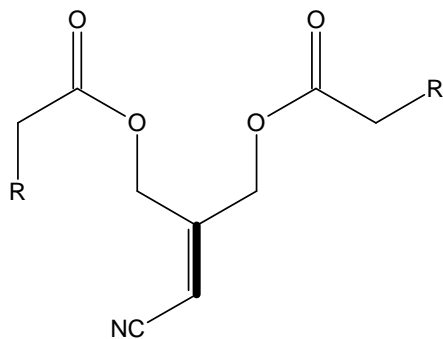
(9); com um ou dois ácidos graxos esterificados, mono ou dihidroxinitrila respectivamente. Os cianolipídios dos tipos I e IV são cianogênicos.



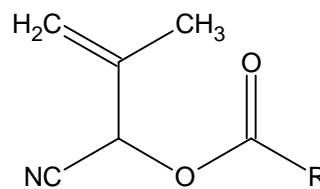
(6)



(7)



(8)



(9)

Propriedades como repelente para insetos e atividade inseticida foram descritas para alguns óleos extraídos de sementes de Sapindaceas ⁽¹⁸⁾. Estudos composicionais realizados com lipídios isolados têm mostrado que são caracterizados grande parte do ácido graxo eicosanóico (20:0) e eicosenóico (20:1).

O estudo sobre a composição química do óleo extraído das sementes de *Paullinia cupana var. sorbilis* (Mart.) Ducke ⁽¹⁹⁾ mostrou que 3% do óleo extraído é

composto por cianolipídios e 28% de acilgliceróis. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C indicaram que o cianolipídio do tipo I está presente no óleo de *P. cupana*. Análise por CG e CG-EM mostraram que os ácidos graxos *cis*-11-octadecanóico (ácido *cis*-vaccênico) e *cis*-11-eicosenóico foram os principais grupos de ácidos graxos (30,4 e 38,7%) esterificados no cianolipídio.

1.2.1. *Serjania glabrata* kunth

Serjania glabrata kunth é encontrada na planície de inundação do Alto Rio Paraná, cujas espécies vegetais estão sendo catalogadas e estudadas em conjunto com grupo de pesquisa Nupélia/UEM.

Posição taxonômica de *Serjania glabrata* Kunth no reino vegetal, segundo Cronquist⁽²⁰⁾

Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Rosidae
Ordem: Sapindales
Família: Sapindaceae
Gênero: *Serjania*
Espécie: *S. glabrata*

Pertence à tribo *Paullinieae* Kunth e subtribo *Eupallinieae* Radlk ⁽²¹⁾ É conhecida como silvestre ⁽²²⁾ e venenosa ⁽²³⁾. É uma trepadeira e sua semente, chamada de sementes aladas, possuem folhas modificadas que permitem sua disseminação pelo vento, como mostra a Figura 1.



Figura 1: Detalhe das sementes de *Serjania glabrata* Kunth (Sapindaceae)

1.4. Atividade Moluscicida e Esquistossomose

Esquistossomose é uma doença parasitária causada por diferentes espécies de *Schistosoma*, por exemplo, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*. Cada espécie tem aumento crônico nas manifestações clínicas tanto urinárias (*S. haematobium*) quanto intestinais ⁽²⁴⁾.

Os humanos são os hospedeiros primários dos trematóides de *Schistosoma*, cujos ovos são eliminados através das fezes humanas (*S. mansoni* e outros) ou pela urina (*S. haematobium*). Se os ovos entrarem em contato com água limpa, podem eclodir e liberar o miracídio, larva que penetra em certos animais aquáticos, como anfíbios ou moluscos (caramujo) (ex.: *Biomphalaria spp.*, *Bulinus. spp*, *Oncomelania spp.*) usando-os como hospedeiros intermediários ⁽²⁴⁾.

Após a fase de multiplicação no hospedeiro intermediário, um grande número de cercárias nadadoras deixa o hospedeiro e penetram na pele humana que está em contato com a água. A cercária invasora desenvolve-se até a forma adulta no corpo humano e o ciclo de vida do parasita recomeça (Figura 2).

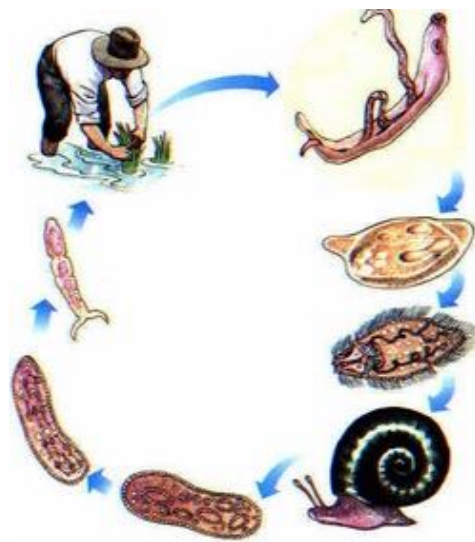


Figura 2: Ciclo da esquistossomose.

O tratamento de indivíduos infectados é realizado com drogas anti esquistossoma, como praziquantel e oxamniquina. O controle do caramujo com

agentes moluscidas tem sido um método e uma escolha para reduzir o risco da transmissão da esquistossomose em áreas endêmicas. ⁽²⁴⁾

Niclosamida é o único agente moluscida disponível e recomendado pela OMS para uso em larga escala em programas de controle da esquistossomose. Vem sendo usada há mais de 40 anos e tem se mostrado mais seletiva e menos danosa para a saúde humana que outros agentes moluscidas inorgânicos ou sintéticos, como os sais de cobre, sódio pentaclorofenato e compostos orgânicos (óxido de tributiltin). ⁽²⁴⁾

Entretanto, o custo envolvido no tratamento com niclosamida dos locais de transmissão tem sido proibido por muitos países em desenvolvimento onde a esquistossomose é endêmica. Portanto, há interesse de se encontrar plantas moluscidas que possam ser uma alternativa barata e localmente mais viável do que os produtos sintéticos usados para o controle dos caramujos ⁽²⁵⁾.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde ⁽²⁶⁾ (OMS), existem cerca de 200 milhões de pessoas com esquistossomose no mundo, 10% delas sujeitas a morrerem devido à doença, e aproximadamente 650 milhões de habitantes em áreas que a doença é endêmica.

No Brasil, onde a esquistossomose é encontrada em todas as regiões geográficas e em pelo menos 19 Unidades Federadas, segundo estimativas, há em torno de 2,5 milhões de portadores da doença e cerca de 25 milhões de pessoas expostas ao risco de contraí-la. A esquistossomose mansônica é uma endemia importante transmitida pelo *Schistosoma mansoni*, um trematódeo que tem como hospedeiros intermediários os caramujos do gênero *Biomphalaria*.

O hospedeiro intermediário mais importante em nosso país é a espécie *Biomphalaria glabrata* (Figura 3). Algumas drogas sintéticas são utilizadas no tratamento terapêutico ou no controle dos caramujos transmissores da doença. Entretanto, devido aos altos custos, aos prejuízos ambientais, à degradação lenta da maioria dos agentes sintéticos empregados, além da resistência dos caramujos transmissores frente a alguns destes agentes, torna-se necessário avaliação de métodos alternativos para controle da transmissão e cura da doença ⁽²⁷⁾.



Figura 3: Foto de *Biomphalaria glabrata*.

Desde a descoberta do grande potencial moluscicida ⁽²⁸⁾ das saponinas da planta *Phytolacca dodecandra* L'Herit (Phytolaccaceae), o estudo de saponinas aumentou. Muitas saponinas e extratos de plantas, muitas delas da família Sapindaceae, têm tido seus potenciais moluscicidas avaliados.

1.5. Teste de toxicidade frente Artemia salina

Compostos bioativos geralmente são tóxicos em altas doses. Para tanto, testes *in vivo* em organismos zologicamente simples podem ser usados para um rápido e simples monitoramento de frações e extratos de plantas biologicamente ativas.

Camarões de água (Figura 4) salgada têm sido utilizados em vários sistemas de bioensaios ⁽²⁹⁾. Algumas destas aplicações têm sido utilizadas para análises de resíduos de pesticidas, micotoxinas, poluentes, anestésicos, compostos do tipo morfina, entre outros. Estes organismos podem ser usados para monitoramento de detecção e isolamento de compostos bioativos de plantas, os quais podem apresentar-se tóxicos para estes organismos.



Figura 4: *Artemia salina* na fase adulta e em forma de náupilo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. *Materiais e métodos*

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um equipamento CG/EM SHIMADZU a 70 eV, modelo QP 2000A, com sonda para sólidos.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB e MERCURY plus BB ambos operando a 300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano TMS (δ 0,0 ppm). Os solventes deuterados utilizados foram CDCl_3 , D_2O foram ISOTEC ou Aldrich.

A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio de dados espectroscópicos de correlações bidimensionais como COSY 45, HMQC e HMBC e da técnica DEPT, onde CH_3 apresenta sinal positivo no espectro de DEPT 135° , CH sinal positivo tanto no DEPT 135° quanto no DEPT 90° , CH_2 sinal negativo no DEPT 135° e C não ligado a hidrogênio não apresenta sinal em nenhum dos dois espectros DEPT.

As cromatografias em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando sílica gel (0,063 – 0,020 mm) da Merk e sílica flash (0,035-0,070 mm). As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material empregado. Para acompanhamento da cromatografia em coluna utilizou-se cromatografia em camada delgada analítica.

As eluições foram feitas com solventes orgânicos puros ou combinadas em ordem crescentes de polaridade sendo as frações obtidas concentradas em evaporador rotativo.

As placas para cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada preparativa foram feitas utilizando-se sílica gel GF 254 (Fluka), suspensa em água destilada e distribuída em camada de 0,3 mm e 0,8 mm de espessura sobre as placas de vidro de 20 por 5 e 20 por 20 cm, respectivamente.

A visualização dos compostos em CCD utilizou-se irradiação com luz ultravioleta a 254 e 366 nm, pulverização $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) ou ácido acético / H_2SO_4 / anisaldeído (revelador específico para terpenos), seguido de aquecimento em chapa.

Na avaliação da toxicidade com *Artemia salina* foi utilizada solução de água marinha (3,8 g de NaCl para cada litro de água), ovos do microcrustáceo (*Artemia salina*) adquiridos em uma loja de aquários local e um recipiente plástico, com dois compartimentos onde um deles se encontrava ao abrigo da luz que foi desenvolvido no próprio laboratório.

Para a avaliação da atividade moluscicida foram utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, e DMSO utilizado na solubilização das amostras a serem testadas.

3.2. Preparação dos extratos e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal *Serjania glabrata kunth* (Sapindaceae)

3.2.1. Coleta e secagem da planta

A espécie vegetal *Serjania glabrata* Kunth (Sapindaceae) foi coletada no dia 04 de abril de 2004, às margens do Rio São Pedro, no município de Porto Rico-Pr.

A identificação da espécie foi realizada pela professora Dra. Maria Conceição e uma exicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá – HEUM, sob registro n° 13.481.

O material coletado foi separado em folhas, galhos e sementes, seco em forno de ar circulante a 35 °C e moído em moinho de facas rendendo 456 g de folhas, 832 g de galhos e 218 g de sementes. Os extratos foram obtidos através de maceração por 24 horas à temperatura ambiente e percolação até total descoloração do líquido coletado. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e liofilizados. Através da Figura 5 podemos ter uma visão geral da obtenção dos extratos e das avaliações das atividades biológicas realizadas nas diferentes partes da planta.

Na tabela 1 estão descritos a relação de massa obtida na coleta das diferentes partes da planta, assim como seus extratos e códigos.

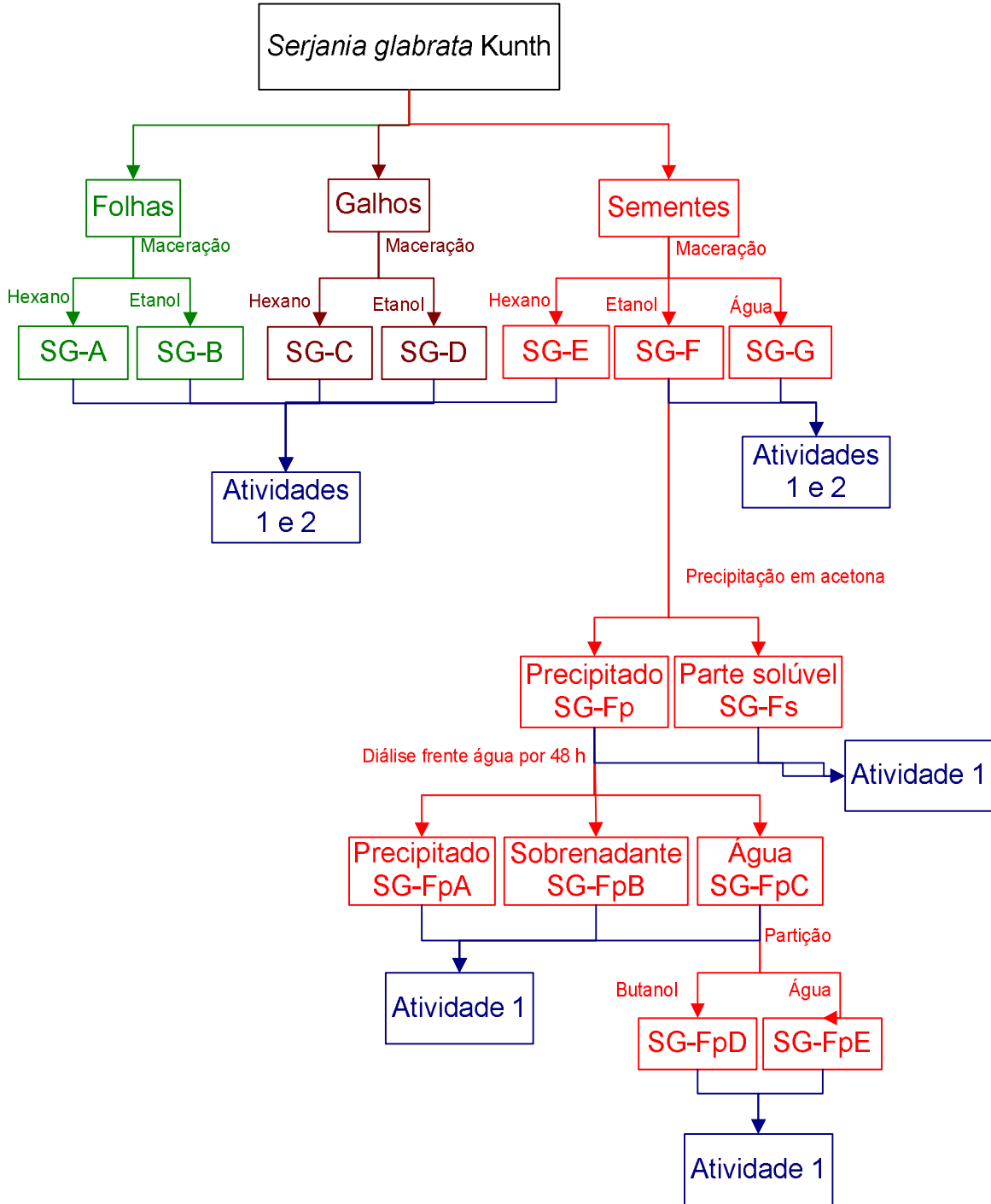


Figura 5: Procedimento empregado para obtenção dos extratos das folhas (---), galhos (---) das sementes (---) e atividades realizadas (---): 1- Toxicidade com *Artemia salina* e 2- Atividade moluscicida.

Tabela 1: Relação da coleta das diferentes partes da planta e dos extratos obtidos.

Parte da Planta	Massa da planta seca e moída (g)	Extratos	Massa do extrato (g)	Código do extrato
Folhas	456	Hexânico	27,38	SG-A
		Etanólico	89,13	SG-B
Galhos	832	Hexânico	10,18	SG-C
		Etanólico	29,61	SG-D
Sementes	218	Hexânico	11,89	SG-E
		Etanólico	30,73	SG-F
		Aquoso	24,66	SG-G
		Precipitado	4,30	SG-Fp
		Sobrenadante	13,30	SG-Fs
		Precipitado diálise	0,20	SG-FpA
		Sobrenadante diálise	0,24	SG-FpB
		Fração ButOH	0,87	SG-FpD
		Fração aquosa	6,43	SG-FpE

3.2.2. Teste de mortalidade de *Artemia salina*

Os ovos de camarão, *Artemia salina* foram adquiridos em uma loja de aquários local. A água marinha utilizada para o cultivo foi feita utilizando-se 3,8 g de sal marinho para cada litro de água conforme descrito pela literatura ⁽²⁹⁾.

Os ovos de *A. salina* foram eclodidos em um aquário oval montado no laboratório utilizando-se água marinha artificial previamente preparada. O aquário foi construído com uma divisão interna contendo vários orifícios, produzindo dois compartimentos de mesmo tamanho. Os ovos foram colocados no compartimento previamente escurecido. O outro compartimento foi iluminado, de modo a atrair os camarões para este compartimento após eclosão, através de fototropismo. Os ovos foram incubados durante 48 horas em temperatura ambiente. O procedimento descrito anteriormente está ilustrado na Figura 6.

Os extratos foram solubilizados em água marinha a concentrações que variaram entre 1000 a 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$). Quando necessário, até 5 μL de DMSO foi adicionado à 5 mL de amostra sem que este fosse tóxico para os camarões. Os testes foram realizados em triplicatas para cada diluição e branco, da seguinte forma: no tubo de ensaio foi adicionado 5 mL de solução aquosa da amostra e 10 larvas de *A. salina*.

Após contato de 24 h de *A. salina* com a amostra foram contados os sobreviventes e a porcentagem de mortalidade foi estimada para cada diluição. O mesmo foi feito para o controle ⁽¹⁶⁾. A concentração letal de 50% (LC_{50}) foi

calculada através do gráfico de log da concentração da solução dos extratos *versus* a média da porcentagem de mortalidade.



Figura 6: Materiais usados no laboratório de Produtos Naturais para a realização do ensaio de mortalidade de *Artemia salina*.

3.2.3. Teste de atividade moluscicida

O teste de atividade moluscicida consiste basicamente na imersão total do caramujo *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose, na solução da amostra a ser testada.

Foi realizado teste preliminar a 400 ppm com os seguintes extratos: SG-A, SG-B, SG-C, SG-D, SG-E, SG-F e SG-G. Confirmada a atividade nesta concentração a mesma foi reduzida até obtenção da LC₅₀.

Para tanto, 80 mg de cada extrato foram solubilizados em 400 µL de DMSO juntamente com 200 mL de água do aquário. Quatro caramujos jovens da espécie

Biomphalaria glabrata (aproximadamente 3 meses), sadios, criados em aquário e alimentados com alface, foram colocados em contato com a solução teste por 24 h.

Após este período, os caramujos foram analisados e colocados por mais 24 h em contato com água destilada, para a confirmação da morte. A Figura 7 mostra uma visão geral de como o teste moluscicida foi realizado.

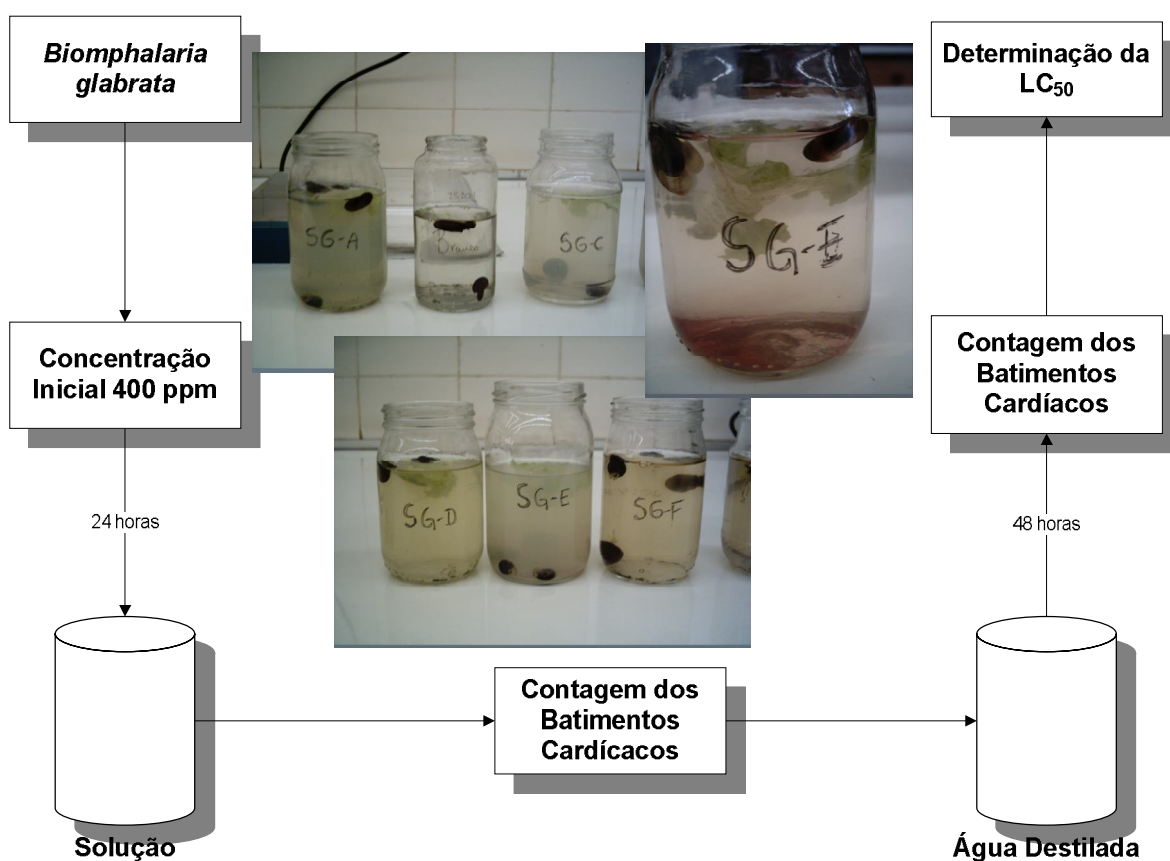


Figura 7: Esquema para teste de atividade moluscicida frente ao caramujo

Biomphalaria glabrata.

3.2. Estudo Fitoquímico

Foi traçado o perfil cromatográfico para todos os extratos de *S. glabrata*. Devido à semelhança de alguns extratos, priorizaram-se estudar os extratos com maior massa e menos complexos.

3.2.1. Estudo das Folhas

A Figura 8 mostra uma visão geral do procedimento empregado no isolamento das substâncias das folhas de *Serjania glabrata* Kunth.

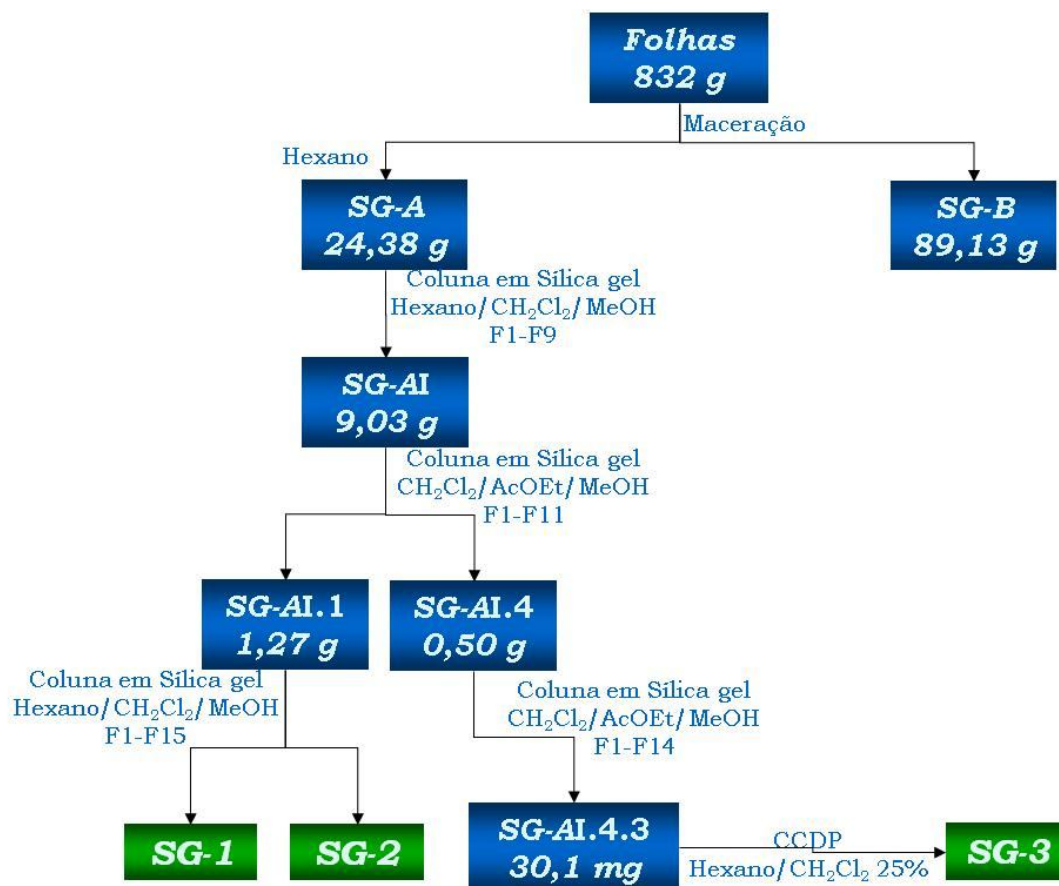


Figura 8: Procedimentos empregados no isolamento dos constituintes químicos da planta *Serjania glabrata* Kunth

3.2.1.1. Fracionamento do extrato hexânico das folhas e Isolamento das substâncias SG-1 e SG-2

Realizou-se uma coluna filtrante com 27 g do extrato hexânico SG-A adsorvendo-o em 50 g de sílica gel 60 e fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 5,5$ cm; 100,0 g de sílica gel 60). Foram utilizados os seguintes eluentes:

diclorometano como eluente de empacotamento, misturas de diclorometano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas nove frações de 500 mL de acordo com a polaridade do eluente utilizado, conforme descrito na Tabela 02.

Tabela 2: Dados do fracionamento da fração SG-A por coluna cromatográfica.

Eluente Utilizado	Código das frações	Massa das frações
CH ₂ Cl ₂	SG-A.I	9,03 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 5%	SG-A.II	6,23 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 10%	SG-A.III	2,41 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 20%	SG-A.IV	1,74 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 30%	SG-A.V	1,40 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	SG-A.VI	1,77 g
AcOEt	SG-A. VII	1,11 g
AcOEt/ MeOH 50%	SG-A.VIII	0,87 g
MeOH	SG-A.IX	1,01 g

* Massa recuperada: 93,5%

A fração SG-A.I apresentava boa quantidade de massa e poucas manchas em CCD. Foi então submetida a fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30 g de sílica gel 60) utilizando-se diclorometano como eluente de empacotamento, misturas de diclorometano/ acetato de etila em ordem crescente de polaridade. A coluna foi lavada com metanol. Foram coletadas 68 frações de 20

mL cada. Após obtenção das frações, estas foram reunidas por semelhança em CCD conforme descrito na Tabela 03.

A fração SG-A.I.1 foi recromatografada em coluna de sílica gel ($\phi = 2,5$ cm; 30 g de sílica gel 60) utilizando-se hexano como eluente de empacotamento, misturas de hexano/ diclorometano em ordem crescente de polaridade. A coluna foi lavada com metanol. Foram coletadas 143 frações de 20 mL cada. Após obtenção das frações, estas foram reunidas por semelhança em CCD, conforme descrito na Tabela 04.

Tabela 3: Massas e códigos das frações reunidas da CC de SG-AI.

Eluente	Código das frações	Massa das frações
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.1	1,27 g
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.2	2,74 g
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.3	1,62 g
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.4	0,50 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1%	SG-AI.5	0,73 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 5%	SG-AI.6	0,20 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 10%	SG-AI.7	0,06 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 20%	SG-AI.8	0,17 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	SG-AI.9	0,16 g
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	SG-AI.10	1,34 g
AcOEt	SG-AI.11	0,25 g

Tabela 4: Códigos e massas das frações reunidas da CC de SG-AI.1.

Eluente	Código das frações	Massa das frações
Hexano	SG-AI.1.1	126,7 mg
Hexano	SG-AI.1.2	25,1 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 5%	SG-AI.1.3	7,5 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 5%	SG-AI.1.4	105,2 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 10%	SG-AI.1.5	2,6 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 10%	SG-AI.1.6	52,9 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 15%	SG-AI.1.7	8,2 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 20%	SG-AI.1.8	82,8 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 30%	SG-AI.1.9	97,2 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 30%	SG-AI.1.10	204,4 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 30%	SG-AI.1.11	78,7 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 50%	SG-AI.1.12	70,2 mg
Hex/ CH ₂ Cl ₂ 50%	SG-AI.1.13	14,3 mg
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.1.14	35,0 mg
MeOH	SG-AI.1.15	37,4 mg

Após evaporação do solvente da fração SG-A.I.1.1 houve a formação de um pó branco que apresentava estar pura em CCD. Esta fração foi codificada como SG-1.

Após evaporação do solvente da fração SG-A.I.1.3 houve a formação de um óleo amarelo que apresentava apenas uma mancha em CCD. Esta fração foi codificada como SG-2.

A fração SG-A.I.4 eluída $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 20% em apresentava poucas manchas em CCD e boa massa. Esta fração foi selecionada para estudo.

A fração SG-AI.6 foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica em sílica gel. As frações obtidas foram reunidas conforme semelhança em CCD. Porém devido à complexidade das frações e a baixa quantidade de massa obtida não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

3.2.1.2. Estudo da fração SG-A.I.4 e Isolamento da substância SG-3

SG-AI.4 (500 mg) foi adsorvida em 1,5 g de sílica gel e em seguida foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30 g de sílica gel 60). Foram utilizados os seguintes eluentes: hexano/ diclorometano 1:1 como eluente de empacotamento, misturas de hexano/ diclorometano/ acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. A coluna foi lavada com metanol. Foram coletadas 157 frações de 20 mL cada.

Todas as frações foram submetidas à análise em CCD e reunidas conforme semelhança. As massas e códigos das frações obtidas estão descritos na Tabela 05.

As frações SG-AI.4.3 (30,1 mg) e SG-AI.4.4 (53,2 mg) apresentavam bom perfil cromatográfico com poucas manchas em CCD e boa massa. Foram então submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em hexano/ diclorometano 25%.

De SG-AI.4.3 foi isolado um composto em forma de cristais brancos codificado de SG-3 (5,0 mg). As frações obtidas de SG-AI.4.4 apresentaram complexidade e pouca massa, não sendo possível o isolamento de nenhuma substância pura.

Tabela 5: Massas e códigos das frações reunidas da CC SG-AI.4.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações
Hex./ CH ₂ Cl ₂ 1:1	SG-AI.4.1	7,3 mg
Hex./ CH ₂ Cl ₂ 1:1	SG-AI.4.2	3,1 mg
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.4.3	30,1 mg
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.4.4	53,2 mg
CH ₂ Cl ₂	SG-AI.4.5	77,9 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1%	SG-AI.4.6	2028,7 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1%	SG-AI.4.7	39,8 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 3%	SG-AI.4.8	21,4 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 5%	SG-AI.4.9	15,7 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 10%	SG-AI.4.10	33,3 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 20%	SG-AI.4.11	17,3 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 30%	SG-AI.4.12	22,0 mg
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%	SG-AI.4.13	36,0 mg
MeOH	SG-AI.4.14	37,6 mg

3.2.2. Estudo dos Galhos

3.2.2.1. Fracionamento do extrato etanólico dos galhos e Isolamento de SG-4

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos dos galhos mostrou o extrato etanólico com menor complexidade e maior quantidade de massa. A Figura 9 mostra o procedimento utilizado para o isolamento da substância SG-4.

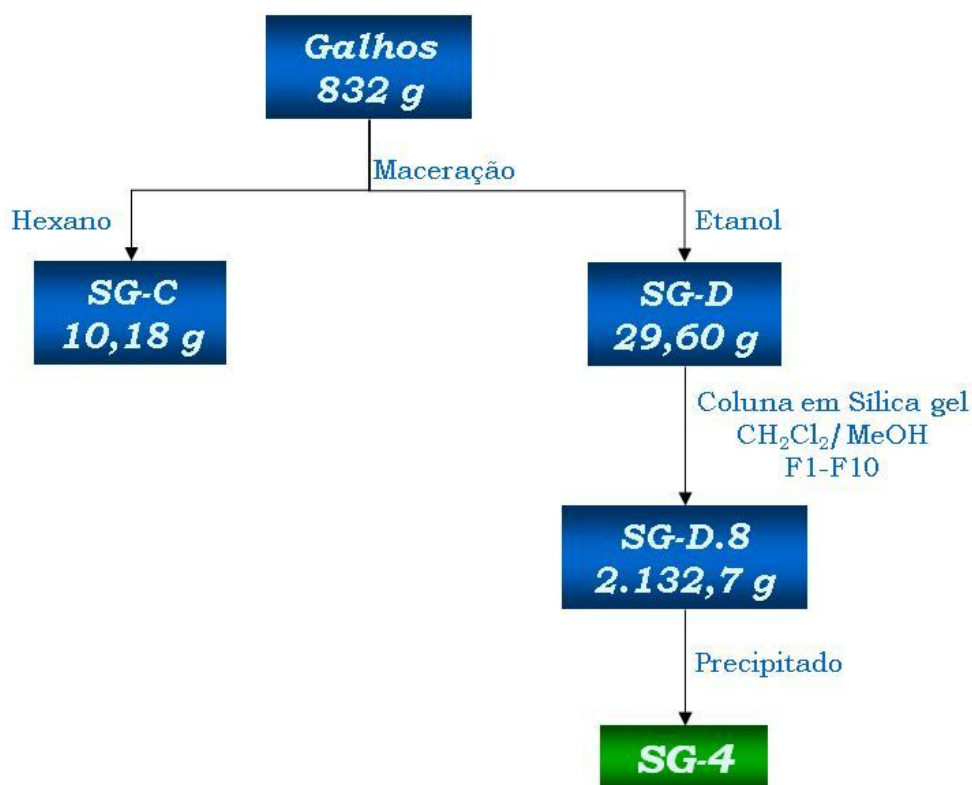


Figura 9: Procedimento empregado no isolamento dos constituintes químicos dos galhos da planta *Serjania glabrata* Kunth.

O extrato etanólico SG-D (5,66 g) foi adsorvido em 10,0 g de sílica gel e em seguida foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30,0 g de sílica gel 60). Foram utilizados os seguintes eluentes: diclorometano como eluente de empacotamento, misturas de diclorometano/ metanol em ordem crescente de polaridade. A coluna foi lavada com metanol. Foram coletadas 141 frações de 20 mL cada, como descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Eluentes utilizados e frações obtidas na coluna cromatográfica realizada com de SG-D.

Eluente utilizado	Frações
Diclorometano	1-17
Diclorometano/ Metanol 3%	18-40
Diclorometano/ Metanol 5%	41-61
Diclorometano/ Metanol 10%	62-81
Diclorometano/ Metanol 20%	82-100
Diclorometano/ Metanol 30%	101-121
Diclorometano/ Metanol 50%	122-141
Metanol	Balão

Todas as frações coletadas foram submetidas à análise por CCD e reunidas conforme semelhança, como descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Dados do fracionamento da fração SG-D por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Código das frações	Massa das frações
1-13	SG-D.1	18,8mg
14-29	SG-D.2	13,6mg
30-47	SG-D.3	326,6mg
48-55	SG-D.4	156,3mg
56-80	SG-D.5	417,7mg
81-86	SG-D.6	186,7mg
87-105	SG-D.7	670,8mg
106-131	SG-D.8	2132,7mg
132-141	SG-D.9	861,9mg
MeOH	SG-D.10	288,7mg

*Massa recuperada: 89,2%.

Após evaporação do solvente da fração SG-D.8, foi separado um precipitado branco, em forma de agulhas, que apresentava estar puro em CCD e revelada com H₂SO₄/ MeOH. Esta substância foi codificada como SG-4.

A fração SG-D.7 apresentava em perfil cromatográfico quatro faixas, duas com fluorescência. Foi então submetida à sucessivas CCDP's, porém as frações obtidas apresentaram baixa quantidade de massa e grande complexidade.

3.2.2.2. Partição do extrato etanólico dos galhos

Parte do extrato etanólico SG-D (28,5 g) foi solubilizado em MeOH/ H₂O 1:2 (v/v) e submetido à partição em diferentes solventes (ver procedimento Figura 09). A partir desse fracionamento foram obtidas as seguintes frações: hexânica (SG-EG-H), diclorometânica (SG-EG-D – 5,11 g), acetato de etila (SG-EG-A) e butanólica (SG-EG-B).

A fração SG-EG-D foi submetida à coluna cromatográfica em sílica gel, segundo procedimento descrito na Figura 9. A fração obtida SG-EG-D.1 (1,0 g) foi solubilizada em 30 mL da mistura diclorometano/ MeOH/ H₂O 6:3:1 (v/v) e submetida à partição contracorrente. A partir desse procedimento obteve-se a fração diclorometânica SG-EG-D.1-D (72,1 mg).

A fração diclorometânica foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica em sílica flash. Devido complexidade das frações, assim como a baixa quantidade de massa não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

As frações SG-EG-H, SG-EG-A e SG-EG-B não foram estudadas quimicamente. A fração aquosa foi descartada.

3.2.3. Estudo das Sementes

3.2.3.1. Fracionamento de SG-E

Foi traçado o perfil cromatográfico dos extratos obtidos das sementes de *Serjania glabrata* Kunth. Os extratos hexânico e etanólico foram selecionados para estudo por apresentarem substâncias com *r_f*'s maiores. O extrato aquoso não foi estudado.

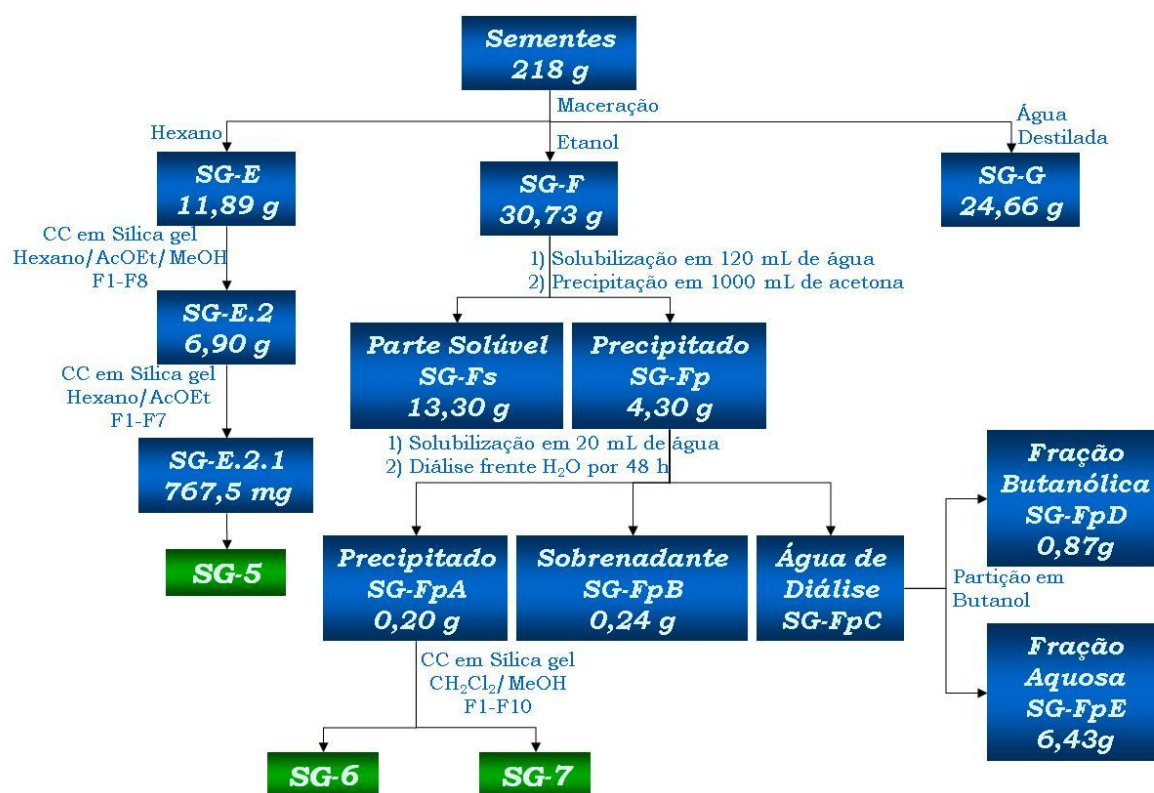


Figura 10: Procedimentos empregados no isolamento dos constituintes químicos das sementes da planta *Serjania glabrata* Kunth

O extrato hexânico SG-E (11 g) foi adsorvido em 20,0 g de sílica gel e submetido a fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 5,0$ cm; 70,0 g de sílica gel 60). Foram utilizados os seguintes eluentes: hexano como eluente de empacotamento, misturas de hexano/ acetato de etila em ordem crescente de polaridade como eluente. A coluna foi lavada com metanol. Foram coletadas 8 frações de 600 mL cada e concentradas em evaporador rotativo, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8: Dados do fracionamento do extrato SG-E por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Código das frações	Massa das frações
Hexano	SG-E.1	1,76 g
Hex/ AcOEt 5%	SG-E.2	6,90 g
Hex/ AcOEt 10%	SG-E.3	1,97 g
Hex/ AcOEt 20%	SG-E.4	0,65 g
Hex/ AcOEt 30%	SG-E.5	0,38 g
Hex/ AcOEt 50%	SG-E.6	0,57 g
Acetato de Etila	SG-E.7	0,63 g
Metanol	SG-E.8	0,55 g

*Massa recuperada: 98%

As frações SG-E.1 e SG-E.2 apresentavam em CCD perfil cromatográfico semelhante, com manchas de fácil isolamento e r_f 's diferentes quando reveladas com H_2SO_4 . Somente a segunda fração foi selecionada para estudo devido sua maior massa e estar mais pura.

SG-E.2 (6,90 g) foi adsorvida em 12 g de sílica gel e submetida a fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30,0 g de sílica gel 60). Foram utilizados como eluentes: hexano como eluente de empacotamento e misturas de hexano/ acetato de etila em ordem crescente de polaridade como descrito na Tabela 9. Foram coletados 94 frações de 20 mL.

Tabela 9: Dados do fracionamento cromatográfico da fração SG-E.2.

Eluente utilizado	Frações
Hexano	1-14
Hexano/ Acetato de etila 3%	15-24
Hexano/ Acetato de etila 5%	25-34
Hexano/ Acetato de etila 10%	35-45
Hexano/ Acetato de etila 15%	46-55
Hexano/ Acetato de etila 20%	56-65
Hexano/ Acetato de etila 30%	66-75
Hexano/ Acetato de etila 50%	76-85
Acetato de etila	86-94

Todas as frações foram submetidas à CCD e reunidas conforme Tabela 10. A fração SG-E.2.1 eluída em Hexano/ AcOEt 3%, um óleo verde claro pouco viscoso, apresentava apenas uma mancha em CCD quando revelado com H₂SO₄/ MeOH. Esta substância foi codificada como SG-5.

Tabela 10: Códigos e massas das frações reunidas da CC de SG-E.2.

Frações reunidas	Códigos das frações	Massa das frações
1-21	SG-E.2.1	767,5 mg
22-28	SG-E.2.2	4993,6 mg
29-36	SG-E.2.3	353,8 mg
37-47	SG-E.2.4	157,7 mg
48-65	SG-E.2.5	89,0 mg
66-83	SG-E.2.6	53,0 mg
84-94	SG-E.2.7	28,0 mg

*Massa recuperada: 89,2%.

3.2.3.2. Precipitação de saponinas do extrato etanólico SG-F

O extrato etanólico SG-F (26,91 g) foi solubilizado em 120 mL de metanol e adicionado a um frasco contendo 1000 mL de acetona, gerando um precipitado de cor branca (SG-Fp) de 4,31 g (16%). Este precipitado foi solubilizado em 20 mL de água e dialisado, gerando um precipitado (SG-FpA) de 0,21 g (ver Figura 11), um sobrenadante (SG-FpB) de 0,25 g e a água de diálise. O celofane utilizado como membrana foi do tipo comercial, sem especificação do tamanho dos poros. Por este motivo, foi realizado partição em n-butanol com a água de diálise para a recuperação de saponinas que eventualmente tivessem passado para esta fase. Ver procedimento Figura 11.



(a)

(b)

Figura 11: Fotos da diálise realizada com o precipitado do extrato etanólico das sementes de *Serjania glabrata* Kunth. (a) logo após o sistema ter sido montado; (b) após 24 h de diálise frente água destilada.

O precipitado SG-FpA apresentou perfil cromatográfico com poucas manchas e boa massa, sendo selecionado para estudo. SG-FpA (1,0 g) foi adsorvido em 2,0 g de sílica gel 60 e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ($\phi = 2,5$ cm; 30,0 g de sílica gel 60). Foram utilizados os seguintes eluentes: diclorometano como eluente de empacotamento, mistura de diclorometano/ metanol; metanol/ água em ordem crescente de polaridade, e em seguida a coluna foi lavada com água. Foram coletadas 87 frações de 20 mL cada, como descrito na Tabela 11.

Tabela 11: Dados da coluna cromatográfica realizada com o precipitado SG-FpA.

Eluente utilizado	Frações
Diclorometano	1-11
Diclorometano/ Metanol 5%	12-27
Diclorometano/ Metanol 10%	28-38
Diclorometano/ Metanol 20%	39-44
Diclorometano/ Metanol 30%	45-70
Diclorometano/ Metanol 50%	71-81
Metanol	82-86
Metanol/ Água 1:1	92-86
Água	87

Todas as frações obtidas foram analisadas em CCD e reunidas conforme semelhança. Os códigos e massas obtidas estão descritos na Tabela 12.

As frações SG-FpA.3 (7,8 mg) e SG-FpA.6 (9,3 mg), eluídas com diclorometano/ metanol 5% e 30% respectivamente, apresentavam-se em forma de cristais brancos. Em análise em CCD apresentavam apenas uma mancha quando revelada com H₂SO₄/ MeOH. Foram codificadas como SG-6 e SG-7.

Tabela 12: Massas e códigos das frações reunidas da CC de SG-FpA.

Frações reunidas	Códigos das frações	Massa das frações
1-5	SG-FpA.1	14,0 mg
6-14	SG-FpA.2	27,3 mg
15-20	SG-FpA.3	7,8 mg
21-26	SG-FpA.4	6,8 mg
27-42	SG-FpA.5	35,2 mg
43-48	SG-FpA.6	9,3 mg
49-52	SG-FpA.7	6,2 mg
53-60	SG-FpA.8	5,1 mg
60-76	SG-FpA.9	3,2 mg
77-82	SG-FpA.10	5,8 mg

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da toxicidade com Artemia salina

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado conforme descrito na literatura. Através das porcentagens de mortalidade foi calculado o valor de LC_{50} para cada extrato testado.

O teste de toxicidade foi realizado para os extratos das folhas SG-A e SG-B, dos galhos SG-C e SG-D, e das sementes SG-E, SG-F e SG-G, e para as frações da precipitação e diálise de saponinas SG-Fs, SG-FpA, SG-FpB e SG-FpD. Os extratos que apresentaram LC_{50} maior que 1000 ppm foram considerados inativos, sendo que os valores obtidos de LC_{50} estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13: Dados de letalidade de *Artemia salina* para os extratos e frações obtidos da espécie vegetal *Serjania glabrata* kunth (Sapindaceae) (LC₅₀ em µg.mL⁻¹)

1)

Extrato testado	LC ₅₀
SG-A	>1000
SG-B	677,28
SG-C	>1000
SG-D	630,96
SG-E	>1000
SG-F	47,53
SG-G	107,34
SG-Fs	238,19
SG-FpA	642,23
SG-FpB	173,16
SG-FpD	321,88

Dentre os onze extratos testados o extrato etanólico SG-F e aquoso SG-G das sementes apresentaram os melhores valores de toxicidade com *Artemia salina*. os valores estimados de LC₅₀ foram menores, mostrando serem mais ativos. O extrato etanólico das sementes como mais ativo, com valor estimado de LC₅₀ em 47,53 µg.mL⁻¹.

4.1. Caracterização de SG-1

O composto SG-1 foi isolado da fração SG-AI.1.1 na forma de um pó branco.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 1) para SG-1 observa-se um singlete largo em δ_{H} 0,88, integração para 3 hidrogênios; um singlete largo em δ_{H} 1,25, integração para 2 hidrogênios; um multiplete em δ_{H} 5,98, integração para 1 hidrogênio, duplo dubleto em δ_{H} 4,94, integração para 2 hidrogênios e um singlete largo em δ_{H} 1,25 com integração para 40 hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 2) confirma sinais em 139,5 ppm referente à CH de dupla ligação; em 114,3 ppm referente à CH_2 de dupla terminal; 32,2 e 30,0 ppm referentes à CH_2 alifático, 14,4 ppm referente à metila.

O espectro de DEPT (Anexo 3) confirma a presença da metila, assim como de CH_2 e do CH vinílico.

No cromatograma de CG-EM (Figura 12) existem sete picos majoritários, onde o espectro de massas apresenta fragmentação de cadeia carbônica longa, variando de 12 a 18 átomos de carbono.

Na Tabela 14 estão descritos o tempo de retenção, os valores do pico molecular m/z e a provável estrutura.

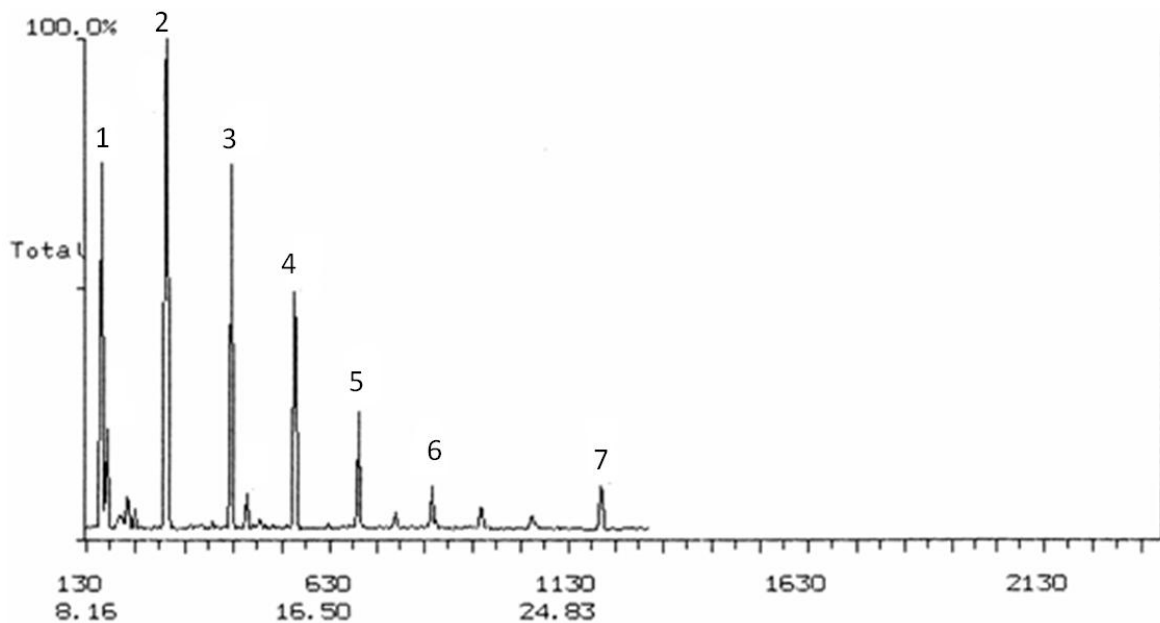


Figura 12: Cromatograma de CG-EM de SG-1.

Tabela 14: Tempo de retenção das substâncias presentes em SG-1 para CG-EM.

Substância	Tempo (min)	m/z	Estrutura provável
1	8,71	168	C ₁₂ H ₂₄
2	10,90	182	C ₁₃ H ₂₆
3	13,13	196	C ₁₄ H ₂₈
4	15,28	210	C ₁₅ H ₃₀
5	17,51	224	C ₁₆ H ₃₂
6	20,11	238	C ₁₇ H ₃₄
7	26,01	252	C ₁₈ H ₃₆

O composto SG-1 foi caracterizado como sendo uma mistura de hidrocarbonetos insaturados de cadeia carbônica variando de 12 a 18 átomos de carbono.

4.2. Caracterização de SG-2

Da fração SG-AI.1.3 foi isolado uma substância, codificada de SG-2 apresentando-se como um óleo de cor amarela. Foram obtidos os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT. Também foi realizado experimento de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas de baixa resolução (CG-MS).

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 4) e de ^{13}C (Anexo 5) de SG-2 foi comparado ao de SG-1 onde se notou a presença dos mesmos sinais. No cromatograma de CG-EM (Figura 13) existem seis picos majoritários, onde o espectro de massas apresenta fragmentação de cadeia carbônica longa, variando de 10 a 20 átomos de carbono.

Na Tabela 15 estão descritos o tempo de retenção, os valores do pico molecular m/z e a provável estrutura.

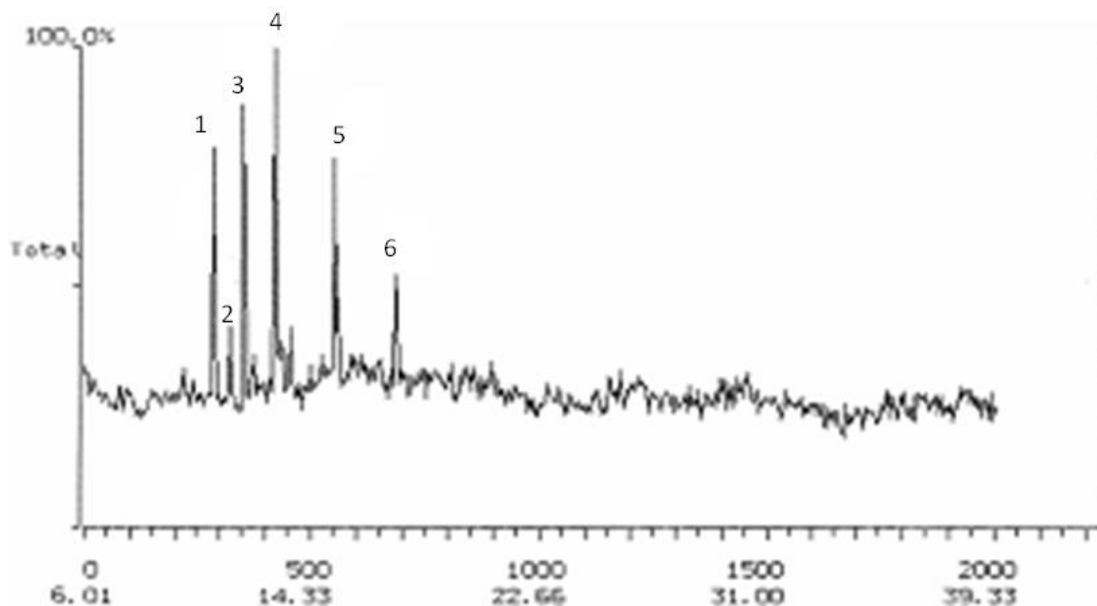


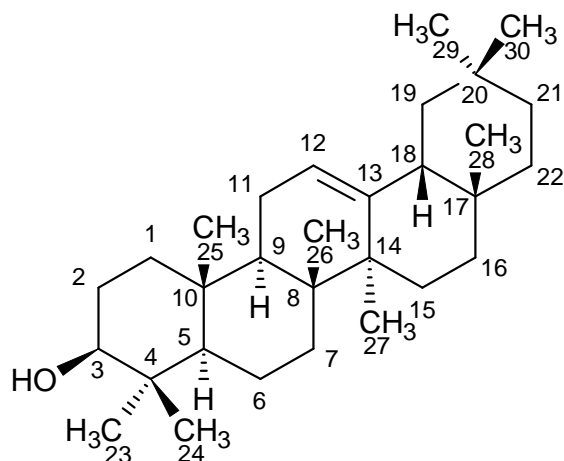
Figura 13: Cromatograma de CG-EM de SG-2.

Tabela 15: Tempo de retenção das substâncias presentes em SG-2 para CG-EM.

Substância	Tempo (min)	m/z	Estrutura provável
1	10,85	140	C ₁₀ H ₂₀
2	11,43	168	C ₁₂ H ₂₄
3	11,91	196	C ₁₄ H ₂₈
4	13,06	224	C ₁₆ H ₃₂
5	15,23	252	C ₁₈ H ₃₆
6	17,45	280	C ₂₀ H ₄₀

A análise destes espectros possibilitou a caracterização deste composto como sendo mistura de hidrocarbonetos insaturados de cadeia carbônica variando de 10 a 20 átomos de carbono.

3.3. Caracterização de SG-3



SG-3 (β-amirina)

Através do espectro de RMN de ¹H (Anexo 6) pode-se observar um dubleto, com integração para um hidrogênio em δ_H 5,63 ($J = 5,7$ Hz) ligado ao carbono metínico em δ_C 112,3 (C-12) (Anexo 7). Esse deslocamento de hidrogênio e carbono são característicos do triterpeno β-amirina.

O deslocamento de carbono em δ_C 141,8 pode ser atribuído ao C-13 e o deslocamento de carbono em δ_C 122,3 ao carbono C-12 da β-amirina.

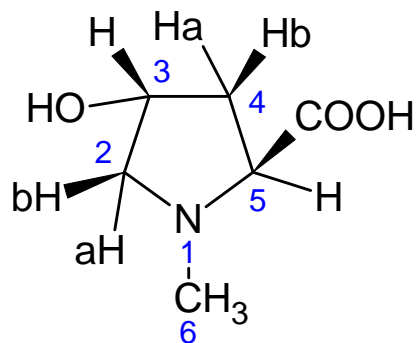
O deslocamento de RMN ¹³C/DEPT (Anexo 8) para o C-3 em δ_C 76,6 (CH) encontrado está em concordância com o valor encontrado na literatura⁽³⁰⁾ (Tabela 16). Através do espectro de HMQC (Anexo 9) atribui-se ao hidrogênio H-3 o sinal em δ_H 3,46 (t).

Os demais sinais de hidrogênio na região de 0,7-2,3 ppm são característicos de triterpenos.

Tabela 16: Dados de deslocamento de carbono para SG-3 em CDCl_3 e comparação com dados da literatura para β -amirina.

C	β -amirina	SG-3	C	β -amirina	SG-3
1	38,7 (CH ₂)	36,2	16	27,0 (CH ₂)	30,5
2	27,3 (CH ₂)	32,2	17	32,5 (C ₀)	33,0
3	79,0 (CH)	76,5	18	47,4 (CH)	43,2
4	38,8 (C ₀)	39,5	19	46,9 (CH ₂)	39,1
5	55,3 (CH)	49,9	20	31,1 (C ₀)	30,3
6	18,5 (CH ₂)	18,4	21	34,8 (CH ₂)	34,8
7	32,8 (CH ₂)	33,3	22	37,2 (CH ₂)	35,2
8	38,8 (C ₀)	38,0	23	28,2 (CH ₃)	32,2
9	47,7 (CH)	47,6	24	15,5 (CH ₃)	16,4
10	37,6 (C ₀)	36,9	25	15,6 (CH ₃)	18,6
11	23,6 (CH ₂)	23,8	26	16,9 (CH ₃)	19,8
12	121,8 (CH)	122,3	27	26,0 (CH ₃)	29,1
13	145,1 (C ₀)	141,8	28	28,4 (CH ₃)	32,6
14	41,8 (C ₀)	41,0	29	33,3 (CH ₃)	34,7
15	26,2 (CH ₂)	28,0	30	23,7 (CH ₃)	25,6

3.4. Caracterização de SG-4



SG-4 (n-metil-*trans*-4-hidroxil-L-prolina)

A substância SG-4 foi isolada da fração SG-D.8 da coluna do extrato etanólico dos galhos, na forma de cristais brancos.

Através dos dados obtidos nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e demais técnicas 2D, chegou-se a uma estrutura pentacíclica, com o nitrogênio como heteroátomo e um grupo carboxílico ligado a um dos carbonos da cadeia. Modelos para esta estrutura foram procurados na literatura e chegou-se ao composto n-metil-*trans*-4-hidroxil-L-prolina^{(17) (18) (31)}, um amino ácido.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 10) pode-se verificar um sinal em δ_{H} 4,03 ($J=10,6$ e $7,5$, dd), integração para 1 hidrogênio, atribuído ao H-2. Sinais em δ_{H} 2,15 ($J= 13,8$, $10,8$ e $4,8$, ddd) e em δ_{H} 2,43 ($J= 13,8$, $7,5$ e $2,1$, ddt), integração total para 2 hidrogênios, atribuídos ao H-3b e H-3a, respectivamente. O sinal em δ_{H} 4,48 ($J= 2,1$, m) foi atribuído ao H-4 pela sua característica de CH-OH. Os sinais em δ_{H} 3,05 ($J= 12,5$ e $2,1$, dt) e em δ_{H} 3,78 ($J= 12,6$ e $4,8$, dd), com

integração total para 2 hidrogênios, foram atribuídos ao H-5a e H-5b, respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (Anexo 11) e DEPT (Anexo 12) verificam-se os sinais em δ_{C} 172,0 para C_0 ; em δ_{C} 72,0 e 71,1 para 2 CH; em δ_{C} 64,3 para CH_2 ; uma metila em δ_{C} 44,1 e um sinal em δ_{C} 40,4 para um CH_2 .

No espectro HMQC (Anexo 13) verifica-se as ligações dos hidrogênios com os carbonos de **SG-4**. Estes dados estão descritos na Tabela 17.

No espectro de COSY (Anexo 14) confirmam-se as correlações para o sistema do tipo ABMX, onde H-3^a, H-3b (parte AB), H-2 (M) e H-4 (X), onde o multiplete X faz parte do sistema A'M'X que envolve H-4, H-5^a e H-5b.

Para o sistema ABMX $\delta_{\text{H-3a}}$ 2,43, $\delta_{\text{H-3b}}$ 2,15, $\delta_{\text{H-2}}$ 4,03 e $\delta_{\text{H-4}}$ 4,48 ($J_{3a,3b} = 13,8$ Hz, $J_{3a,2} = 7,5$ Hz, $J_{3b,2} = 10,8$ Hz, $J_{3a,4} = 4,8$ Hz) e para o sistema A'M'X $\delta_{\text{H-5a}}$ 3,05, $\delta_{\text{H-5b}}$ 3,78 ($J_{5a,5b} = 12,6$ Hz, $J_{5a,4} = 2,1$ Hz e $J_{5b,4} = 4,8$ Hz).

Na Tabela 17 estão descritos os valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H , assim como suas correlações 2D DEPT, COSY e HMQC para a substância **SG-4**.

Tabela 17: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-4.

	^{13}C (ppm)	DEPT	δ_{H} (mult., J m Hz)	COSY
2	71,8	CH	4,03 (1H, <i>dd</i> , J= 10,6 e 7,5)	2,43 e 4,48
3	40,3	CH ₂	2,15 (1H, <i>ddd</i> , J= 13,8, 10,8 e 4,8)	2,43 e 4,48
			2,43 (1H, <i>ddt</i> , J= 13,8, 7,5 e 2,1)	2,15 e 4,03
4	70,9	CH	4,48 (1H, <i>m</i> , J= 2,1)	4,03; 3,78 e 2,15
5	64,1	CH ₂	3,05 (1H, <i>dt</i> , J= 12,6 e 2,1)	3,78
			3,78 (1H, <i>dd</i> , J= 12,6 e 4,8)	3,05; 2,99 e 4,48
	172,8	C ₀	-	-
	44,0	CH ₃	2,99 (3H, <i>s</i>)	3,78

A comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C para SG-4 e *n*-metil-*trans*-4-hidroxil-L-prolina estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H para a substância n-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina (M4HP)¹⁵ e SG-4.

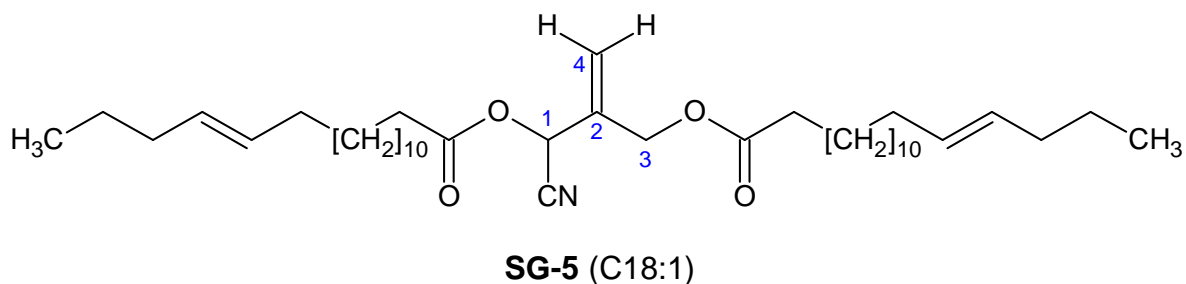
	^{13}C (ppm)		δ_{H} (mult., J m Hz)	
	M4HP	SG-4	M4HP ^a	SG-4 ^b
2 CH-COOH	70,9	71,8	4,05 (<i>dd</i> , J= 11 e 7,5)	4,03 (1H, <i>dd</i> , J= 10,6 e 7,5)
3 CH_2	40,3	40,3	2,16 (<i>ddd</i> , J= 14; 11 e 4,5)	2,15 (1H, <i>ddd</i> , J= 13,8, 10,8 e 4,8)
			2,44 (<i>dddd</i> , J= 14; 7,5; 1,8; 1,6)	2,43 (1H, <i>ddt</i> , J= 13,8, 7,5 e 2,1)
4 CH-OH	72,0	70,9	4,55 (<i>m</i>)	4,48 (1H, <i>m</i>)
5 $\text{CH}_2\text{-N}$	64,2	64,1	3,07 (<i>ddd</i> , J= 12,6; 1,8 e 1,4)	3,05 (1H, <i>dt</i> , J= 12,6 e 2,1)
			3,78 (<i>dd</i> , J= 12,6 e 4,5)	3,78 (1H, <i>dd</i> , J= 12,6 e 4,8)
-COOH	172,6	172,8	-	-
-N-CH ₃	44,1	44,0	2,95 (<i>s</i>)	2,99 (3H, <i>s</i>)

^a D₂O, 500 MHz

^b CDCl₃, 300 MHz

Através dos dados acima e comparação da substância SG-4 com dados da literatura, podemos identificar a esta substância como sendo n-metil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina.

4.5. Caracterização de SG-5



O composto **SG-5** foi isolado de uma coluna cromatográfica do extrato hexânico das sementes de *Serjania glabrata* na forma de um óleo incolor pouco viscoso, e foi identificado como uma mistura de dois cianolipídios do tipo I e triacilgliceróis.

Os cianolipídios ocorrem juntamente com triacilgliceróis em óleos de sementes e são classificados em 4 tipos. Os tipos I e II são diésteres e os tipos III e IV são monoésteres. O grupo nitrila é esterificado com longas cadeias de ácidos graxos.

O cromatograma de CG-EM de **SG-5** (Figura 14) evidencia a mistura de dois cianolipídios majoritários e de 5 triacilgliceróis.

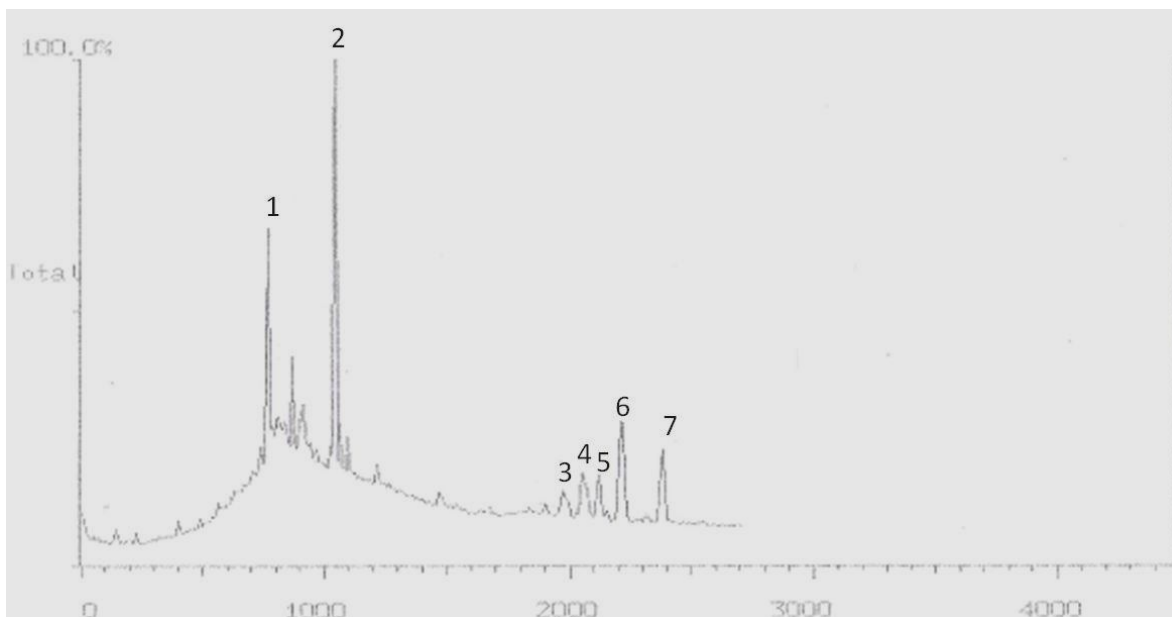


Figura 14: Cromatograma de CG-EM de SG-5.

O cianolípido tipo I **SG-5** foi evidenciado através dos sinais no espectro de RMN de ^1H (Anexo 15). O singlete em δ_{H} 5,97, integração para um hidrogênio, foi atribuído ao H-1. O duplo dubleto em δ_{H} 4,67 ($J= 14,3$ e $13,2$ Hz), integração para 2 hidrogênios, atribuído ao H-3. Os singletos em δ_{H} 5,71 e δ_{H} 5,56, integração total para 2 hidrogênios) atribuídos aos hidrogênios H-4a e H-4b, respectivamente.

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 16) e DEPT (Anexo 17) confirma-se a presença da nitrila em δ_{C} 115,0; da dupla terminal em δ_{C} 121,0 (C-4); do CH (C1) ligado à nitrila em δ_{C} 61,0. Os demais sinais em δ_{C} 135,5 e 62,8 foram atribuídos ao C-2 e C-3, respectivamente.

Os ácidos graxos esterificados à cadeia principal foram identificados como sendo o ácido octadecenóico, 18:1 n-9, e o ácido eicosenóico, 20:1 n-11.

Estudos realizados com sementes de *Serjania* relatam à presença do ácido graxo eicosenóico (20:1) em grande quantidade, este podendo ser tratado como marcador²¹.

As cadeias de ácido graxo foram evidenciadas através dos sinais no espectro de RMN ¹H, ¹³C e DEPT. O tripleto em δ_H 0,88 (J = 7,2 Hz), integração para 6 hidrogênios, foi atribuído às metilas terminais em δ_C 14,2 (C-20'), singlete em 1,26, integração total para 4 hidrogênios, aos CH₂ ligados às metilas, em δ_C 22,8 (C-19'); o multiplete em δ_H 2,01, com integração total para 8 hidrogênios, foi atribuído ao CH₂ dos carbonos C-18' e C-15'. O multiplete em 5,34, com integração para 4 hidrogênios, foi atribuído aos CH em δ_C 130,0 e em δ_C 129,9, C-17' e C-16'. O sinal em δ_H 2,3, integração para 4 hidrogênios, atribuído ao CH₂ em δ_C 34,1 (C-2') ligado à carbonila. Demais sinais na região δ_H 1,4 a 1,2, com integração 64 hidrogênios, sinal este característico de uma seqüência de hidrogênios metilênicos. O sinal em δ_C 173,1 característico de carbonila.

O espectro HMQC (Anexo 18) e COSY (Anexo 19) pode-se confirmar as ligações C-H e as correlações H-H. Estes dados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-5.

	^{13}C (ppm)	DEPT	δ_{H} (mult., J m Hz)	COSY
1	61,0	CH	5,97 (1H, s)	5,71
2	135,5	C ₀	-	
3	62,8	CH ₂	4,67 (2H, dd, J= 14,3 e 13,2)	5,56 e 5,71
4	121,0	CH ₂	5,71 (1H, s)	4,67
			5,56 (1H, s)	4,67
-CN	115,0	C ₀	-	-
1' e 1''	173,1 e 171,6	C ₀	-	-
2' e 2''	34,2 e 33,7	CH ₂	2,36 (4 H, m)	1,64
3' e 3''	24,9 e 24,7	CH ₂	1,64 (4 H, m)	2,36
4' a 14' e 4'' a 14''	29,5	CH ₂	1,26 (48H, s)	0,88 e 2,01
15' e 15''	27,3	CH ₂	2,01 (8 H, m)	5,34 e 1,26
16' e 16''	130,0	CH	4,34 (2 H, s)	2,01
17' e 17''	129,9	CH	4,34 (2 H, s)	2,01
18' e 18''	27,3	CH ₂	2,01 (8 H, m)	5,34 e 1,26
19' e 19''	22,8	CH ₂	1,26 (4 H, s)	0,88 e 2,01
20' e 20''	14,2	CH ₃	0,88 (6 H, t, J= 7,2)	1,26

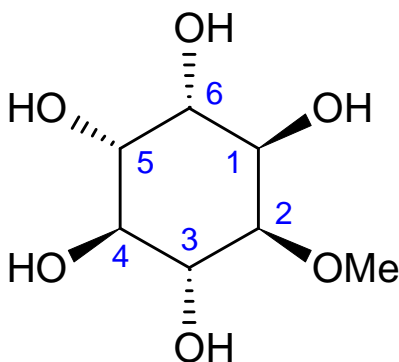
Os dados da Tabela 19 foram cruzados com dados encontrados em literatura para cianolipídios ⁽¹⁷⁾ do tipo I. Na Tabela 20 estão descritos os valores de deslocamento de ^1H e ^{13}C para as substâncias SG-5 e um cianolipídio.

Tabela 20: Valores de deslocamento de ^{13}C , ^1H da substância SG-5 e cianolipídio.

DEPT	^{13}C (ppm)		δ_{H} (mult., J m Hz)	
	Cianolipídio	SG-5	Cianolipídio ^a	SG-5 ^b
1 <u>CH</u> -CN	60,8	61,0	5,94 (s)	5,97 (1H, s)
2 C ₀	135,2	135,5	-	-
3 <u>CH₂</u> OCO	62,7	62,8	4,64 (m)	4,67 (2H, dd, J=14,3 e 13,2)
4 CH ₂ =	120,9	121,0	5,68 (s)	5,71 (1H, s)
			5,54 (s)	5,56 (1H, s)
-CN	114,8	115,0	-	-
1' e 1'' C ₀	173,0 e 171,4	173,1 e 171,6	-	-
2' e 2'' <u>CH₂</u> -COO	34,0 e 33,7	34,2 e 33,7	2,32 (t, J= 7,5) e 2,38 (dt, J= (2,2; 7,7))	2,36 (4 H, m)
3' e 3'' CH ₂	24,9 e 24,7	24,9 e 24,7	1,62 (m)	1,64 (4 H, m)
4' a 14' e 4'' a 14'' nCH ₂	29,5	29,5	1,24 (m)	1,26 (48H, s)
15' e 15'' =CH- <u>CH₂</u>	27,3	27,3	1,99 (m)	2,01 (8 H, m)
16' e 16'' CH	130,0	130,0	5,32 (s)	4,34 (2 H, s)
17' e 17'' CH	129,9	129,9	5,32 (s)	4,34 (2 H, s)
18' e 18''	27,3	27,3	1,99 (m)	2,01 (8 H, m)
19' e 19'' CH ₂	22,8	22,8	1,26 (s)	1,26 (4 H, s)
20' e 20'' CH ₃	14,2	14,2	0,86 (t, J= 6,6)	0,88 (6 H, t, J= 7,2)

^a CDCl₃, 500 MHz; ^b CDCl₃, 300 MHz.

4.6. Caracterização de SG-6



SG-6 (Quebrachitol)

O composto SG-6 foi isolado da fração SG-F (43-48) resultante de uma coluna cromatográfica realizada com o precipitado do extrato etanólico das sementes.

A substância SG-6 foi evidenciada como quebrachitol pela presença de seis sinais de hidrogênios oximetínicos (espectro de RMN ^1H (Anexo 20)) em δ_{H} 4,27 (J= 3,6 Hz, t) (H-1); sinal em δ_{H} 3,40 (J= 9,6 e 3,3 Hz, dd) (H-2); sinal em δ_{H} 3,60 (m) (H-3); sinal em δ_{H} 3,62 (J=9,9 e 9,6 Hz, dd) (H-4); sinal em δ_{H} 3,74 (J= 9,9 e 3,6 Hz, dd) (H-5) e sinal em δ_{H} 4,05 (J= 3,6 Hz, t) (H-6), todos com integração para um hidrogênio. O sinal em δ_{H} 3,45 (s), integração para 3 hidrogênios, foi atribuído à presença de uma metoxila.

Através das constantes de acoplamento dos sinais em δ_{H} 4,27 (J= 3,6 Hz, t) e 4,05 (J= 3,6 Hz, t) evidenciam acoplamento para a posição equatorial, os demais

sinais evidenciam acoplamento para a posição em axial, como mostra a figura abaixo.

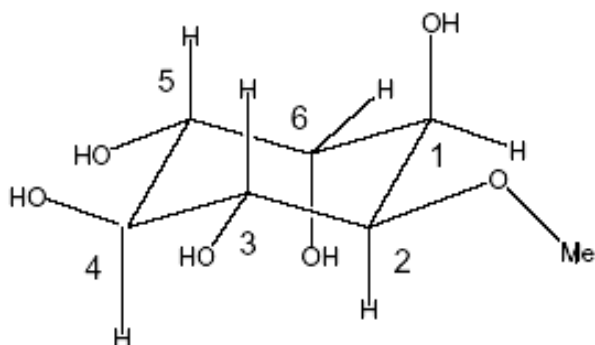


Figura 15: Conformação da substância SG-6, quebrachitol.

Através dos espectros de RMN de ^{13}C (Anexo 21) e DEPT (Anexo 22) pode-se verificar seis sinais na região de δ_{C} 70-80 ppm, característicos de C ligados à hidroxila, referentes a uma cadeia carbônica cíclica, possuindo uma metoxila ligada a sua estrutura.

Através do espectro de HMQC (Anexo 23) e COSY (Anexo 24) temos o as ligações e correlações dos sinais de H e C. Estes dados estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21: Valores de deslocamento de ^{13}C e ^1H assim como correlações 2D DEPT, HMQC e COSY da substância SG-6.

	^{13}C (ppm)	DEPT	^1H (mult, J em Hz)	COSY
1	70,0	CH	4,27 (1H, <i>t</i> , J= 3.6)	4,05 e 3,40
2	83,0	CH	3,40 (1H, <i>dd</i> , J= 9.6, 3.3)	3,60 e 4,27
3	74,7	CH	3,60 (1H, <i>m</i>)	3,62 e 3,40
4	75,6	CH	3,62 (1H, <i>dd</i> , J= 9.9, 9.6)	3,74 e 3,60
5	73,1	CH	3,74 (1H, <i>dd</i> , J= 9.9, 3.6)	4,05 e 3,62
6	74,2	CH	4,05 (1H, <i>t</i> , J= 3.6)	4,27 e 3,74
-OMe	59,7	CH ₃	3,45 (3H, <i>s</i>)	-

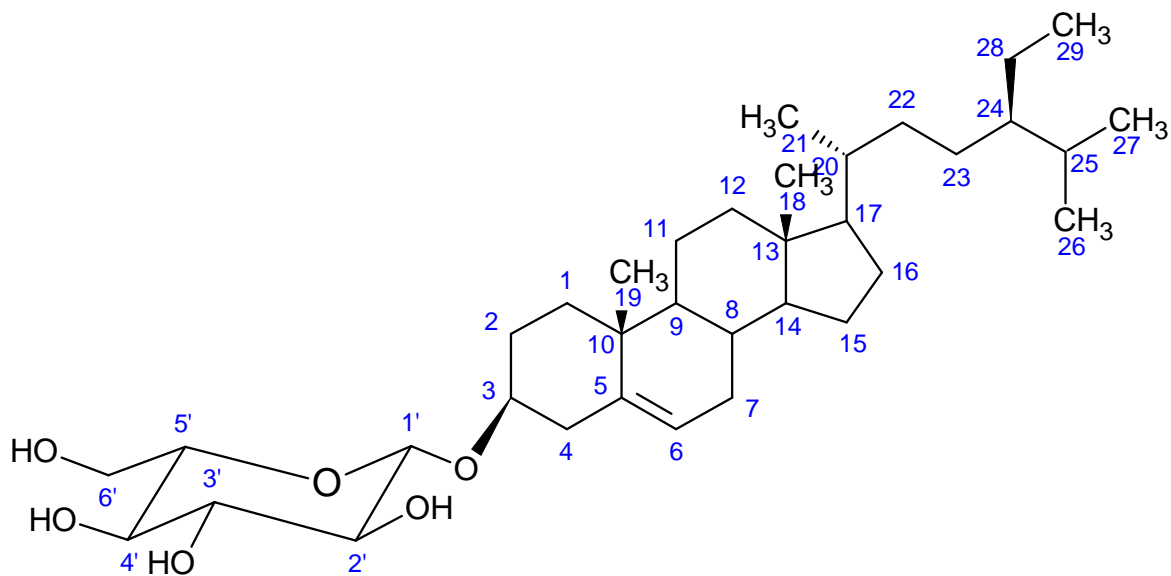
Os dados da Tabela 21 foram comparados com os dados encontrados na literatura para quebrachitol⁽³²⁾ (Tabela 22) e estes apresentam concordância entre si.

Tabela 22: Dados espectrais de ^1H , ^{13}C para as substâncias Quebrachitol e SG-6.

DEPT	^{13}C (ppm)		δ_{H} (mult., J m Hz)	
	Quebrachitol	SG-6	Quebrachitol ^a	SG-6 ^b
1 CH	69,2	70,0	4,12 (1H, <i>t</i> , J= 3,5)	4,27 (1H, <i>t</i> , J= 3,6)
2 CH	82,4	83,0	3,33 (1H, <i>dd</i> , J= 9,5, 3,5)	3,40 (1H, <i>dd</i> , J= 9,6, 3,3)
3 CH	73,7	74,7	3,60 (1H, <i>t</i> , J= 9,5)	3,60 (1H, <i>m</i>)
4 CH	74,6	75,6	3,56 (1H, <i>t</i> , J= 9,5)	3,62 (1H, <i>dd</i> , J= 9,9, 9,6)
5 CH	72,3	73,1	3,68 (1H, <i>dd</i> , J= 9,5, 3,6)	3,74 (1H, <i>dd</i> , J= 9,9, 3,6)
6 CH	73,2	74,2	3,94 (<i>t</i> , J= 3,6)	4,05 (1H, <i>t</i> , J= 3,6)
-OMe	57,8	59,7	3,45 (3H, <i>s</i>)	3,45 (3H, <i>s</i>)

^a CDCl_3 , 600 MHz; ^b D_2O , 300 MHz.

3.14. Caracterização de SG-7



SG-7 (3-β-O-β-D-glucopiranosilsterol)

SG-7 foi isolado da fração SG-F(15-30) da coluna cromatográfica do precipitado do extrato etanólico das sementes.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 25) a presença do H-3 (multipeto) na região de 3,64 -3,54 ppm e do hidrogênio olefínico H-6 em δ_{H} 5,37 ppm ($J=5,1$ Hz, d) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 – 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos, são sinais característicos do esteróide β -sitosterol.

A presença da unidade glicosídica foi evidenciada através da presença do carbono anomérico em δ_{C} 101,03 e pelo acúmulo de sinais na região de δ_{H} 3,47 – 3,21 ppm. Baseados nos dados encontrados na literatura ⁽³³⁾ (Tabela 23) a

substância SG-7 foi identificada como o esteróide 3- β -O- β -D-glucopiranosilsitosterol.

Tabela 23: Valores de deslocamento de ^1H e ^{13}C das substâncias β -sitosterol glicosilado e SG-7.

DEPT	^{13}C (ppm)		DEPT	^{13}C (ppm)	
	Sitosterol ^a	SG-7 ^b		Sitosterol	SG-7
1 CH ₂	37,2	36,6	19 CH ₃	19,3	19,2
2 CH ₂	29,4	29,6	20 CH	36,1	36,1
3 CH	80,0	79,1	21 CH ₃	19,0	18,8
4 CH	38,9	42,3	22 CH ₂	33,9	33,8
5 C ₀	140,3	140,2	23 CH ₂	26,0	25,9
6 CH	122,1	122,1	24 CH	45,8	45,7
7 CH ₂	31,9	31,8	25 CH	29,1	29,0
8 C ₀	31,8	31,8	26 CH ₃	18,7	18,6
9 CH	50,1	50,1	27 CH ₃	19,8	19,6
10 C ₀	36,7	36,1	28 CH ₂	23,0	22,9
11 CH ₂	21,0	21,0	29 CH ₃	11,9	11,7
12 CH ₂	39,7	39,7	1' CH	99,6	101,0
13 C ₀	42,3	42,2	2' CH	71,4	73,4
14 CH	56,7	56,7	3' CH	71,6	75,7
15 CH ₂	24,2	24,2	4' CH	68,5	69,9
16 CH ₂	28,2	28,1	5' CH	62,1	76,3
17 CH	56,0	55,9	6' CH ₂	62,1	61,5

18 CH ₃	11,8	11,8			
--------------------	------	------	--	--	--

^a C₅D₅N, 75,5 MHz; ^b CDCl₃, 75,5 MHz

3.15. Estudo da avaliação da atividade moluscicida

O teste para atividade moluscicida *in vivo* foi realizado em caráter preliminar a concentração de 400 ppm, sendo esta concentração reduzida a fim de se encontrar o LC₅₀ para os extratos que apresentarem atividade.

Os resultados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Valores de LC₅₀ e LC₉₀ para os extratos de *Serjania glabrata* testados frente ao caramujo de *B. glabrata*.

Extrato testado	LC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	LC ₉₀ (µg.mL ⁻¹)
SG-A	> 400	> 400
SG-B	> 400	> 400
SG-C	137,6	184,3
SG-D	> 400	> 400
SG-E	28,3	56,1
SG-F	> 400	> 400
SG-G	> 400	> 400

São considerados ativos apenas extratos totais de plantas com concentração abaixo de 100 ppm. Neste caso, podemos citar o extrato hexânico dos galhos (SG-C) como sendo ativo (137,6 µg.mL⁻¹) e o extrato hexânico das

sementes (SG-E) como sendo muito ativo (28,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4. CONCLUSÕES

Através do estudo químico realizado foram isolados e caracterizados sete compostos: SG-1, SG-2, SG-3, SG-4, SG-5, SG-6 e SG-7.

Os compostos SG-1, SG-2 e SG-3 foram isolados do extrato hexânico das folhas após fracionamento em coluna cromatográfica em diferentes combinações de solventes. SG-1 e SG-2 foram caracterizados e identificados como sendo misturas hidrocarbonetos insaturados, com cadeia carbônica variando de 10 a 20 átomos. SG-3 foi caracterizado como sendo um o triterpeno, sugestão de β -amirina. Para a elucidação completa de SG-3, novos ensaios serão realizados.

Do extrato etanólico dos galhos foi isolado SG-4, como precipitado em forma de cristais brancos, após fracionamento em coluna cromatográfica. Foi caracterizado como n-metil-*trans*-4-hidroxil-L-prolina, um aminoácido incomum.

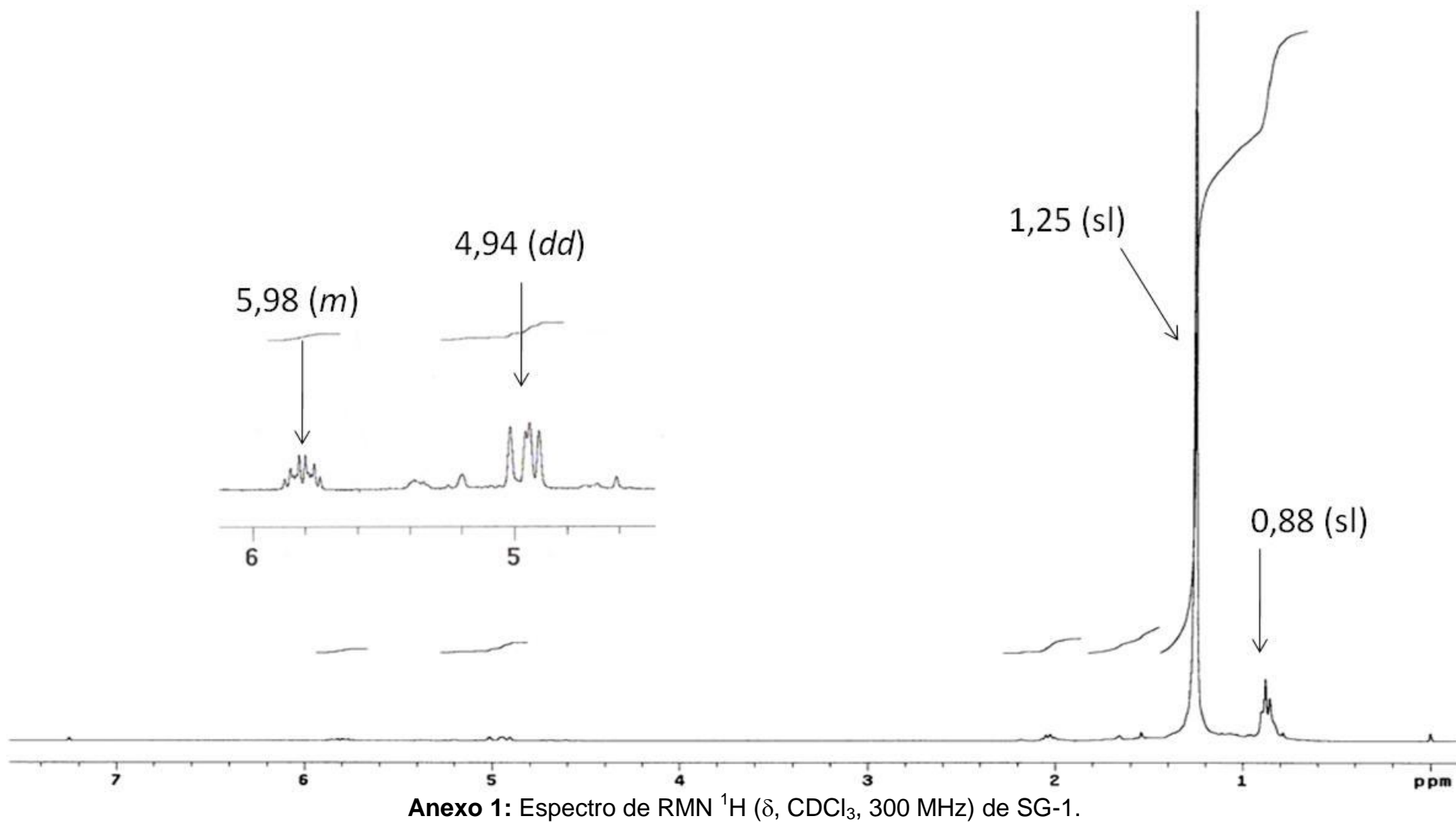
O cianolípido, do tipo I, 1-ciano-2-hidroximetilpropil-2-en-1-ol-diéster, foi isolado do extrato hexânico das sementes. Esta classe de compostos de lipídios é incomum, porém é encontrada nas plantas das famílias Sapindaceae, Boraginaceae e Hippocastaneceae.

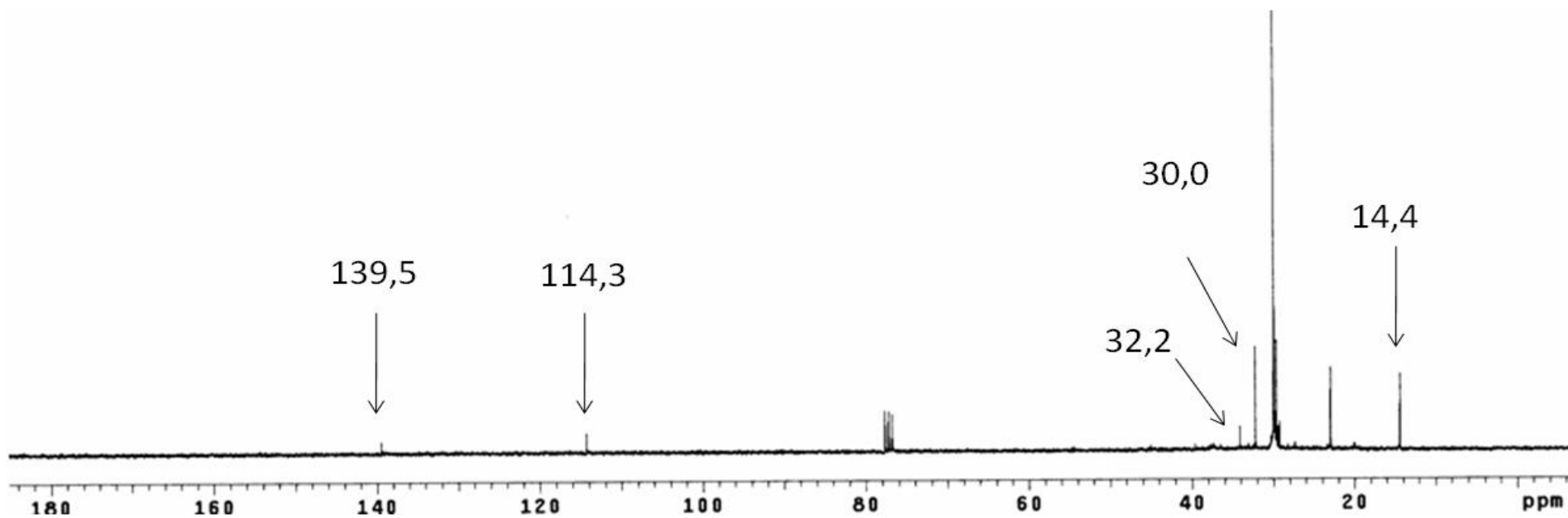
Do extrato etanólico das sementes, após aplicação da metodologia de precipitação de saponinas e coluna cromatográfica do precipitado, foram isolados e caracterizados dois compostos, sitosterol glicosilado e quebrachitol.

Quebrachitol e a classe de cianolipídios são reportados como compostos armazenados em plantas da família Sapindaceae. Estes podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos da família em estudo.

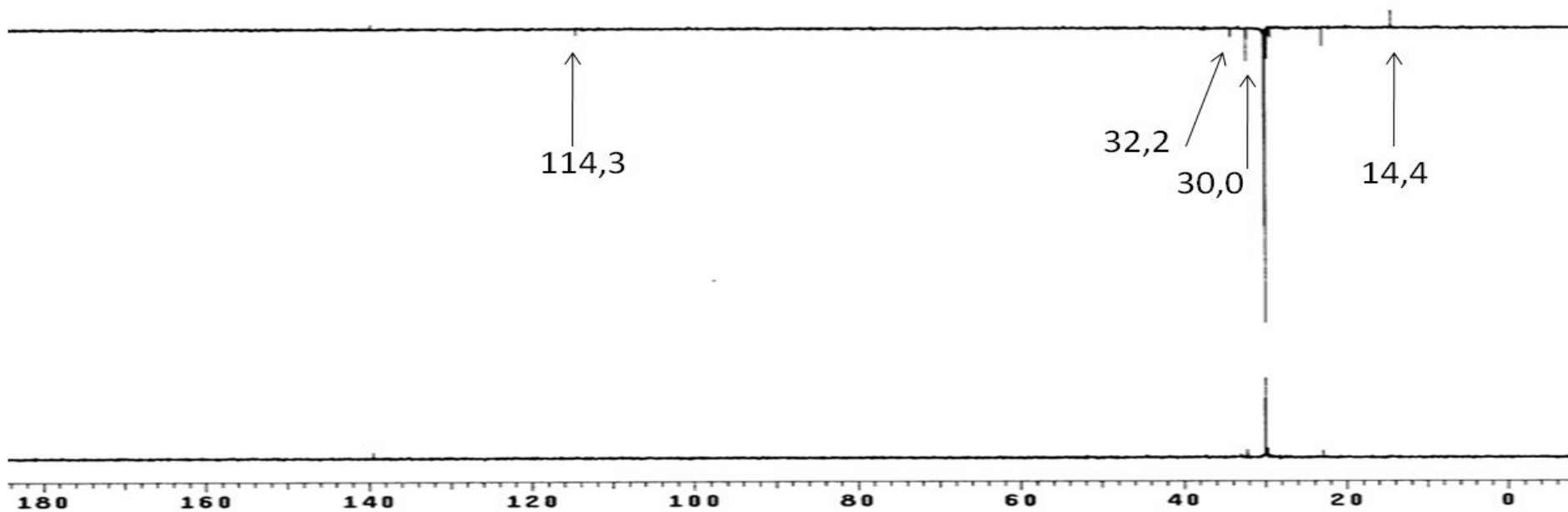
O teste de mortalidade de *A. salina* é utilizado como método rápido e simples para monitoramento de toxicidade de extratos e compostos bioativos. Para este estudo, os extratos etanólicos apresentaram ser mais ativos, sendo o extrato etanólico das sementes com o menor valor estimado de LC₅₀ (47,53 ppm).

A avaliação do potencial moluscicida dos extratos de *Serjania glabrata* apresentou os extratos hexânicos dos galhos e das sementes com melhores resultados. O extrato hexânico dos galhos mostrou valor de LC₅₀ de 137,6 ppm e o extrato das sementes de 28,3 ppm. São considerados extratos ativos apenas concentrações menores de 100 ppm.

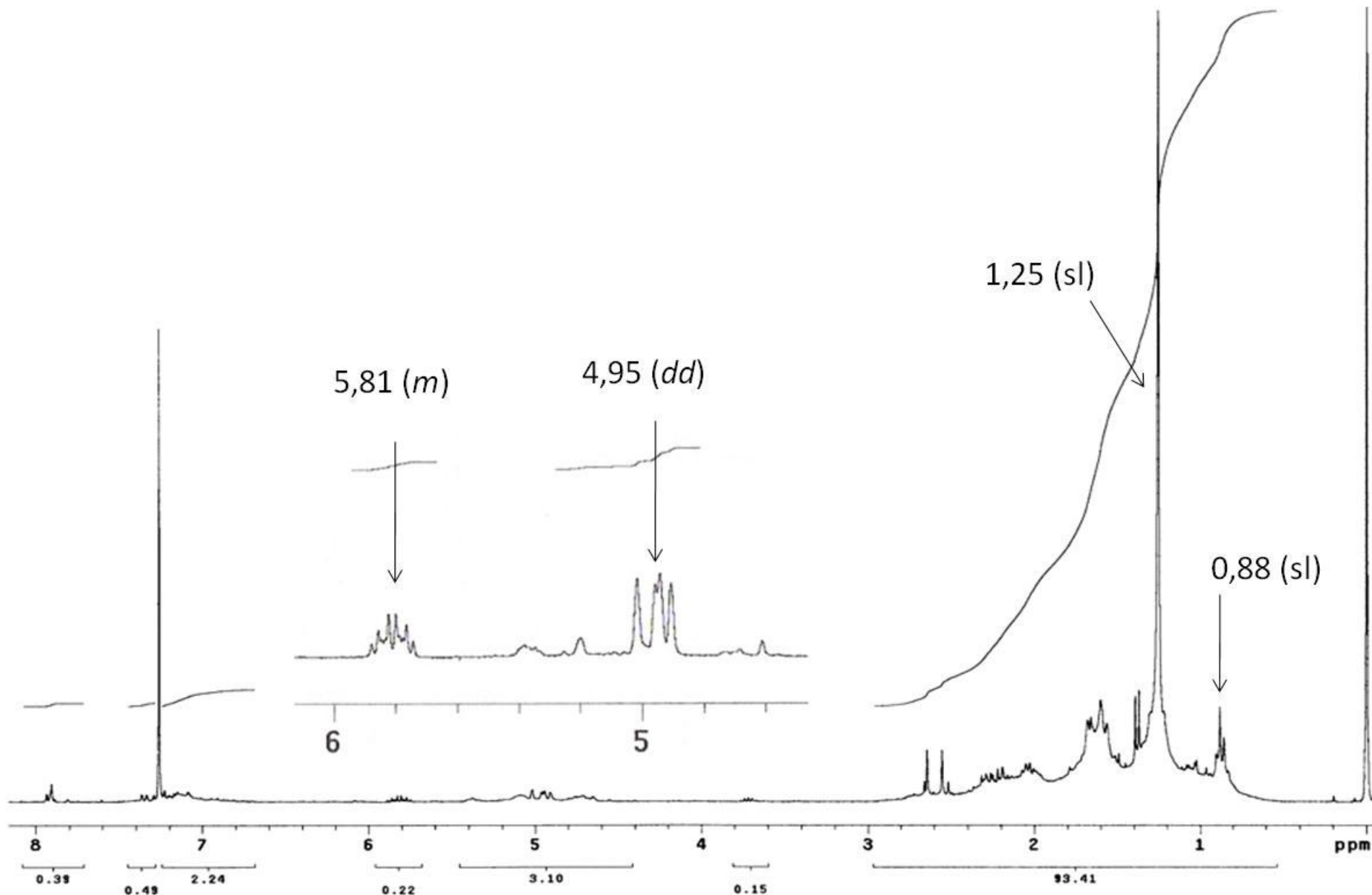




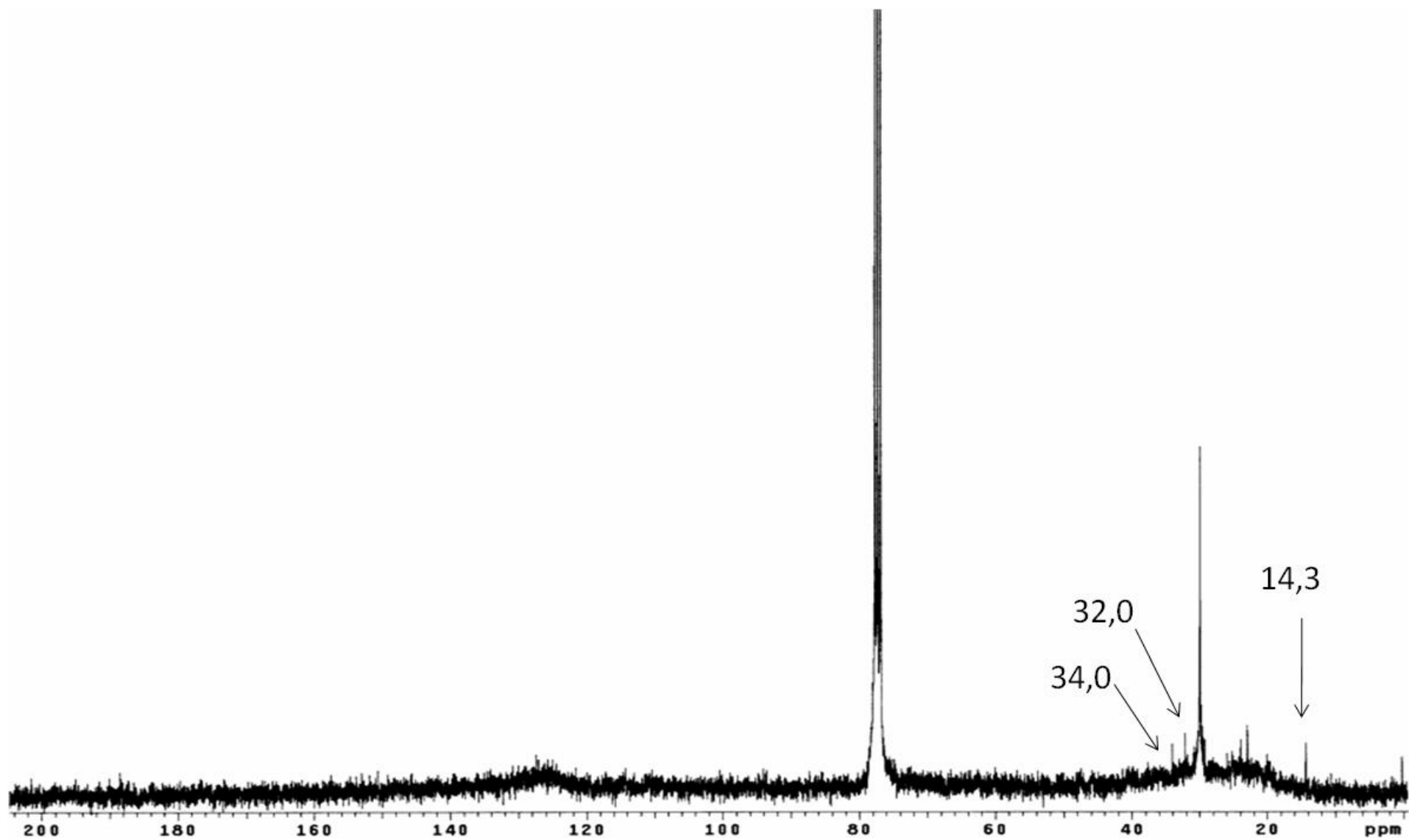
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5 MHz) de SG-1.



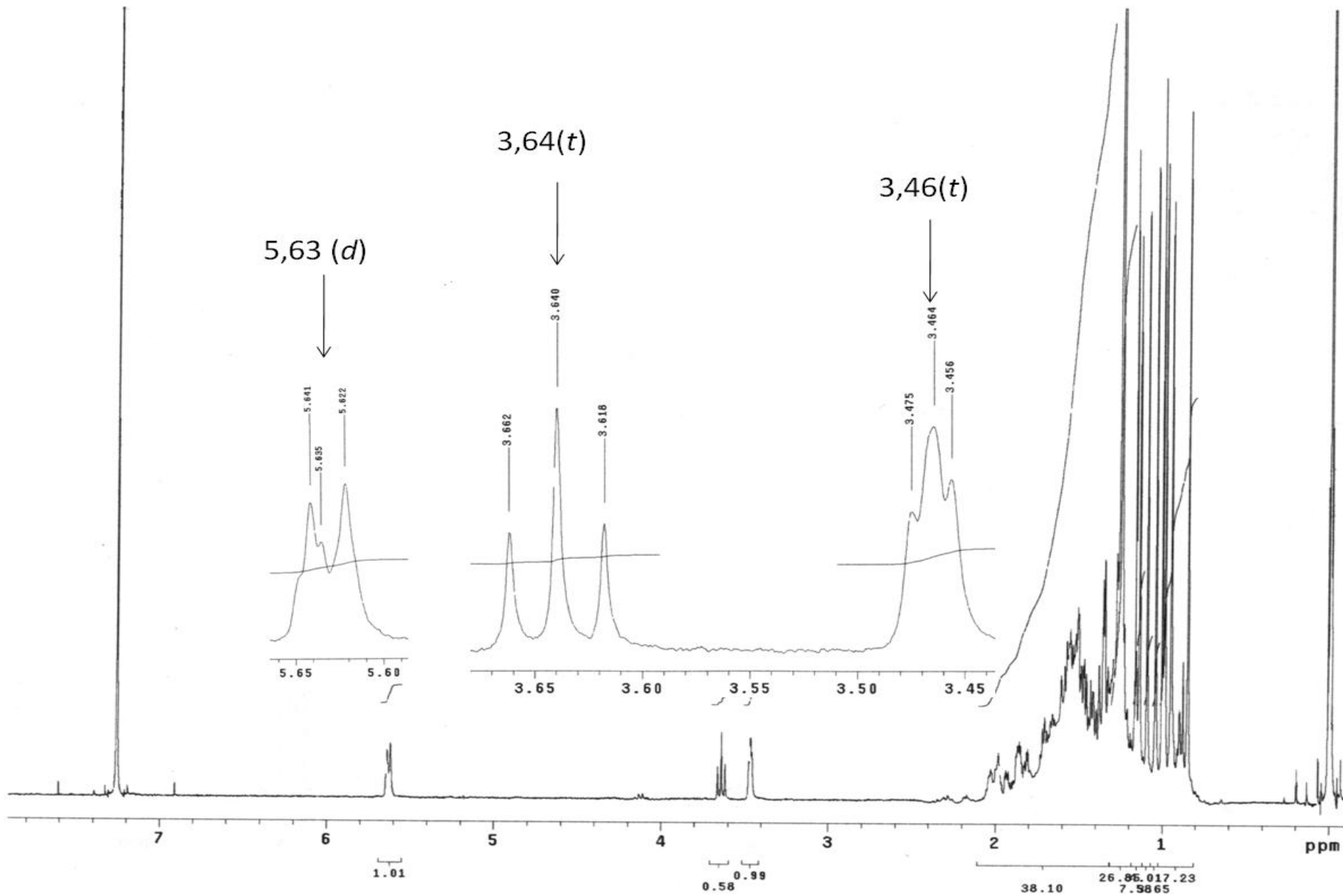
Anexo 3: Espectro de RMN ¹³C-DEPT 90 e 135 (δ, CDCl₃, 75.5 MHz) de SG-1.



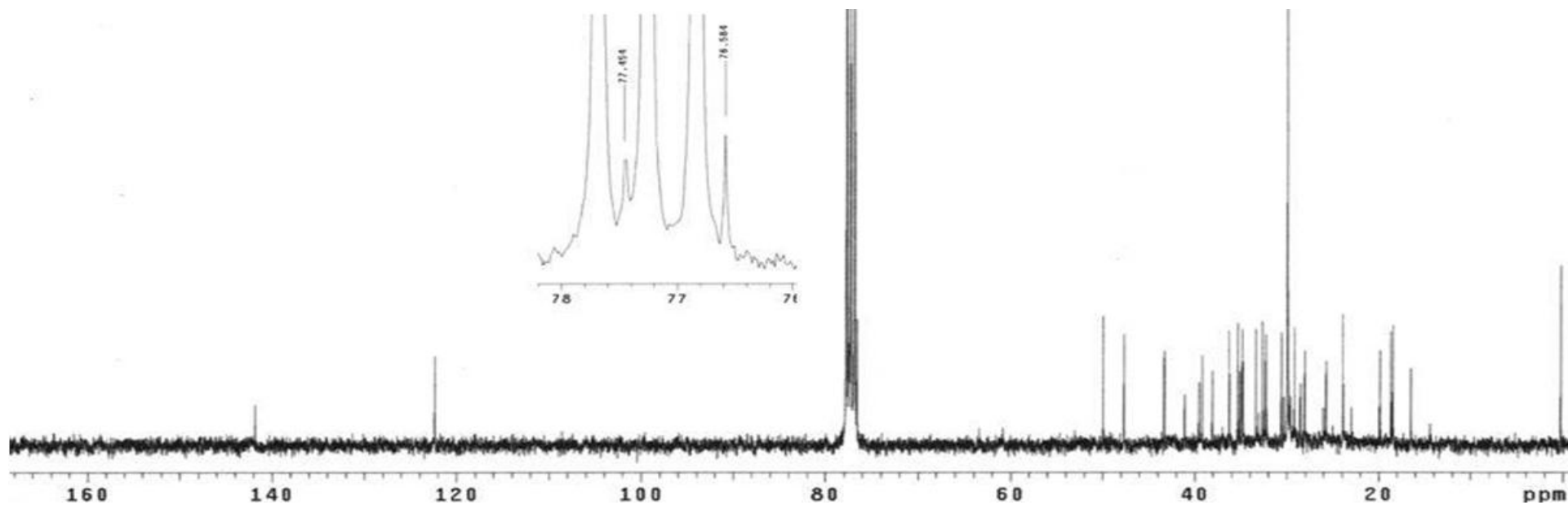
Anexo 4: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-2.



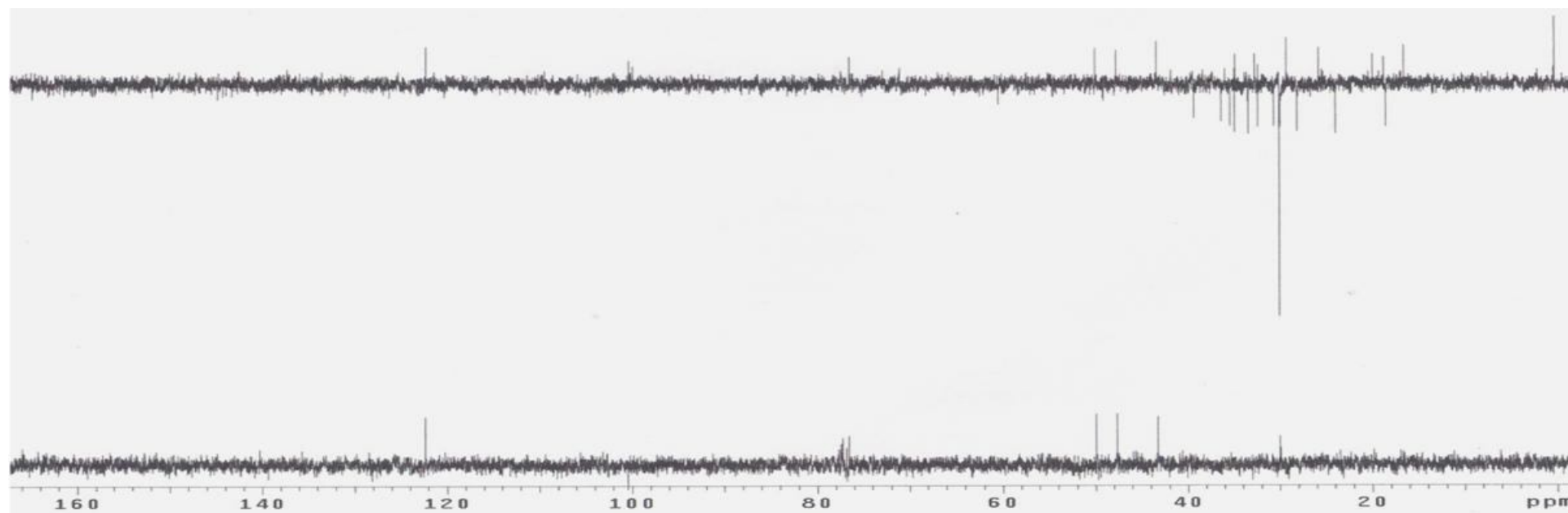
Anexo 5: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5 MHz) de SG-2.



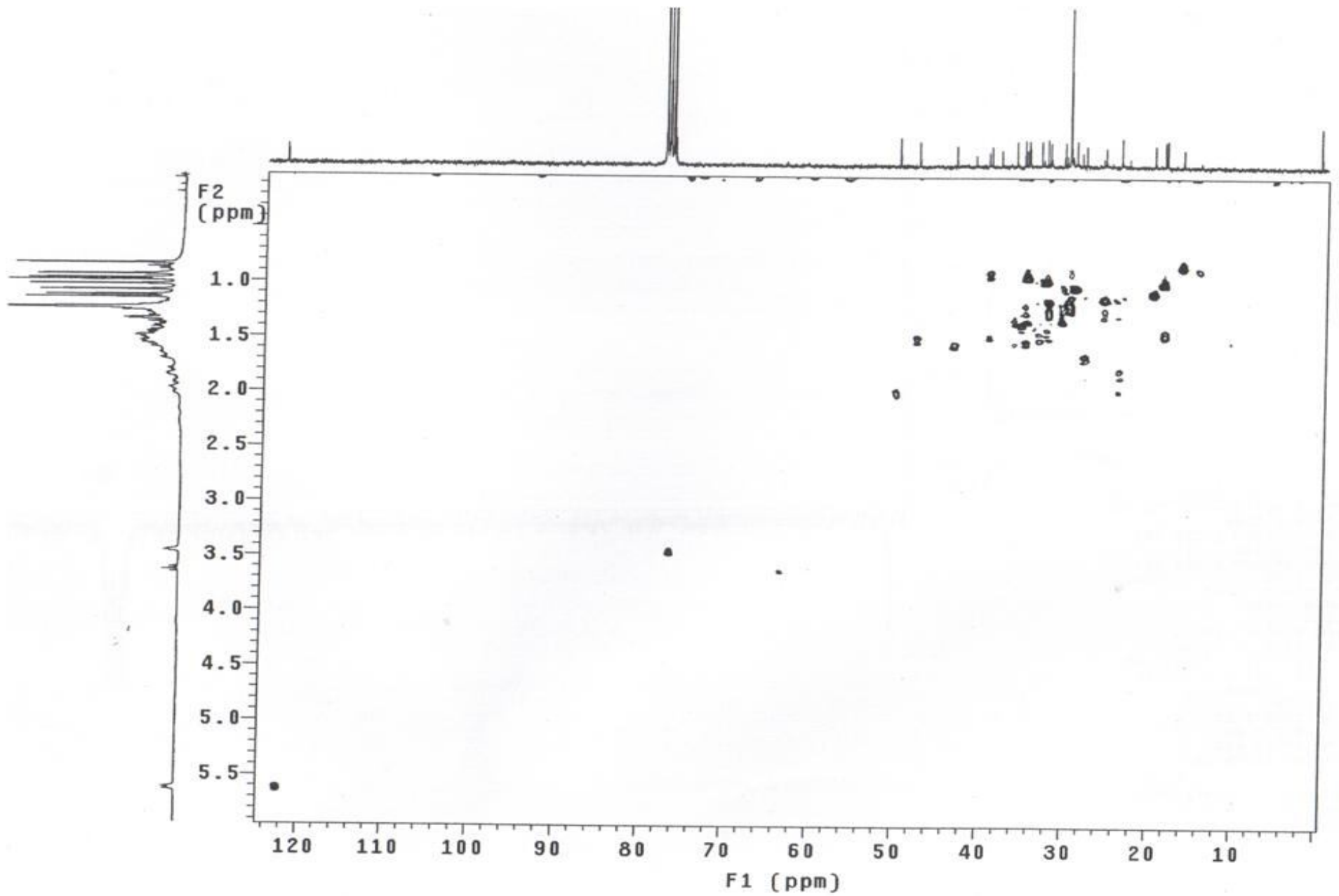
Anexo 6: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-3.



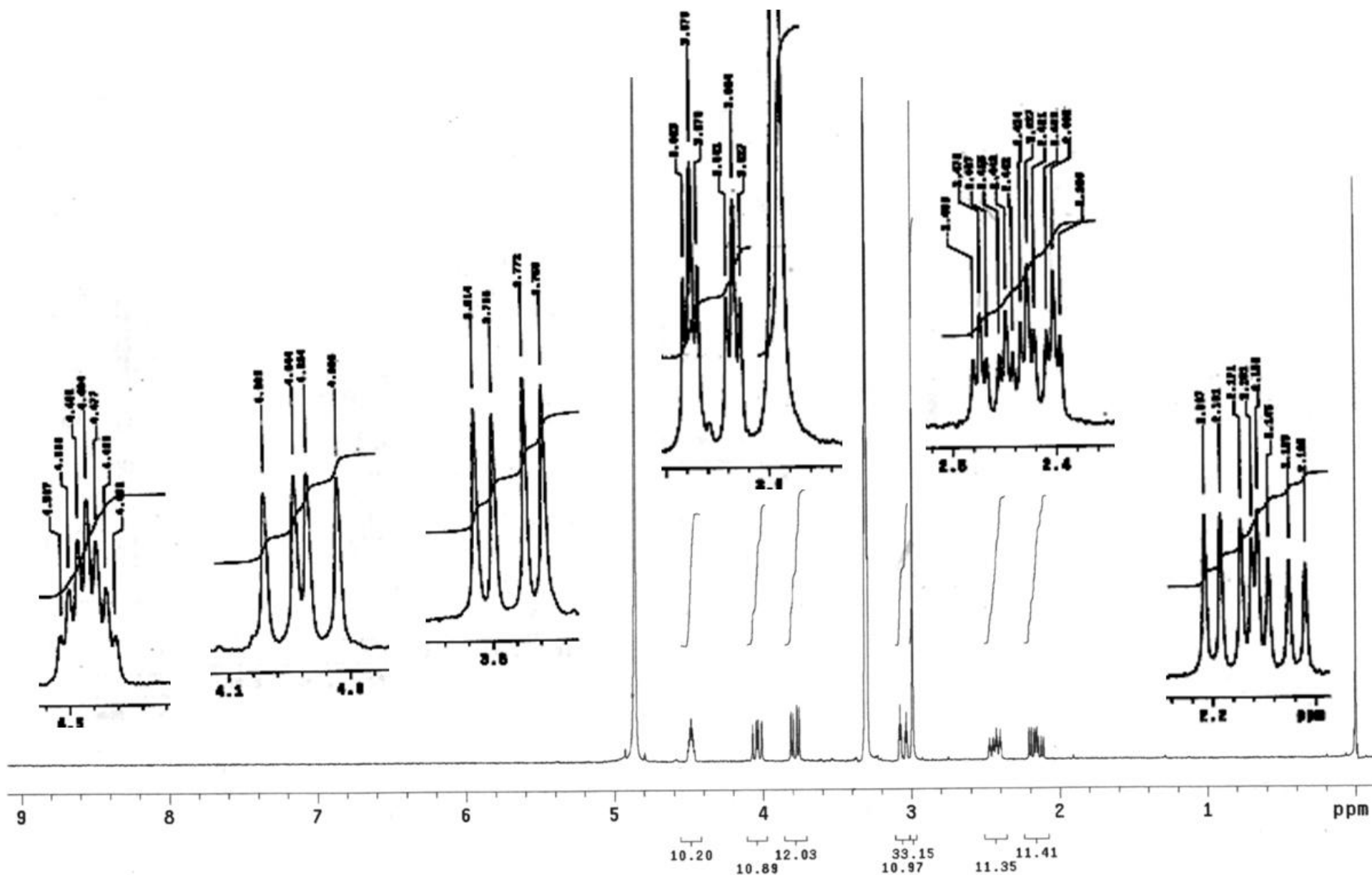
Anexo 7: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3.



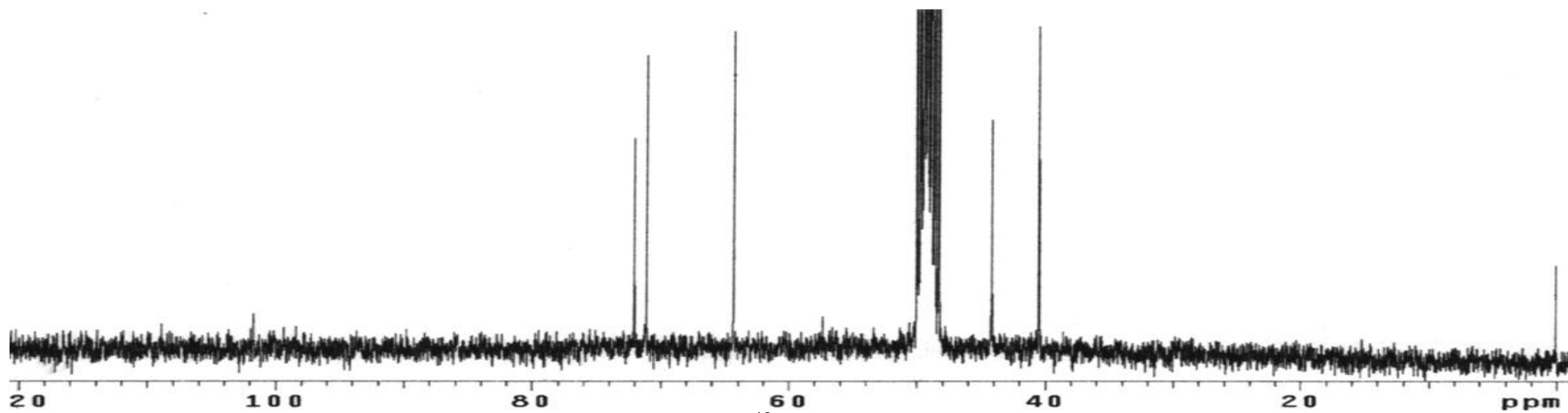
Anexo 8: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3



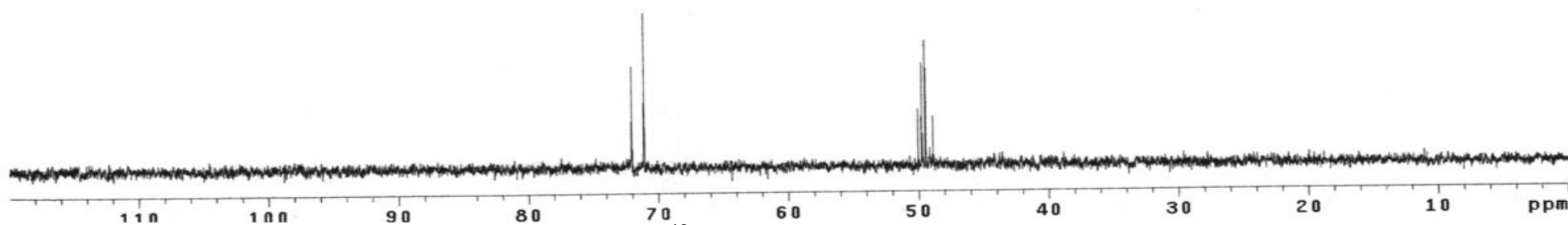
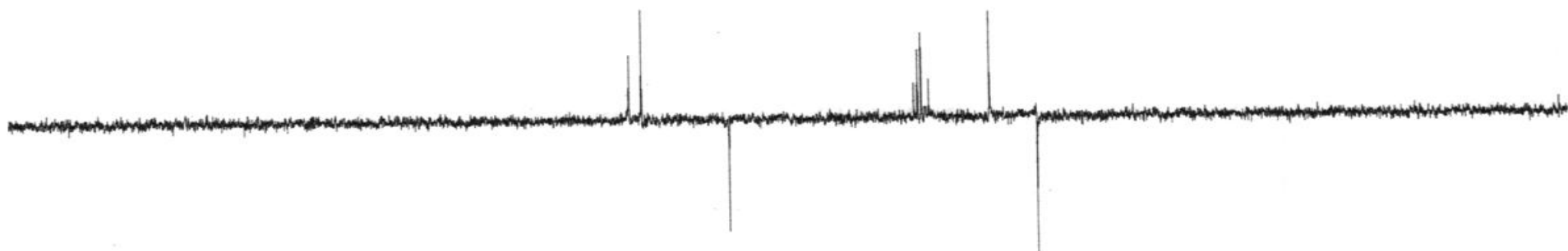
Anexo 9: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-3.



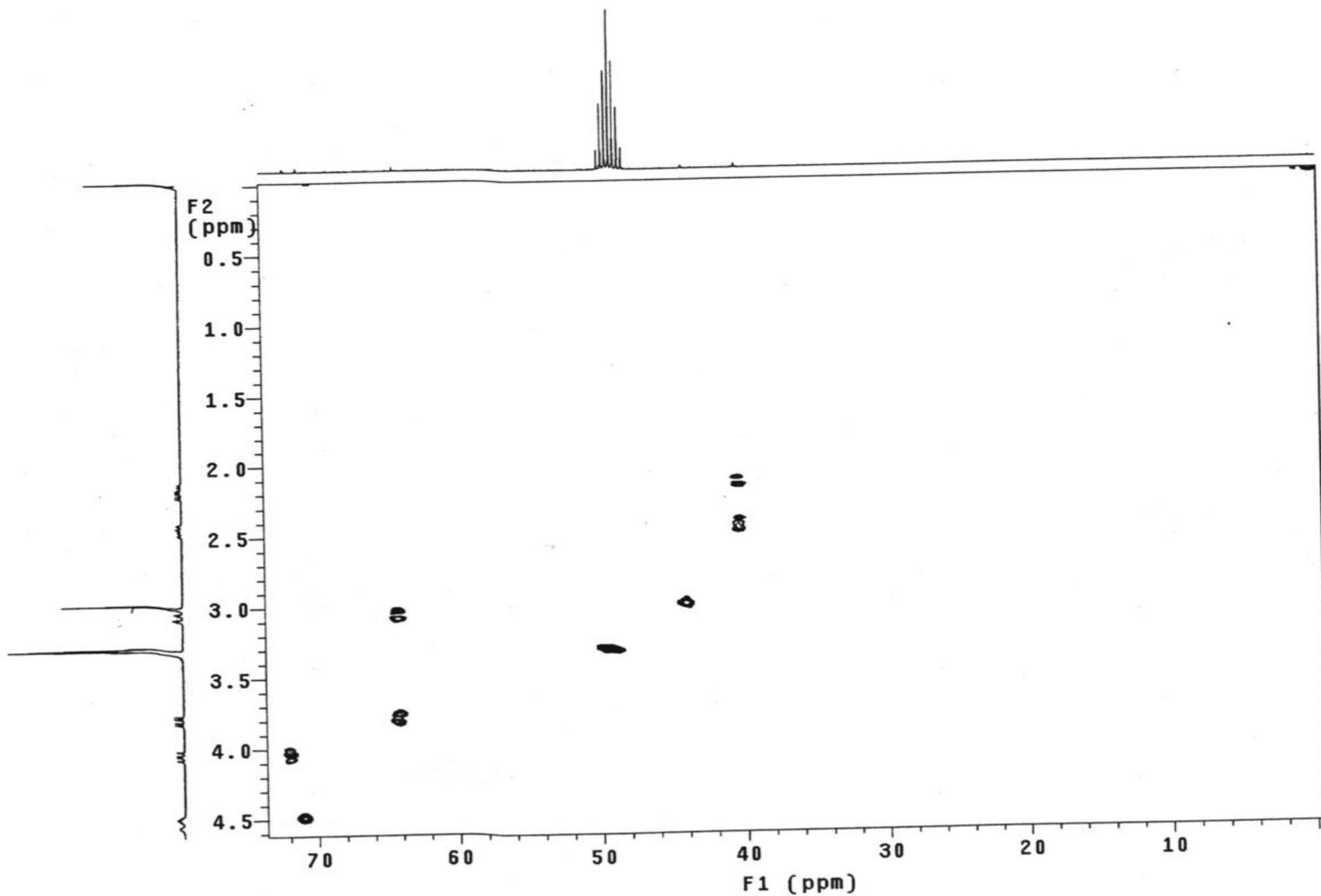
Anexo 10: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-4.



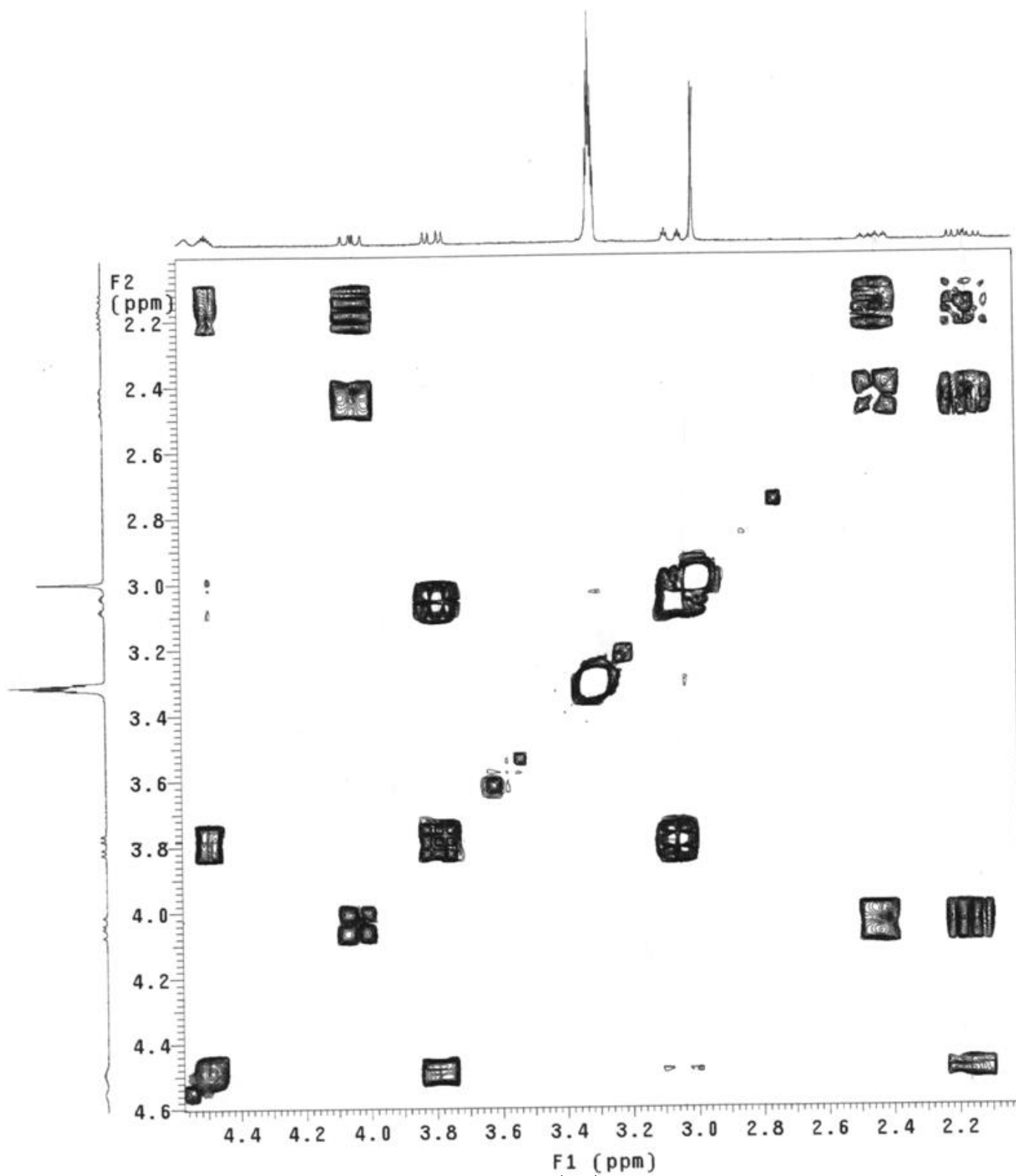
Anexo 11: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.



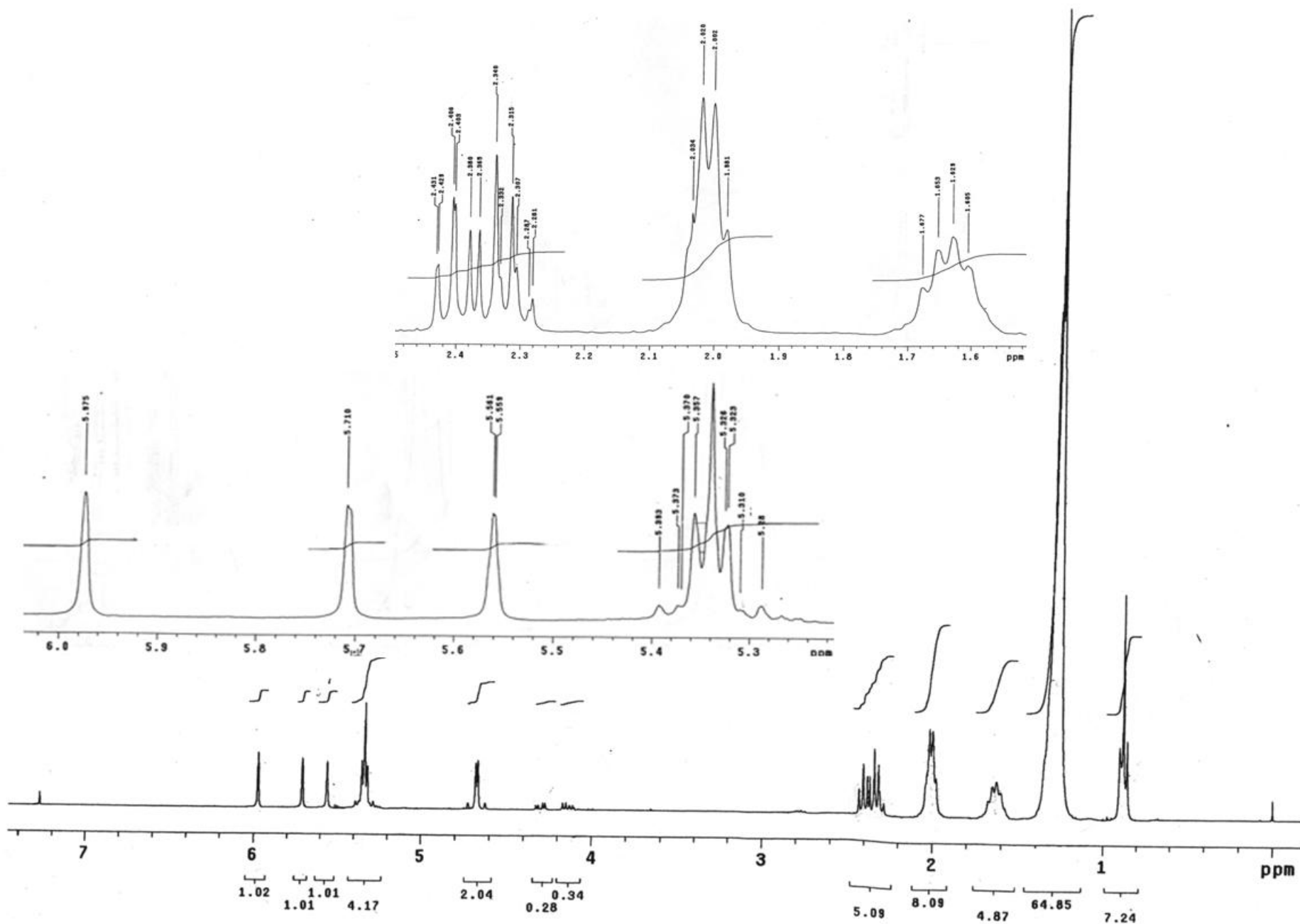
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.



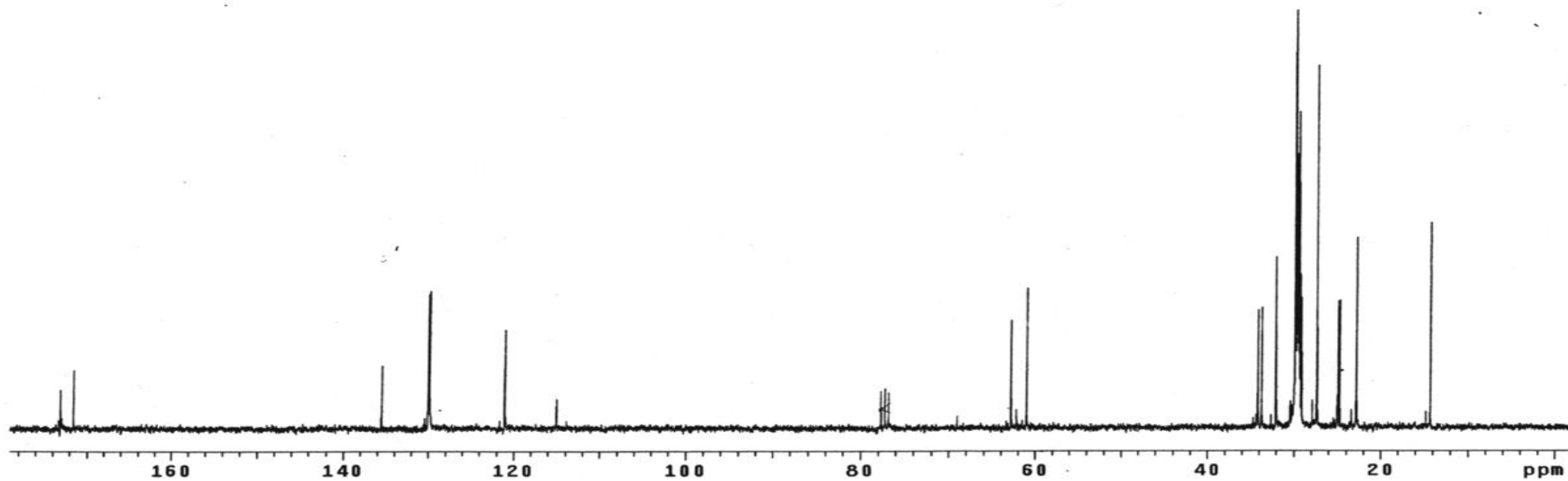
Anexo 13: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-4.



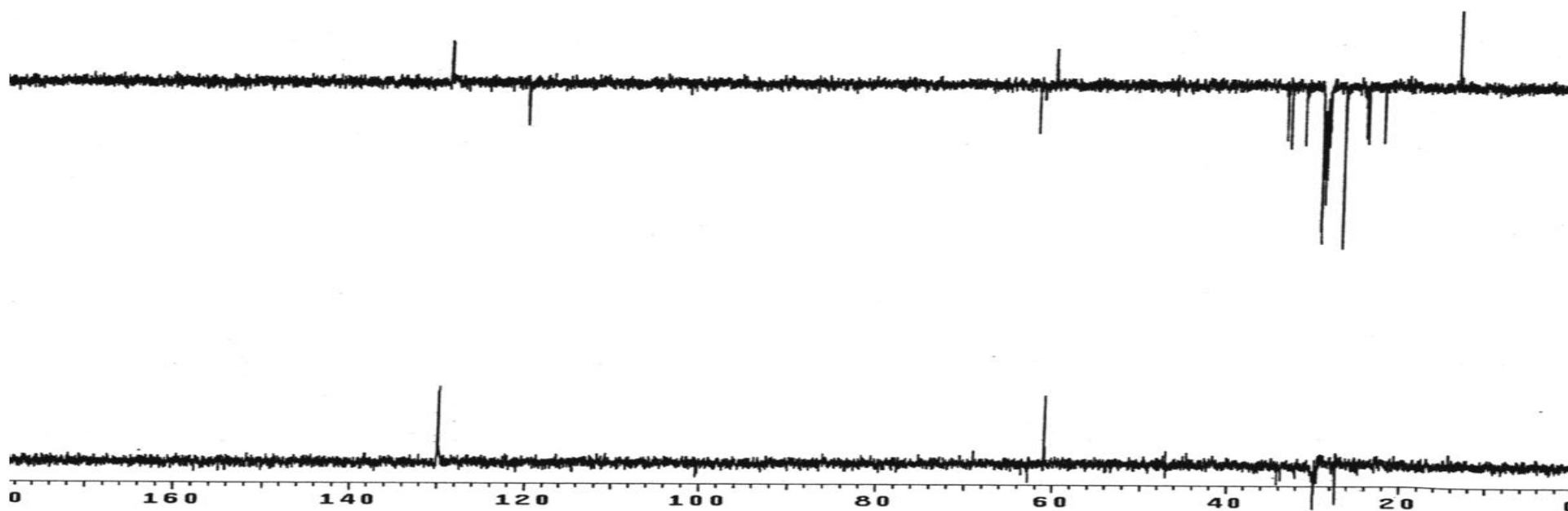
Anexo 14: Espectro de RMN2D COSY (¹H-¹H, δ, CDCl₃, 75,5 MHz) de SG-4.



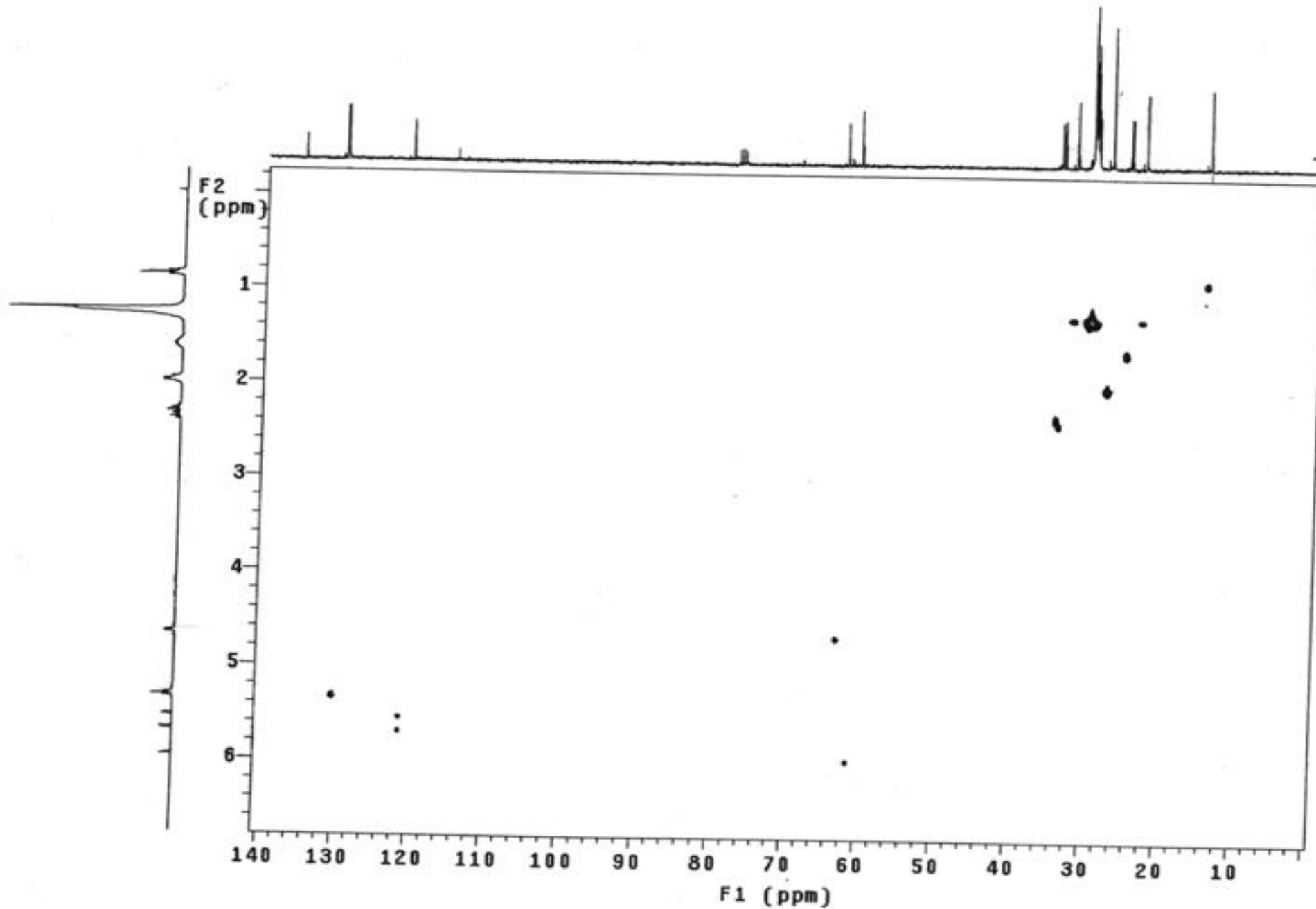
Anexo 15: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 300 MHz) de SG-5.



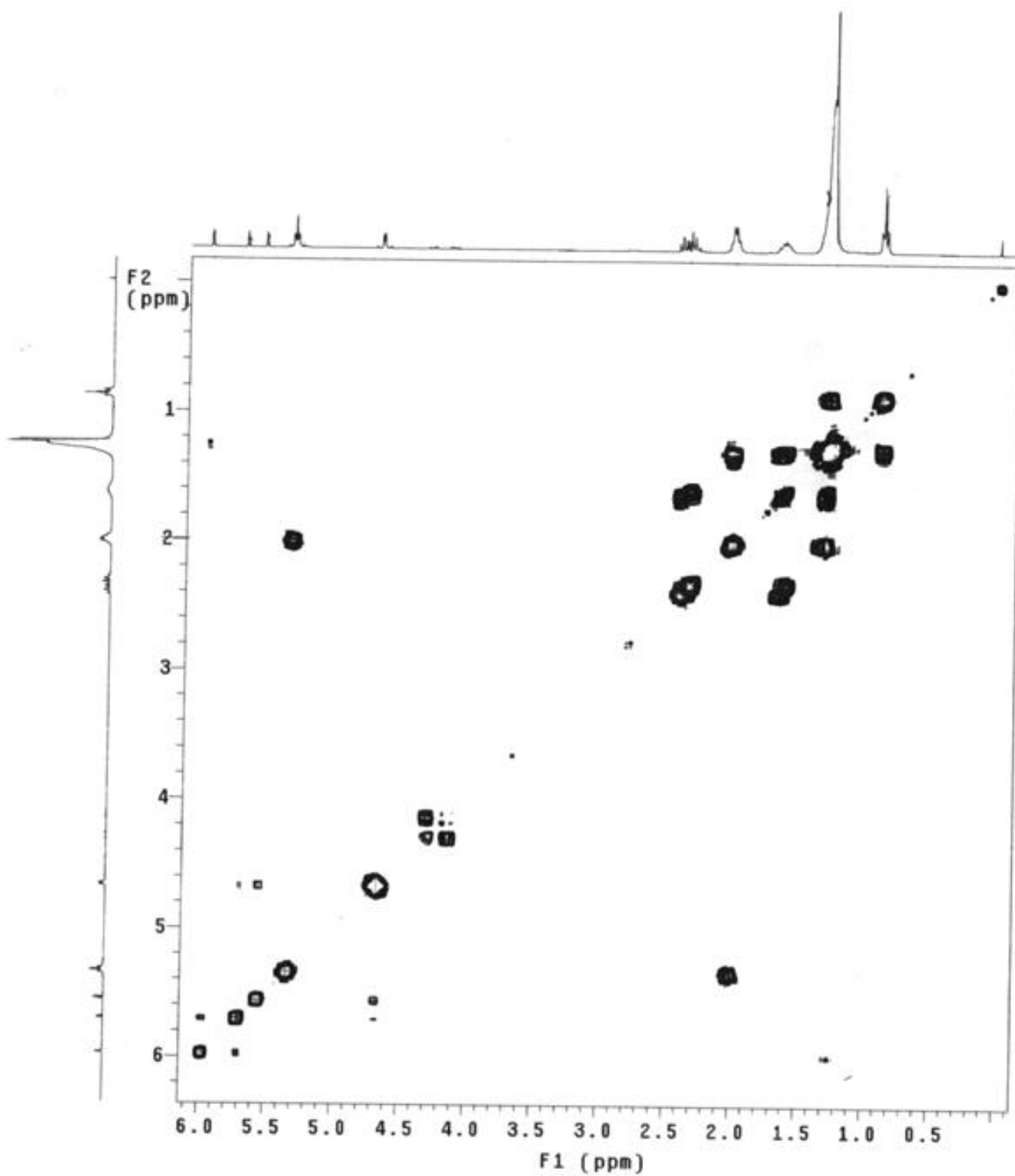
Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75.5MHz) de SG-5.



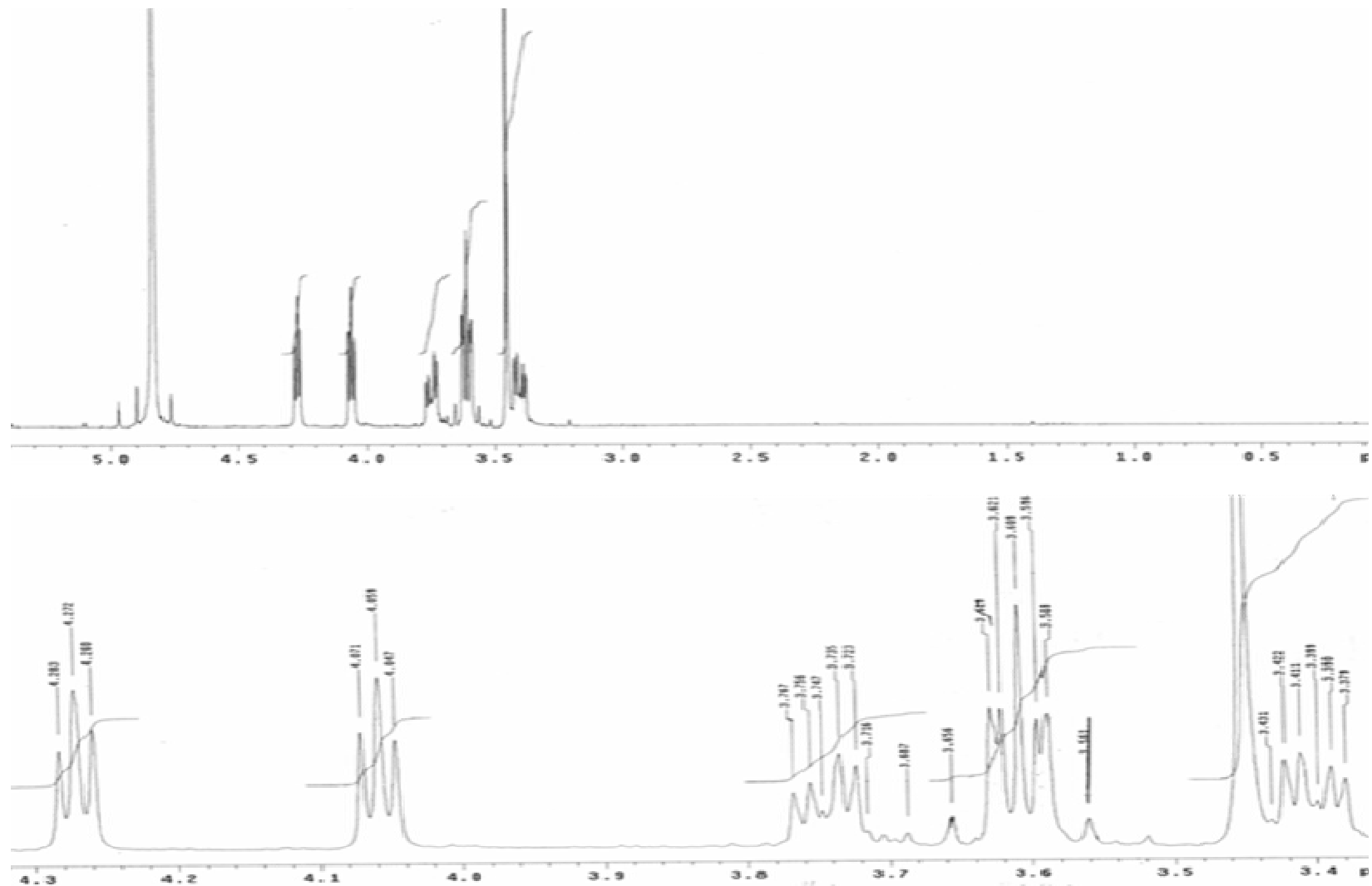
Anexo 17: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.



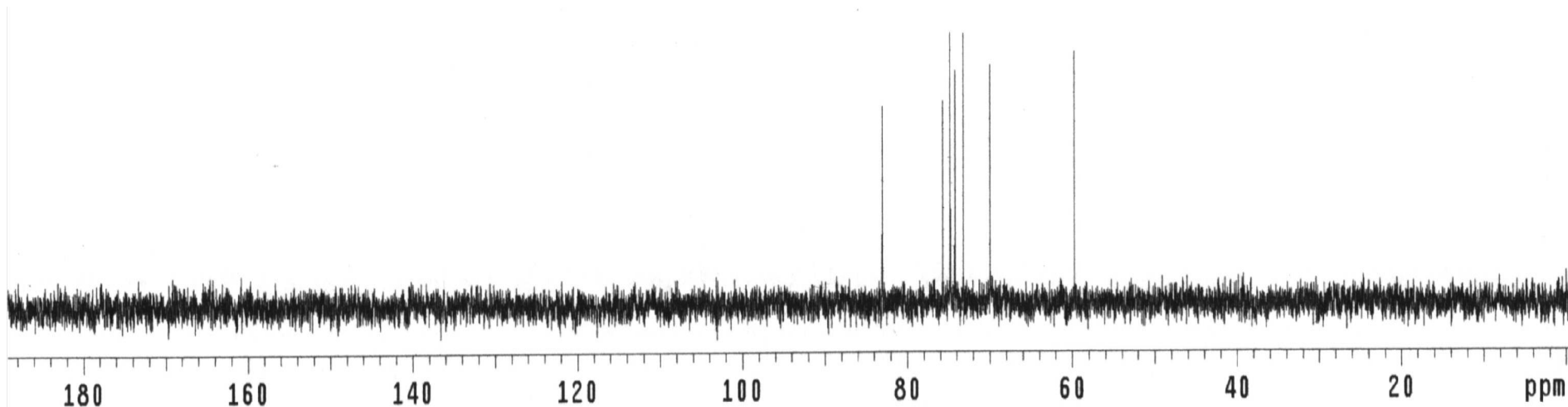
Anexo 18: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.



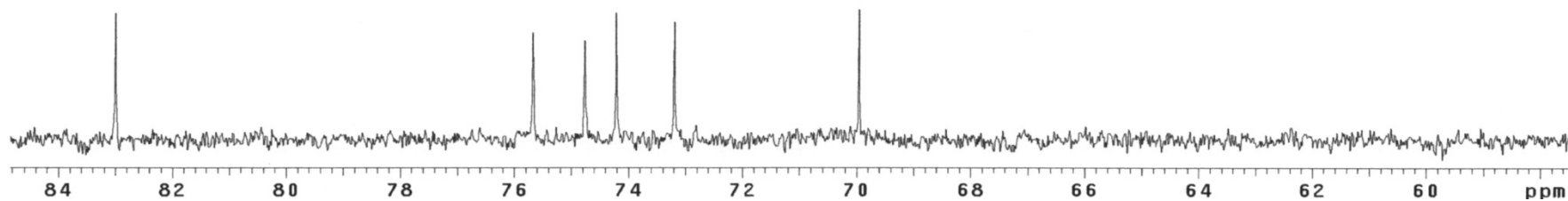
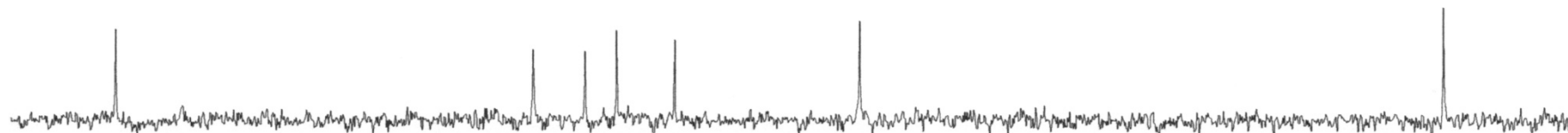
Anexo 19: Espectro de RMN2D COSY (^1H - ^1H , δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-5.



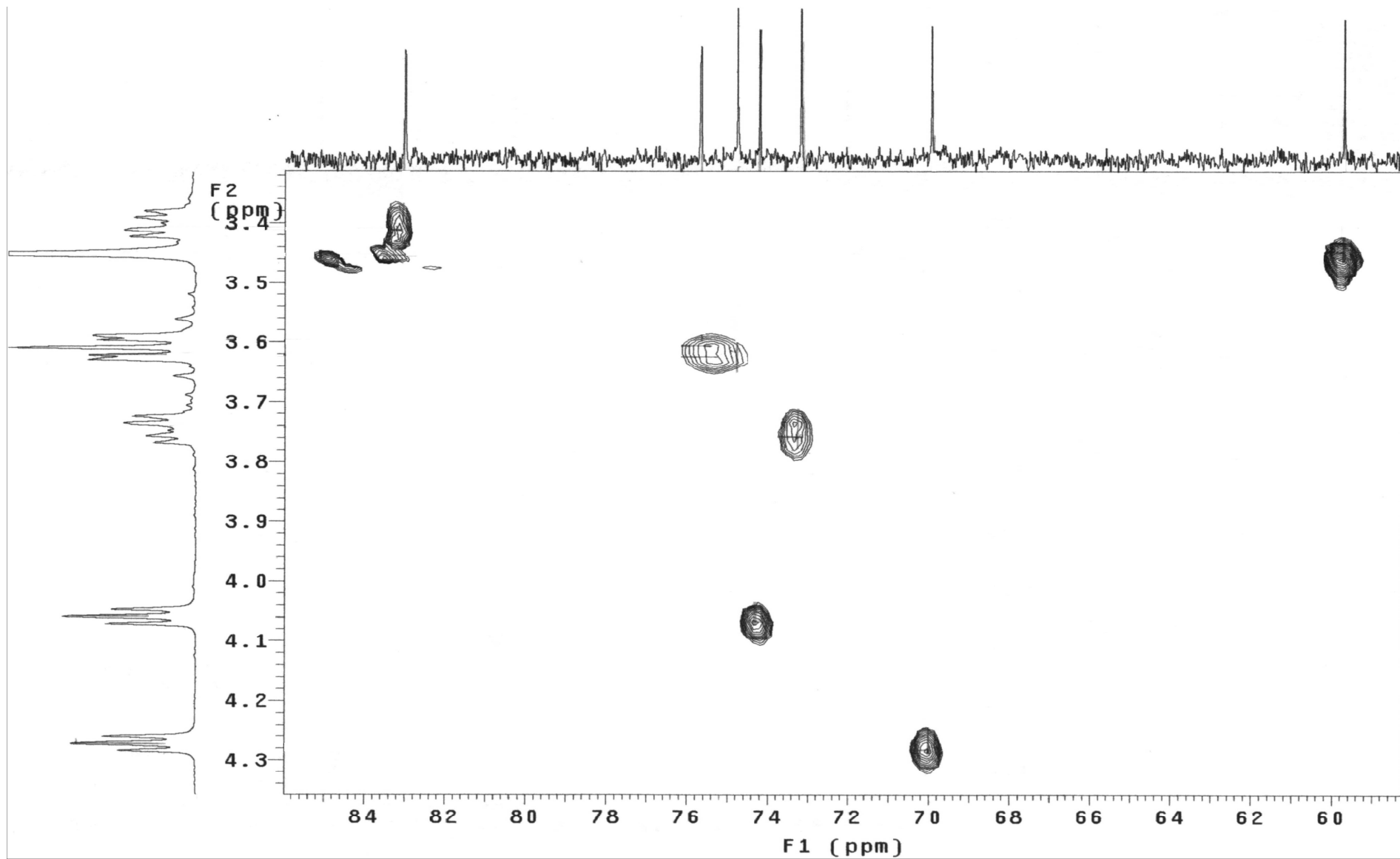
Anexo 20: Espectro de RMN ¹H (δ, D₂O, 300 MHz) de SG-6.



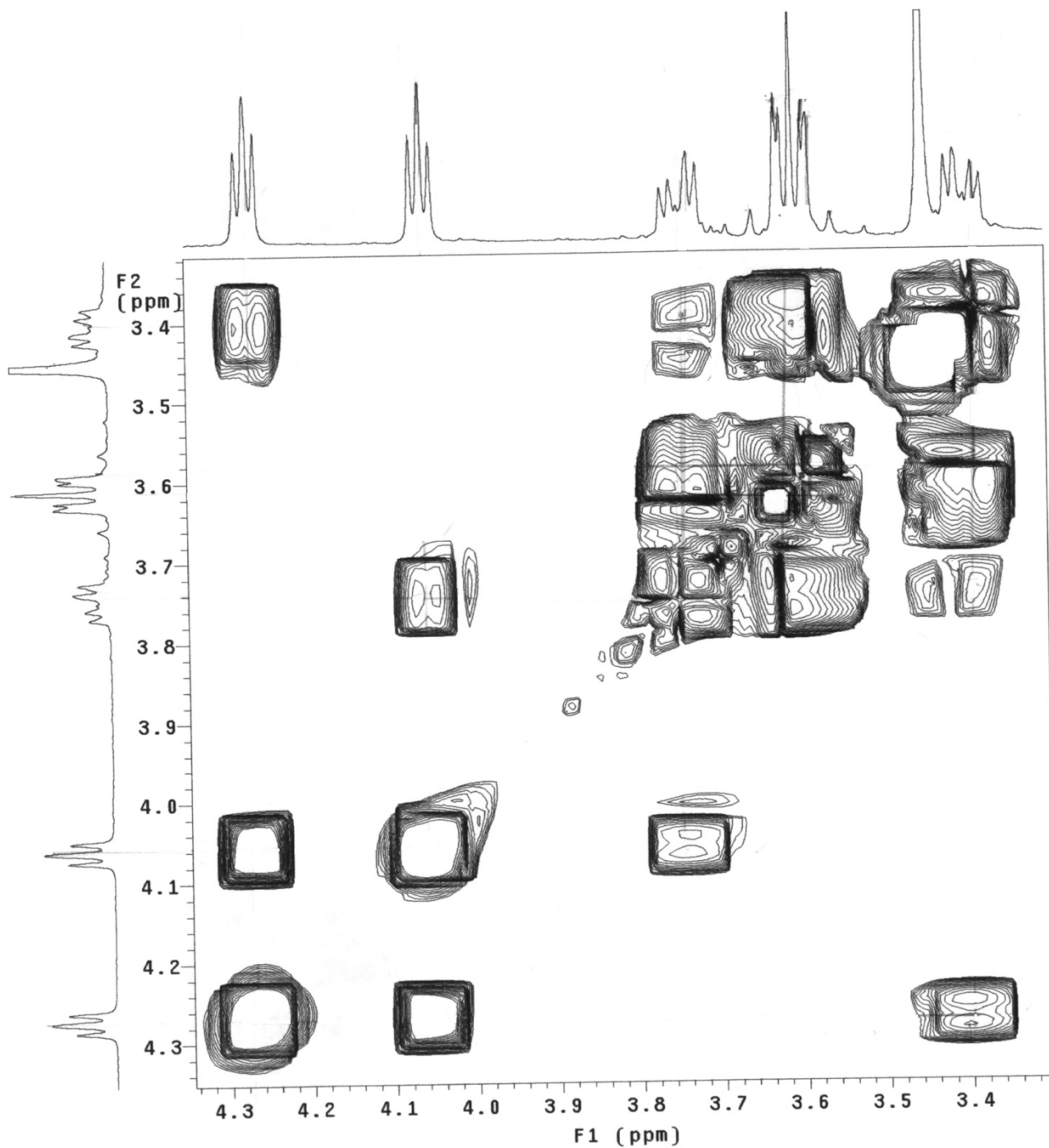
Anexo 21: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.



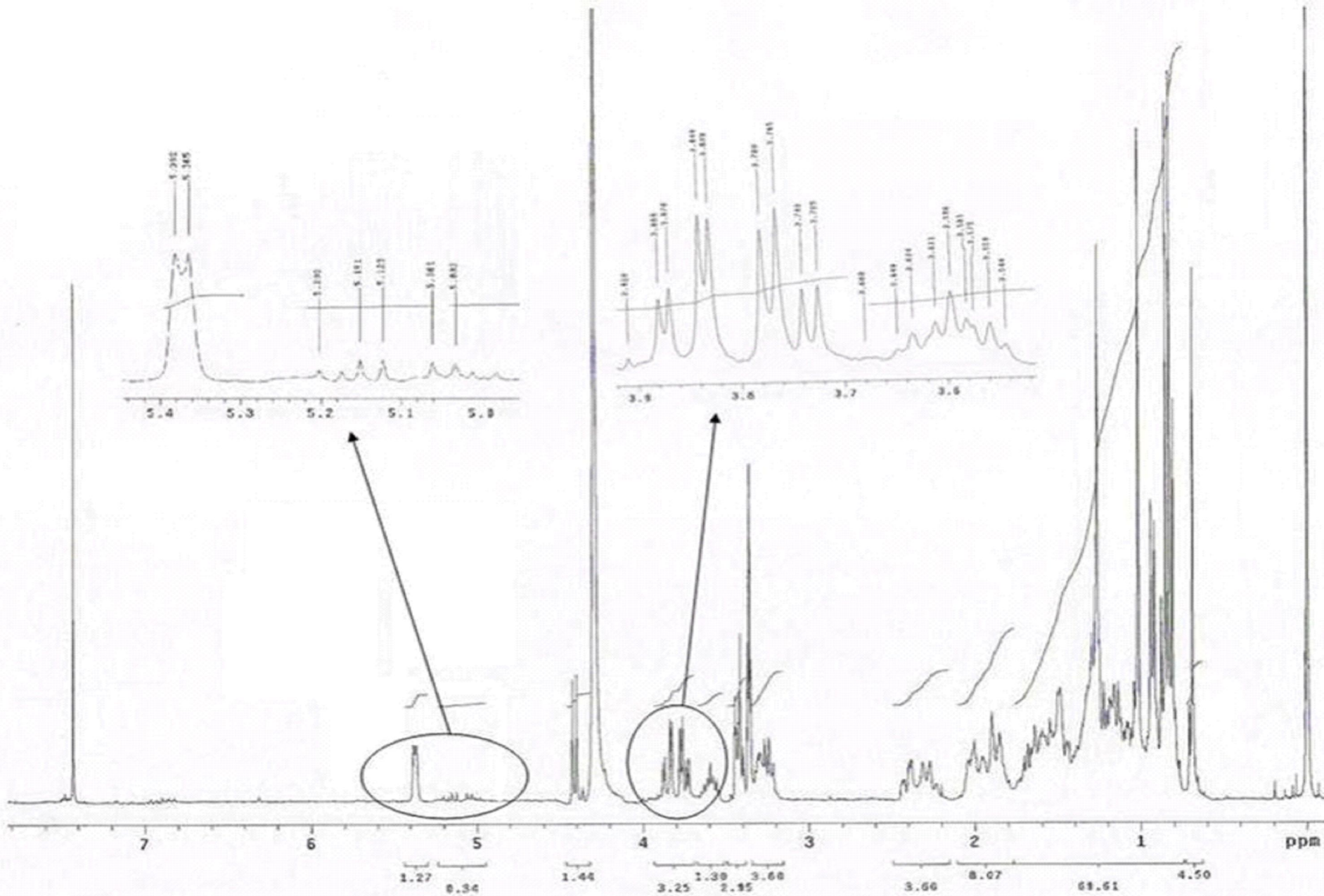
Anexo 22: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.



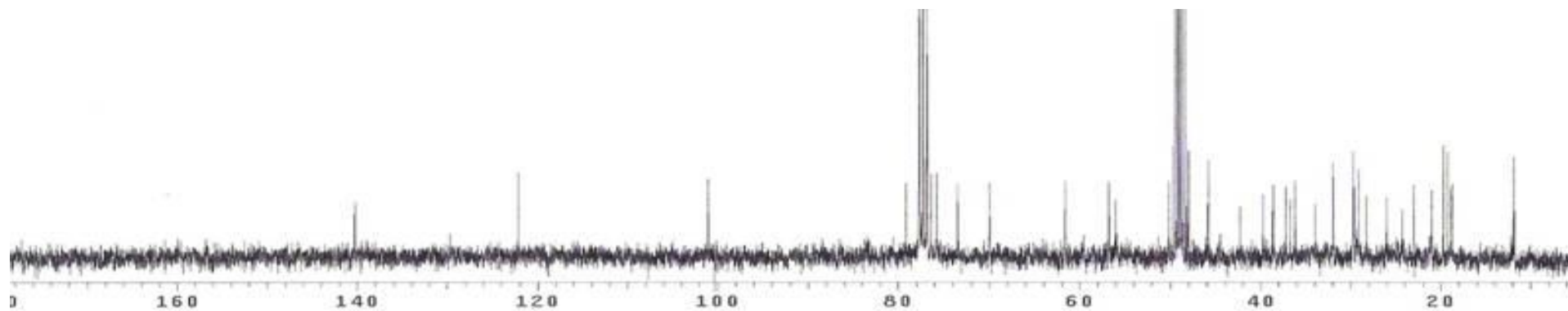
Anexo 23: Espectro de RMN2D HMQC (^1H - ^{13}C , δ , D_2O , 75,5 MHz) de SG-6.



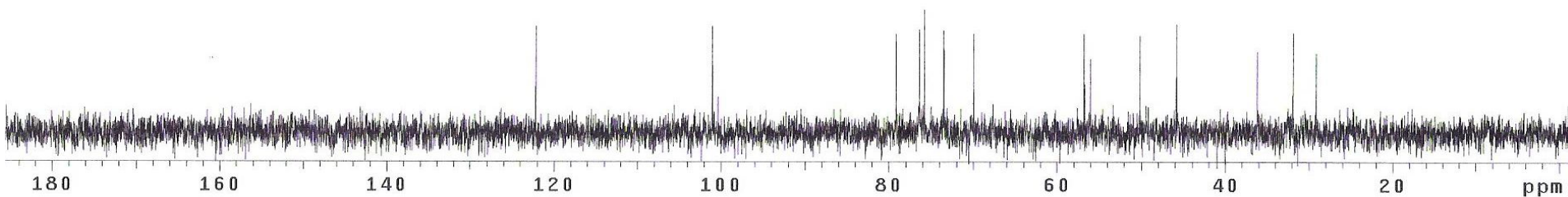
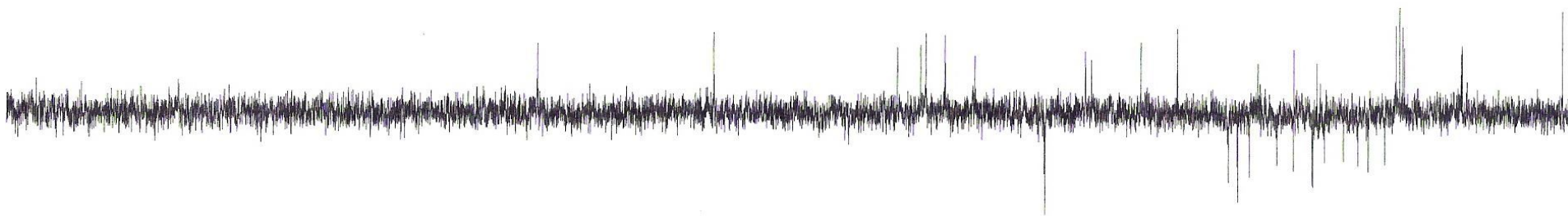
Anexo 24: Espectro de RMN2D COSY-45 (^1H - ^1H , δ , D_2O , 300 MHz) de SG-6.



Anexo 25: Espectro de RMN ¹H (δ, CDCl₃, 300 MHz) de SG-7.



Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C -45 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-7.



Anexo 27: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 90 e 135 (δ , CDCl_3 , 75,5 MHz) de SG-7.

5. BIBLIOGRAFIA

1. *Gênero Callophyllum: Importância Química e Farmacológica*. **Noldin, Vania Floriane, Isaias, Daniela Buffon e Filho, Valdir Cechinel**. s.l. : Química Nova, 2006, Vol. 29. 03.
2. *Plantas Mediciniais: Cura Segura?* **Veiga Jr, Valdir F e Pinto, Angelo C.** 03, s.l. : Química Nova, 2005, Vol. 28. 519/528.
3. Fitoterapia. *Curupira*. [Online] Site Curupira, 2008. www.sitecurupira.com.br.
4. *Guia de Plantas Mediciniais*. [http://www.unb.br/iq/labpesq/lateq/projetos_concluidos_ito_gia_de_plantas_mediciniais.htm] Brasília : Universidade de Brasília, 2006. 26/03/2006 às 16 h.
5. **Neto, G G e Santana, S R**. *Familia Sapindaceae para a Flora do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil*. Cuiabá, MT : Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.
6. **Neto, Germano Guarim e Santana, Santine Rodrigues**. A Família Sapindaceae para a Flora do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá/ MS : III Simposio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal, 2000. 27 a 30 de novembro de 2000.
7. **Tsuzuki, Joyce K; Svidzinski, Terezinha I. E.; Shinobu, Cristiane S.; Silva, Luiz F. A.; Filho, Edson Rodrigues; Cortez, Diogenes A. G.; Ferreira, Izabel C. P.;** Antifungal Activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro, RJ : Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2007. Vol. 79, 4. ISSN 0001/3765.
8. **Chávez, Maria Isabel e Delgado, Guillermo**. Isolation and Relay Syntesis of 11a-Hydroperoxy Diacetyl Hederagenin, a Novel Triperpenoid Derivative form *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic Implications. *Tetrahedron*. 13, 1994, Vol. 50, 3969-3878.

9. **Jayashinghe, Lalith, et al.** Hederagenin Glycosides from *Pometia eximia*. *Phytochemistry*. 3, 1995, Vol. 40, 891-897.
10. **Lavaud, C, et al.** Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elatostachys apelata*. *Phytochemistry*. 2001, Vol. 57, 469-478.
11. **Arulmozhi, D. K., et al.** Pharmacological studies of the aqueous extract of *Sapindus trifoliatus* on central nervous system: possible antimigraine mechanisms. *Journal of Ethno-Pharmacology*. 2005, Vol. 97, 491-496.
12. **Huang, Hui-Chi, et al.** Molluscicidal Saponins from *Sapindus mukorossi*, Inhibitory Agents of Golden Snails, *Pomacea canaliculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, Vol. 51, 4916-4919.
13. **Voutquenne, Laurence, et al.** Saponins from *Harpullia cupanioides*. *Phytochemistry*. 7, 1998, Vol. 49, 2081-2085.
14. **Voutquenne, Laurence, et al.** Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. *Phytochemistry*. 2003, Vol. 64, 781-789.
15. **Voutquenne, Laurence, et al.** Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia austro-caledonica*. *Phytochemistry*. 2005, Vol. 66, 825-835.
16. **Ekabo, Opinya A., et al.** Antifungal and Molluscicidal Saponins from *Serjania salzmanniana*. *Journal of Natural Products*. 1996, Vol. 59, 431-435.
17. **Aichholz, R., Spitzer, V. e Lorbeer, E.** Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from sapindaceae seed oils with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1997, Vol. 787, 181-194.
18. **Spitze, Volker.** Fatty Acid Composition of Some Seed Oils of the Sapindaceae. *Phytochemistry*. 5, 1996, Vol. 42, 1357-1360.

19. **Avato, P., et al.** Seed Oil Compositon of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Lipids*. 7, 2003, Vol. 38, 773-781.
20. **Cronquist, Arthur.** *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York : Columbia University Press, 1981. 1ª edição.
21. **Ambiental, Centro de Referencia em Informação.** Flora Brasiliensis. *Flora Brasiliensis*. [Online] CRIA, 2005. [Citado em: 27 de Março de 2008.] <http://florabrasiliensis.cria.org>.
22. **Queiroz, Alexandre J. de M., et al.** Comportamento reológico de méis de florada de silvestre. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2, 2007, Vol. 11, 190-194.
23. **Lima, Micheline de Azevedo.** *Estudo Fitoquímico das Raízes de Himatanthus phagedaenicus (Mart) Woodson (Apocynaceae) e Efeito Psicofarmacológico do Extrato Etanólico Bruto das Raízes de Serjania glabrata Kunth (Sapindaceae)*. [http://www.biblioteca.ufpb.br/catalogo_96_2000/campus1/prod99.htm] Paraíba : Universidade Estadua da Paraíba, 2008.
24. **Oliveira-Filho, Eduardo C. e Paumgarttrn, Francisco J. R.** Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Sanails and Nontarget Aquatic Species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, Vol. 46, 342-350.
25. **Silva, Tania M. S., et al.** Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino abd hydrogenated derivatives. *ioorganic & Medicinal Chenistry*. 2005, Vol. 13, 193-196.
26. **Organization, World Health.** World Health Organizations. *Schistosomiasis*. [Online] WHO, 2008. [Citado em: 25 de Fevereiro de 2008.] <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>.

27. **Bilia, Anna Rita, et al.** Molluscicidal and Piscicidal Activities of Venezuelan Chrysobalanaceae Plants. *Life Sciences*. 4, 2000, Vol. 66, 53-59.
28. **Ndamba, Jerikias, Lemmich, Else e Molgaards, Per.** Realease of Molluscicidal Saponins from *Phytolacca dodecandra* Aqueous Berry Extracts as Influenced by the Male Plant and teh Extration Procedure. *Biochemical Systematics and Ecology*. 3, 1994, Vol. 22, 249-257.
29. **Dey, P. M. e Harborne, J. B.** *Metθος in Plant Biochemistry*. s.l. : Academic Press.
30. **Mahato, S B e Kundu, A P.** *Phytochemistry*. 37, 1994, 1517.
31. **Voutequenne, L, et al.** Saponins from *Harpullia cupanioides*. *Phytochemistry*. 7, 1998, Vol. 47, 2081-2085.
32. **Sureshan, Kana M., Miyasou, Tomomi e Watanabe, Yutaka.** Total syntesis of the proposed atruture of 'brahol' and the structural revision. *Tetrahedron Letters*. 2004.
33. **Matida, A.K., et al.** 3-a-O-b-glucopyranosytosterol in Species os Labiatae, Verbanaceae and Apocynaceae. *Associação Brasileira de Quimica*. 45, 1996, Vol. 3.
34. **Noldin, V. F., Isaias, D. B. e Filho, C. V.** s.l. : Quimica Nova, 2006.
35. **Simões, C. M. O.;** *Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre / Florianópolis : Editora UFSC, 1999.
36. **Lavaud, Catherine, et al.** Triperpenoid saponins from stem bark of *Elattostachys apetala*. *Phytochemistry*. 2001, Vol. 57, 469-478.