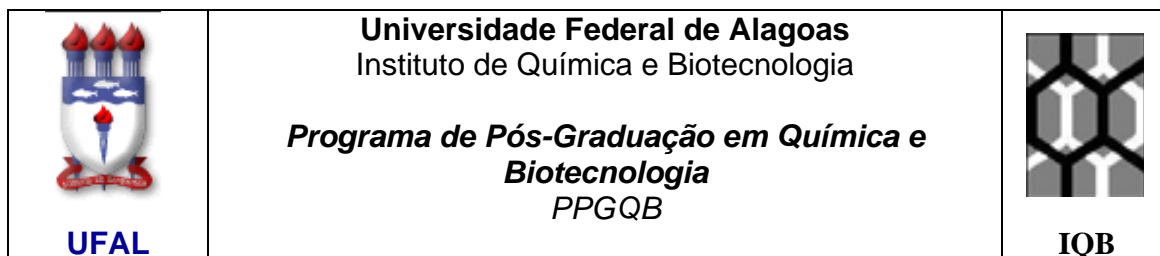


**Universidade Federal de Alagoas - UFAL
Instituto de Química e Biotecnologia – IQB
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia - PPGQB**

Estudo fitoquímico da espécie *Serjania lethalis* St. Hil

EDJANE VIEIRA PIRES

**Maceió
2008**



Estudo fitoquímico da espécie *Serjania lethalis* St. Hil

EDJANE VIEIRA PIRES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr.: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió/AL

2008

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

P667e Pires, Edjane Vieira.
Estudo fitoquímico da espécie *Serjania lethalis* St. Hil / Edjane Vieira Pires.
– Maceió, 2008.
xi, 90 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant' Ana.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. 81-90.

1. *Serjania lethalis*. 2. Plantas medicinais – Brasil. 3. Produtos naturais.
4. Esquistossomose. 5. Moluscidas. I. Título.

CDU: 547.9



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Edjane Vieira Pires intitulada: “**Estudo Fotoquímico da Espécie *Serjania lethalis* St. Hil**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 3 de abril de 2008, às 9hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Janesmar Camilo Cavalcanti
UNEAL

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
PPGQB/IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pelo conhecimento transmitido, apoio, estímulo, paciência e orientação;
- À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de mestrado;
- Aos professores do Instituto de Química e biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelos ensinamentos a mim repassados;
- Ao professor Edson de Souza Bento pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear;
- A professora Lúcia Maria Cunha Rebouças pelo incentivo;
- Aos companheiros de laboratórios e amigos da Universidade Federal de Alagoas, Amélia, Ana Lucila, Beatriz, Cenira, Cristhiane, Daniel, Emilia, Milena, Natália e todos que mesmo indiretamente contribuirão e apoiaram na minha formação como mestre;
- A professora Joseane de Souza Luna pelos ensinamentos, apoio e amizade;
- A Maria Raquel Ferreira de Lima por ser tão amiga e solidária para com todos;
- Ao Aldy, pelas tantas ajudas, carinho e amizade;
- Ao aluno de iniciação científica e amigo Leandro pela ajuda na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPÈCIAIS

*Ao grande Deus que
em tudo me faz
capaz.*

Dedico este trabalho aos meus pais que em todos os momentos da minha vida se fazem presentes, me apoiando e ajudando sempre que preciso. Eles são sem dívida meus melhores amigos.

Ao meu amado esposo pelo carinho, companheirismo e compreensão de todos os dias.

Ao meu fruto mais abençoado: meu querido Nicolás.

SUMÁRIO

Lista de abreviatura	iii
Lista de figura	iv
Lista de fluxograma	v
Lista de tabela	vi
Justificativa	viii
Resumo	ix
Abstract	x
Objetivo	xi
INTRODUÇÃO	
1.1- Considerações gerais sobre plantas medicinais	1
1.2 -Considerações gerais sobre algumas técnicas de separação	4
1.2.1 -Processos de separação com membranas	5
1.2.2-Classificação dos processos de separação com membranas	9
1.2.3- Generalidades sobre a fabricação de membranas	11
1.2.4- Equilíbrio de diálise	13
1.3 - Esquistossomose	14
1.4 -Breve consideração sobre antimicrobianos	16
1.5 -Aspectos gerais sobre a família Sapindaceae	17
1.5.1 -Aspectos gerais sobre o gênero <i>Serjania</i>	20
1.5.2 -Aspectos gerais sobre a espécie <i>Serjania lethalis</i>	21
1.6- A presença de açúcares em plantas	24
1.7 -Saponinas: identificação e atribuições	25
1.7.1 -Saponinas triterpênicas	26
1.7.2 -Saponinas esteroidais	28
2. EXPERIMENTAL	
2.1- Especificações gerais dos materiais e equipamentos	30
2.2- Material vegetal	32
2.2.1- Preparação dos extratos	32
2.2.2 Partição líquido-líquido do extrato bruto da <i>Serjania lethalis</i>	33
2.3- Atividade moluscicida	34
2.3.1- Ensaio biológico	34
2.3.2- Análise estatística	35
2.3.3 Teste esquistossomicida	35
2.3.4 <i>Schistosoma mansoni</i>	35
2.3.5 Obtenção das formas evolutivas do parasito	36
2.4- Atividade antimicrobiana	36
2.4.1- Microrganismos utilizados nos testes	36
2.4.2- Preparação das amostras da <i>Serjania lethalis</i>	36
2.4.3- Preparação e padronização dos discos	37
2.5- Determinação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos aeróbios.	37
2.5.1 -Microrganismos	37
2.5.2-Cultura dos microrganismos	37
2.5.3-Padronização do inóculo	38
2.5.4- Método	38

2.5.5- Leitura	38
2.6 Pospecção fitoquímica dos extratos	38
2.6.1-Teste para fenóis e taninos	39
2.6.2- Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	39
2.6.3-Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	40
2.6.4-Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	40
2.6.5- Teste para esteróides e triterpenóides	40
2.6.6-Teste para saponinas	41
2.6.7-Teste para alcalóides	41
2.6.7.1-Composição química do reagente de dragendorff	41
2.6.8-Teste para antraquinonas, antronas e coumarinas	42
2.7 -Isolamento e purificação dos constituintes químicos da <i>Serjania</i> <i>lethalis</i>	42
2.71-Filtração em carvão ativo	43
2.72-Fracionamento em fase reversa C-18	46
2.72.1-Preparação da fase reversa	47
2.72.2-Avaliação da ação da fase reversa	47
2.72.3-Escala preparativa	48
2.8-Separação por diálise	49
2.9-Partição líquido-líquido da fração hidrometanólica do caule de <i>Serjania lethalis</i>	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
3.1 Avaliação da atividade moluscicida	53
3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	55
3.3 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	56
3.3.1 CLAE das frações provenientes da cromatografia em fase reversa C-18	56
3.3.2 CLAE das frações provenientes da diálise	58
3.4 Identificação estrutural das substâncias isoladas	59
3.4.1 Saponina SLS	60
3.4.2 Dissacarídeo SLD	71
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₉₀	Concentração letal para 90% de organismo alvo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Homonuclear Correlation spectroscopy
DEPT	“Distortionless enhancement by polarisation transfer”
HMBC	“Heteronuclear multiplebond coherence”
IC	Intervalo de Confiança
IR	Índice de Retenção Real
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMODS	PoliMetilOctaDecilSiloxano
PN	Produtos Naturais
QPN	Química dos Produtos Naturais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SSM	Sistema de Separação com Membranas
V _o	Volume Intersticial
V _i	Volume do Poro
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Biodiversidade brasileira	1
FIGURA 2- Estrutura química do iridóide conhecido como plumerídeo (agoniadina)	2
FIGURA 3 Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas	3
FIGURA 4- Representação microscópica do gel. (A) Estrutura microscópica das esferas do gel polimérico empacotado, V_o é o volume intersticial, V_i é o volume do poro e a porção preta é a matriz do gel. (B) Estrutura polimérica do gel de dextran hidroxipropilado com cadeias entrecruzadas	5
FIGURA 5 Processo geral de separação com membrana	6
FIGURA 6- Filtração perpendicular e tangencial	8
FIGURA 7 Figura comparativa entre processos clássicos de separação e processos com membranas em função das espécies a serem separadas	11
FIGURA 8- Ilustração da técnica de equilíbrio de diálise utilizando membrana na forma de bolsa	14
FIGURA 9 – Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	15
FIGURA 10 Saponinas com ação moluscicida	16
FIGURA 11 Distribuição geográfica de espécies pertencentes a família Sapindaceae	18
FIGURA 12- (1) Xantana; (2) Sorbitol; (3) Dextrana	25
FIGURA 13- Esqueletos triterpênicos pentacíclicos mais comuns	27
FIGURA 14- Alguns esqueletos estruturais envolvendo as saponinas triterpênicas	28
FIGURA 15– Teste moluscicida – caramujo adulto	35
FIGURA 16- Fórmula estrutural do polímero PMDS	47
FIGURA 17– Representação esquemática da reação de imobilização de PMDS em sílica	48
FIGURA 18– Exemplo da separação analítica das frações 5 e 10 % provenientes da cromatografia em coluna aberta com C-18	57
FIGURA 19-Substância isolada à partir do cromatograma demonstrado na Figura 18	57
FIGURA 20- Substância isolada a partir do cromatograma demonstrado na Figura 18.	58
FIGURA 21- (a)Exemplo da separação analítica da fração 1(b) e isolamento da substância 1	59
FIGURA 22 – (1) saponina 3-O- [β - O- galactopiranosil (1-4) α - ramnopiranosil (1 - 2) α - ramnopiranosil. (2) Sapogenina corretamente enumerada	61
FIGURA 23- Espectro de RMN de hidrogênio em CD_3OH a 400 MHz da substância saponina 3-O- [β - O- galactopiranosil (1 - 4) α - ramnopiranosil (1- 2) α - ramnopiranosil, padrão interno TMS	65
Figura 24- Espectro de RMN de carbono em CD_3OH a 100 MHz da substância saponina 3-O- [β - O- galactopiranosil (1 - 4) α - ramnopiranosil (1- 2) α - ramnopiranosil, padrão interno TMS	66

FIGURA 25-Espectro de RMN de DEPT 135° em CD ₃ OH a 100 MHz da substância saponina 3-O- [β- O- galactopiranosil (1 - 4) α- ramnopiranosil (1- 2) α- ramnopiranosil, padrão interno TMS	67
FIGURA 26– Mapa de contornos HSQC da substância saponina 3-O- [β- O- galactopiranosil (1 - 4) α- ramnopiranosil (1- 2) α- ramnopiranosil	68
FIGURA 27– Mapa de contornos COSY da substância saponina 3-O- [β- O- galactopiranosil (1 - 4) α- ramnopiranosil (1- 2) α- ramnopiranosil	69
FIGURA 28– Mapa de contornos HMBC da substância saponina 3-O- [β- O- galactopiranosil (1 - 4) α- ramnopiranosil (1- 2) α- ramnopiranosil	70
FIGURA 29 - Estrutura química da da Sucrose e O-β-D-frutofuranosil-(2- 6)-D-glicose	72
FIGURA 30- Substância isolada identificada como O-β-D-frutofuranosil-(2 4)-D-glicose	73
FIGURA 31– Espectro de RMN de hidrogênio em CD ₃ OH a 100 MHz da substância O-β-D-frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose, padrão interno TMS	74
FIGURA 32– Espectro de RMN de carbono em CD ₃ OH a 100 MHz da substância O-β-D-frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose, padrão interno TMS	75
FIGURA 33– Espectro de RMN de DEPT 135° em CD ₃ OH a 100 MHz da substância O-β-D-frutofuranosil-(2 4)-D-glicose, padrão interno TMS	76
FIGURA 34– Mapa de contornos HSQC da substância O-β-D- frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose	77
FIGURA 35– Mapa de contornos COSY da substância O-β-D- frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose	78
FIGURA 36– Mapa de contornos HMBC da substância O-β-D- frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose	79

LISTA DE FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA 1- Procedimentos gerais empregados neste estudo	33
FLUXOGRAMA 2- Fracionamento com acetona	42
FLUXOGRAMA 2 – Filtração em carvão ativo	44
FLUXOGRAMA 4 – Diálise como método alternativo de separação	50
FLUXOGRAMA 5 – Partição butanólica	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Processos de separação por membranas	10
TABELA 2- Exemplos de materiais utilizados na fabricação de membranas de osmose inversa, ultrafiltração e separação de gases	12
TABELA 3- Lista das espécies vasculares registradas na Reserva Ecológica do IBGE	21
TABELA 4- Características etnobotânicas da <i>Serjania lethalis</i>	22
TABELA 5- Obtenção de extratos envolvendo casca da madeira, folha e caule da <i>S. lethalis</i>	33
TABELA 6- Microrganismos utilizados no ensaio microbiológico	36
TABELA 7- Extratos e frações trabalhadas para o bioensaio	37
TABELA 8- CCDA das frações provenientes da cromatografia em sephadex LH- 20	45
TABELA 9- Reunidas das frações provenientes da coluna de cromatografia em sephadex LH- 20 da fração 4-7 (300mg)	46
TABELA 10- Gradiente de eluição da cromatografia em sílica C-18	49
TABELA 11- Gradiente de eluição da cromatografia em sílica desativada	50
TABELA 12- CCDA das frações provenientes da cromatografia em sílica desativada	51
TABELA 13- Classes de compostos detectados nas frações trabalhadas para purificação	53
TABELA 14- Atividade frente ao caramujo <i>B. glabrata</i>	54
TABELA 15 - Resultados da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais frente a <i>Candida albicans</i>	55
TABELA 16 - Resultados da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
TABELA 17 - Dados de RMN da substância SLS	63
TABELA 18 - Dados de RMN da substância SLD.	71
TABELA 19 - Dados de RMN C ¹³ da sacarose e O- α -D-frutofuranosil-(2-6)-D-glicose em comparação a substância SLD	73

JUSTIFICATIVA

O interesse na busca por agentes esquistossomicidas de origem natural é objeto de intenso estudo do nosso grupo de pesquisa há muitos anos. No estado de Alagoas, observa-se a existência e manutenção da esquistossomose em níveis elevados. Aproximadamente 63% da superfície do Estado de Alagoas correspondem a área endêmica para a esquistossomose (LIMA, 1999). O estudo realizado por SANTOS (2005), envolvendo 69 espécies de plantas, que incluía extratos de *Serjania lethalis* St. Hil serviu como fator decisivo para a escolha desta planta. O extrato etanólico do caule foi escolhido para estudo fitoquímico, tendo em vista sua significativa atividade , moluscicida ($CL_{90} = 65,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $CL_{50} = 7,38 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 96 hs) e miracicida com 100% de mortalidade do miracídeos quando expostos por 1h a uma solução aquosa numa concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico (SANTOS, 2005). O trabalho aqui descrito envolve um método de separação alternativo, com o uso de membranas sintéticas que proporcionaram a diálise das frações em acetato de etila e hidrometanólica, obtidas após partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto (caule). Estas também apresentaram atividade antibiótica relatada por LIMA et al., 2002.

RESUMO

A biodiversidade brasileira considerada uma das maiores do mundo ainda é pouco conhecida e muito pouco explorada quanto ao uso como fonte de medicamentos. Na busca de novas moléculas bioativas o extrato etanólico do caule da *Serjania lethalis* St. Hil foi estudado na busca do princípio ativo responsável pela atividade moluscicida, miracicida e esquistossomicida.

A espécie *S. lethalis* foi coletada em Brasília e uma exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Brasília sob o número JEP 3698 UB. Após seco e reduzido a pó o caule de *S. lethalis* foi extraído com etanol em um aparelho do tipo Soxhlet. O extrato etanólico bruto do caule foi extraído, a frio, com acetona. A fração acetônica (solúvel) foi purificada por meio de partição em carvão ativo e permeação em gel sephadex LH 20 e adicional cromatografia em placa de camada preparativa para a obtenção da saponina codificada como SLS.

Um método de separação alternativo, envolvendo o uso de membranas sintéticas que proporcionam diálise foi utilizado para as frações hidrometanólica e em acetato de etila provenientes da partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto (caule), devido à atividade antibacteriana observada. Após a diálise a purificação foi realizada, com utilização de técnicas cromatográficas como cromatografia em coluna de sílica desativada e posterior purificação em coluna de Sephadex para chegar a substância SLD. A fração em butanol obtida da partição líquido-líquido foi ativa frente ao molusco *Biomphalaria glabrata* com CL_{90} $10,62 \mu\text{gmL}^{-1}$ em 24 horas. A fração solúvel em acetona apresentou excelente halo de inibição frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Ao final as estruturas químicas das substâncias puras 3-O- [β - O- galactopiranosil (1 \rightarrow 4) α - ramnopiranosil (1 \rightarrow 2) α - ramnopiranosil (**SLS**) e O- β -D-fructofuranosil-(2 \rightarrow 4)-D-glucose (**SLD**) foram propostas com base em dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional (RMN H^1 , RMN C^{13} , DEPT 135°) e bidimensional (COSY, HSQC e HMBC). O teste *in vitro* demonstrou que a substância codificada como SLS foi ativa frente ao *S. mansoni*.

ABSCTRAT

The Brazilian biodiversity is considered one of the highest in the world, and is a bit known and explored as the source of drugs and medicines. In search of new bioactive molecules, the ethanolic extract of the stem of *Serjania lethalis* St. Hil was studied for its molluscicide, miracidicide and schistosomicidal activity. The species *S. lethalis* was collected in Brasília and a voucher is deposited in the Herbarium of the Federal University of Brasília under the number JEP 3698 UB. After being dried and reduced to powder, the stem of *S. lethalis* was extracted in a Soxhlet apparatus with 95% ethanol. The crude ethanol extract of the stem was extracted, at low temperature, with acetone. The soluble fraction in acetone was purified through filtration on active charcoal and permeation on Sephadex gel LH 20 and an additional preparative chromatographic plate for the obtention of saponin, codified as SLS. An alternative method of separation involving the use of synthetic membranes that provide dialysis was used for the hydromethanolic and ethyl acetate fractions obtained from the partition of the liquid-liquid crude ethanol extract (stem). Due to the antibacterial activity observed after dialysis, further purification was made, using chromatography techniques on a column with deactivated silica and subsequent purification on a Sephadex LH 20 column to obtain the SLD substance. The butanolic fraction obtained from liquid-liquid partition was active against *Biomphalaria glabrata* with CL_{90} 10,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 24 hours. The fraction soluble in acetone showed excellent inhibition halo against *Pseudomonas aeruginosa*. The chemical structures of pure substances SLS, 3-O-[β -O-galactopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α -D-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -D-rhamnopyranosyl and SLD, O- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 4)-D-glucose were proposed based on data from unidimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135) and two-dimensional (COSY, HSQC and HMBC). The *in vitro* test showed that the substance codified as SLS was active against *S. mansoni*.

OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo:

Isolar e identificar substâncias ativas contra o molusco *Biomphalaria glabrata* e contra o *Schistosoma mansoni* presente no extrato etanólico da *Serjania lethalis* St. Hil.

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é um dos 14 países com maior biodiversidade mundial contendo mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra. Das plantas floríferas conhecidas, aproximadamente 55.000 espécies, cerca de 22% destas ocorrem no Brasil, principalmente nas regiões da floresta amazônica, mata atlântica e cerrado (Figura 1) (<http://www.sbg.org.br/PN-NET/> 06/12/2007).

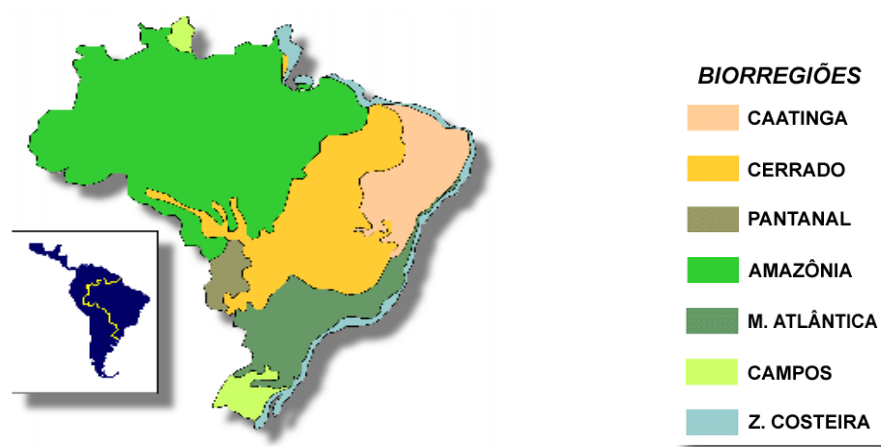


Figura 1- Biodiversidade brasileira (<http://www.sbg.org.br/PN-NET/> 06/12/2007)

A biodiversidade brasileira, abriga cerca de 13,6% de todas as espécies vegetais vivas do planeta segundo estimativas mais recentes (<http://www.sbg.org.br/PN-NET/> 06/12/2007). Nela encontram-se várias espécies de plantas ainda desconhecidas e que precisam ser classificadas quanto a sua taxonomia biológica, com objetivo de mostrar as inter-relações filogenéticas dos agrupamentos biológicos. As florestas da região amazônica concentram grande variedade de formas de vida do planeta, sendo que apenas 30% são conhecidas da ciência, particularmente quanto as suas propriedades biomedicinais (BIODIVERSIDADE MUSEU GOELDI, 2007).

Com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o Brasil não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais

(QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores. Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, muito cedo, foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas. Os viajantes sempre se abasteciam destes remédios antes de excursionarem por regiões pouco conhecidas. (PINTO et al., 2002).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é especialmente difundido em áreas rurais para o tratamento de muitas doenças. Os estudos são focalizados em antiinflamatórios, antimicrobianos e na atividade antitumoral/citotóxica de algumas espécies de plantas (HOLETZ et al., 2002; SUYENAGA et al., 2002). Um número extensivo de plantas de varias famílias encontradas no Cerrado brasileiro tem sido estudadas para avaliar sua eficácia e efeitos terapêuticos, além do isolamento de seus princípios ativos (NAPOLITANO et al., 2005).

O ano de 1874 pode ser considerado o ano do início dos estudos da QPN (Química de Produtos Naturais) numa instituição pública brasileira. Entre os muitos trabalhos de PECKOLTO (autor único da primeira farmacopéia brasileira) pode-se destacar o isolamento da substância de *Plumeria lancifolia*, que ele denominou de agoniadina. Este foi o primeiro iridóide a ser isolado da natureza em forma pura. Só 88 anos depois do seu isolamento teve sua estrutura química determinada. Hoje este iridóide, muito comum na família Apocynaceae, é conhecido como plumerídeo (Figura 2) (PINTO et al., 2002).

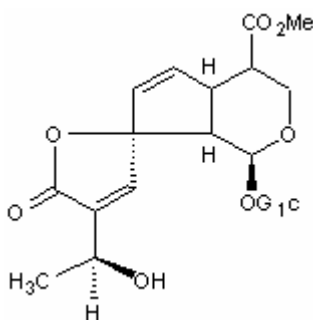
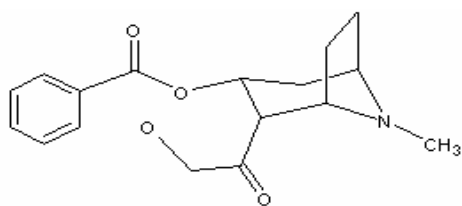


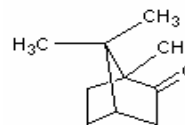
Figura 2- Estrutura química do iridóide conhecido como plumerídeo (agoniadina)

Foi a partir de estudos de planejamento racional que foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a

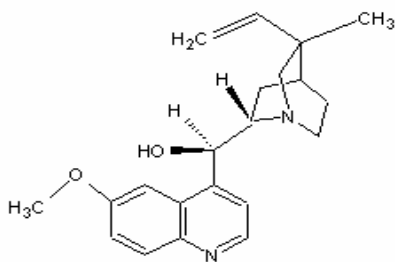
exemplo de morfina, quinina, cânfora, e cocaína, (Figura 3) (MONTANARI et al., 2001).



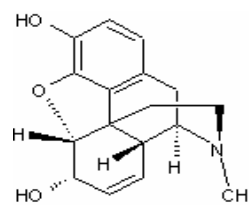
Cocaína



Cânfor



Quinina



Morfina

Figura 3 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas

MARTINS, 1995 cita que após a série de transformações tecnológicas que faz da planta medicinal uma droga vegetal, esta contém certo número de substâncias que, na maior parte dos casos, agem sobre o organismo humano. É a fitoquímica (química dos vegetais), que se encarrega de estudar estas substâncias ativas, a sua estrutura, a sua distribuição na planta, as suas modificações e os processos de transformação que se produzem no decurso da vida da planta, durante a preparação do remédio vegetal e no período de armazenagem.

A substância ativa não é unicamente um composto químico, mas apresenta também um equilíbrio fisiológico, é melhor assimilada pelo organismo e não deve provocar efeitos nocivos. É nisso que reside a grande vantagem da medicina natural ROCHA, 1998.

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ALGUMAS TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO

Dentre as varias técnicas cromatográficas preparativas disponíveis algumas tornaram-se clássicas, como a cromatografia em coluna e a cromatografia em camada delgada. A fase estacionária mais usada nestes casos é a sílica empregando a adsorção como mecanismo de separação. Porém, a grande dificuldade no uso da sílica é que, dos inúmeros constituintes das plantas, muitos são fortemente polares, tornando a separação pouco eficiente devido à forte interação destes compostos com a sílica. Por isso, nestes casos, são indicadas fases estacionárias de fase reversa obtidas através da funcionalização da sílica. As mais comuns existentes no mercado são a sílica C-8 e a C-18, entretanto, a utilização das mesmas para separações em escala preparativa é pouco viável devido ao alto custo. Uma fase estacionaria bastante empregada na cromatografia é o carvão ativo, por que proporciona um fracionamento característico para separações em fase reversa. O carvão ativo é uma fase estacionária sólida apolar e tende a adsorver os compostos de mesmo caráter, liberando primeiramente os constituintes mais polares.

Os suportes normalmente reservados para utilização como fase reversa são compostos de óxidos polares utilizados como suporte com grupos orgânicos apolares introduzidos na sua superfície. Existem varias formas de obter as camadas orgânicas apolares sobre a superfície dos óxidos. O método mais comum é a introdução de monocamadas orgânicas, via reação com reagentes apropriados, produzindo as chamadas fases quimicamente ligadas (TONHI et al., 2002).

Recentemente foi divulgada uma técnica simples de funcionalização de sílica, com polímero do tipo siloxano. Reagindo um polímero, como o Polimetiloctadecilsiloxano (PMODS-18 carbonos), com um suporte como a sílica, obtem-se uma fase estacionária com propriedades semelhantes às de sílica C-18 comercial (Figura 18, pg 48). A mesma reação pode ser realizada com o polímero polimetiloctilsiloxano (PMODS - 8 carbonos) (LEAL, 2006).

Um método de fracionamento escolhido quando os componentes da planta são bastante polares, e podem levar à adsorção irreversível, nos óxidos

como alumina e sílica normalmente empregadas é à cromatografia de exclusão, cuja separação é baseada no tamanho molecular. A resina mais utilizada é o Sephadex LH-20. Uma vantagem em relação a sílica é que esta resina possui uma característica dupla. Na sua estrutura existem grupos polares e apolares que, dependendo da polaridade do solvente de eluição, se comporta de maneira a provocar uma expansão ou contração tridimensional da esfera polimérica, alterando o tamanho dos poros de cada uma delas. Em solventes polares os canais se expandem de modo a se estreitarem. Em solventes apolares ocorre contração tridimensional e, assim, o alargamento dos canais.

A figura 4 ilustra: (A) a representação microscópica do gel empacotado e (B) a estrutura química do gel. As ligações entrecruzadas promovem uma maior resistência ao gel. As ligações entrecruzadas promovem uma maior resistência do gel e possibilitam o uso de solventes com polaridades diversas. A hidróxi- propilação confere ao gel a característica apolar enquanto que as unidades sacarídeas não protegidas conferem a característica polar (GUTERRES, 2005.)

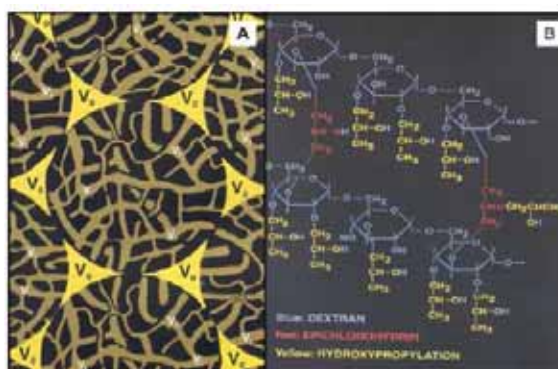


Figura 4- Representação microscópica do gel. (A) Estrutura microscópica das esferas do gel polimérico empacotado, V_o é o volume intersticial, V_i é o volume do poro e a porção preta é a matriz do gel. (B) Estrutura polimérica do gel de dextran hidroxipropilado com cadeias entrecruzadas. Fonte: GUTERRES, 2005.

1.2.1 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS

Separação com utilização de membranas ainda é pouco abordada na área da Química de Produtos Naturais. Um estudo relatado por CORRÊA, 2005

demonstra o uso de membranas de ultra e nanofiltração no fracionamento do extrato de Romã, um fruto da espécie *Punica granatum*. Neste estudo foi isolado da romã taninos com ação cicatrizante.

Os processos de separação por membranas são alternativas aos métodos clássicos de separação. “De uma maneira geral, uma membrana é uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases (HABERT et al., 1997). Conseqüentemente, a composição do material que passa através da membrana (permeado) é diferente daquele que não consegue atravessá-la (retido). Este processo é representado na Figura 5. Na grande maioria dos processos de separação com membranas uma diferença de pressão entre a corrente de alimentação e de permeado é que cria a força motriz para que ocorra a separação (CARLSON, 2006).

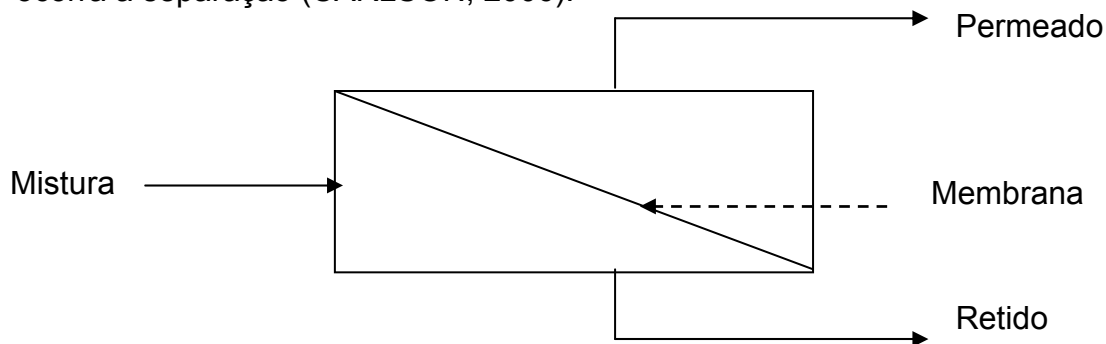


Figura 5 - Processo geral de separação com membranas.

A filtração com membranas tornou-se popular no início dos anos 60 quando as membranas assimétricas foram desenvolvidas. Antes disto, os processos com membranas eram dificilmente utilizados na indústria, devido ao baixo fluxo e a baixa seletividade com membranas grossas, além da dificuldade em preparar membranas e em fornecer equipamentos de baixo custo. Mas desde o surgimento da primeira membrana assimétrica a tecnologia de membranas evoluiu enormemente. Isto pode ser visto na vasta pesquisa desenvolvida na busca do tipo certo de membrana, no desenvolvimento de novos processos e nas melhores circunstâncias encontradas para cada processo de separação (BERG e SMOLDERS, 1988, CORRÊA 2005, EVARISTO et al., 2005). Embora as tecnologias de separação tenham a tendência de terem aplicações bastante específicas, os sistemas de separação com membranas (SSM) proporcionam custos menores, uma menor

manutenção e uma maior flexibilidade do que as antigas tecnologias. Sistemas com membranas necessitam de menos energia e são mais econômicos de operar. Os custos com manutenção e operação podem ser reduzidos, pois os SSM (Sistema de Separação por Membranas) possuem geralmente menos partes móveis e requerem um mínimo de atenção do operador. Vale lembrar que tempo para que ocorra a separação irá depender na membrana utilizada e da complexidade da mistura à separar. (BOWMAN e WEBER, 1986).

Os SSM também podem aumentar a qualidade do produto final. Na concentração de alimentos, os sistemas de separação com membranas podem produzir um alimento com um melhor sabor porque eliminam a necessidade dos atuais processos de evaporação nos quais o calor pode degradar os compostos que constituem o sabor do alimento.

Finalmente, as membranas podem executar separações muito difíceis que não eram possíveis com as tecnologias antigas. Na biotecnologia, por exemplo, vários processos clássicos de separação não podiam ser utilizados, pois as moléculas envolvidas são sensíveis ao calor. A habilidade destas membranas em separar simultaneamente, ou seletivamente, solutos orgânicos ou inorgânicos, de sistemas aquosos, sem a ocorrência de mudança de fase, proporciona uma substancial economia de energia e flexibilidade no projeto de processos de separação (HO e SIRKAR, 1992).

Os processos de separação com membranas são variados e se estendem desde a separação de partículas relativamente grandes e visíveis a olho nu até a separação de moléculas ou íons de pesos moleculares menores do que 100 g.mol^{-1} . Para o primeiro caso existe uma grande variedade de filtros cuja tecnologia já está bem desenvolvida e faz parte do cenário da indústria química há vários anos. Porém, a tecnologia utilizada para a remoção de partículas com apenas alguns microns ou para separação em nível molecular é relativamente nova (CARLSON, 2006).

Os padrões de fluxo são bastante diferentes dependendo do tamanho das partículas a serem separadas. Para operações de filtração normal, o fluxo é perpendicular à superfície do filtro, chamado de *dead-end filtration*, e todo o fluxo capaz de permear atravessa o meio filtrante. Quanto mais fluido passa pelo filtro, mais material retido se acumula sobre a superfície do mesmo, formando uma torta de filtração, causando assim uma progressiva

queda no fluxo até que atinja níveis muito baixos. Neste ponto o processo precisa ser interrompido, os sólidos removidos e então o processo é reiniciado. (CARLSON, 2006).

Para separação molecular ou de partículas pequenas, o fluxo tangencial ou *crossflow filtration* é utilizado, onde o fluxo de alimentação flui paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente a mesma. Neste caso, nem todo o fluido que pode permear através da membrana o faz, as espécies que não permeiam são na sua maioria concentradas ao longo do fluxo de retido, porém estas não se acumulam continuamente sobre a superfície da membrana, pois são constantemente arrastadas pela velocidade do fluxo de retido, permitindo a operação em processo contínuo, sem interrupção para limpeza, como mostra a Figura 6 (CARLSON, 2006)

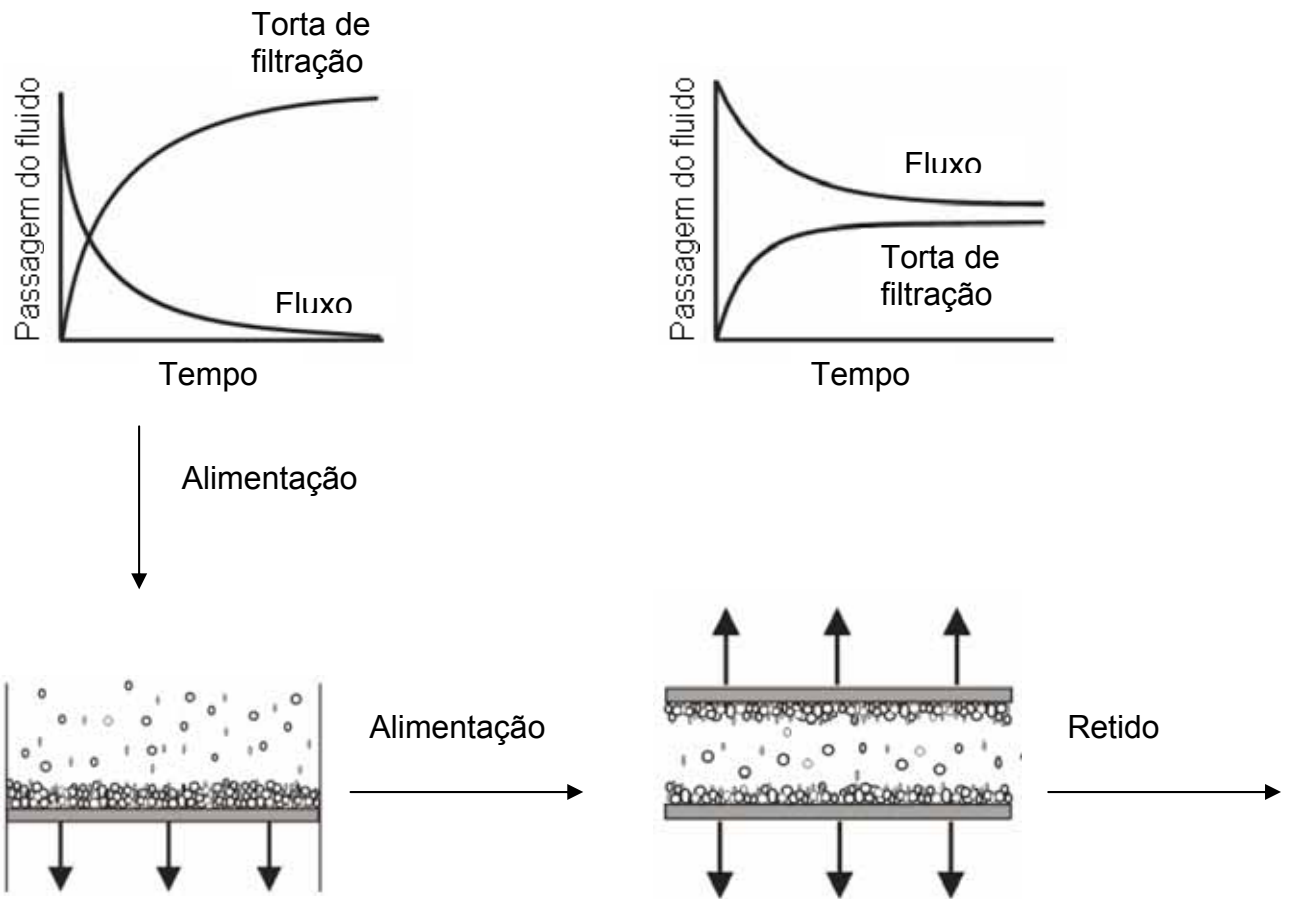


Figura 6 - Filtração perpendicular e tangencial.

Além dos padrões de fluxos, as propriedades de transporte, como, permeabilidade a gases e líquidos, bem como a sua capacidade seletiva, são utilizadas como parâmetros característicos dos processos. A capacidade

seletiva da membrana, dependendo do tipo de processo em questão, pode ser definida de diferentes formas. Para processos cuja força motriz é o gradiente de pressão a capacidade seletiva da membrana, em relação a uma dada espécie, é medida através do Coeficiente de Rejeição, definido por uma relação entre a concentração da espécie na alimentação e sua concentração no permeado. Outra forma de medir a capacidade seletiva da membrana é através do índice real de retenção (IR), sendo calculado como um menos a divisão entre a concentração da corrente de retido e a concentração da corrente de permeado (HABERT et al., 1997).

Dois importantes fenômenos influenciam diretamente nas características do fluxo de permeado e no índice de retenção, criando resistências adicionais à transferência de massa (CARLSON, 2006):

- **Polarização de concentração:** este fenômeno ocorre devido ao aumento da concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, ficando maior do que a concentração do soluto no seio da solução, provocando um movimento de difusão deste soluto no sentido de retornar ao seio da solução. Este fenômeno é reversível, a permeabilidade do solvente puro é recuperada após uma etapa de limpeza da membrana.
- **Fouling:** este fenômeno se caracteriza pela queda contínua total ou parcialmente irreversível do fluxo de permeado com o tempo, indicando que outros fenômenos, além da polarização de concentração, devem estar presentes durante o processo, causando alterações na membrana. Este fenômeno transiente normalmente é acompanhado por um decréscimo na rejeição do soluto. Os principais fenômenos que constituem o *fouling* são: adsorção das moléculas do soluto na superfície da membrana e/ou no interior dos poros, entupimento dos poros por moléculas ou partículas em suspensão e o depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana.

1.2.2 - CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS

A classificação dos processos de separação com membranas é feita de acordo com o tamanho das partículas ou moléculas a serem separadas. Isto pode ser observado e comparado na Tabela 1 e na Figura 7.

Tabela 1: Processos de separação por membranas

Processo	Força Motriz	Material Retido	Material Permeado	Aplicações
Microfiltração	Gradiente de pressão (0,5 a 2 atm)	Material em suspensão, bactérias. Massa Molar > 500.000 gmol^{-1}	Água e sais dissolvidos	*Esterilização *Clarificação de vinhos e cervejas *Concentração de células *Oxigenação de sangue
Ultrafiltração	Gradiente de pressão (1-7 atm)	Colóides, macromoléculas. Massa molar 5.000 gmol^{-1}	Água, sais solúveis de baixa massa molecular, açúcares.	*Fracionamento e concentração de proteínas *Recuperação de pigmentos *Recuperação de óleos
Nanofiltração	Gradiente de pressão (5-20 atm)	Moléculas de massa molecular média entre 500 e 2.000 gmol^{-1}	Água, sais solúveis de baixa massa molecular.	*Purificação de enzimas *Biorreatores a membrana
Osmose inversa	Gradiente de pressão (15-80 atm)	Todo material solúvel ou em suspensão	Água	*Dessalinização de águas *Concentração de suco de frutas *Desmineralização de águas
Diálise	Gradiente de concentração	Moléculas de massa molecular maior que 5.000 gmol^{-1}	Íons e orgânicos de baixo peso molecular	*Hemodiálise – Rim artificial *Recuperação de NaOH
Eletrodiálise	Gradiente de potencial elétrico	Macromoléculas e compostos não-iônicos	Íons	*Concentração de Soluções salinas *Purificação de águas
Permeação de gases	Gradiente de pressão/ Gradiente de concentração	Gás menos permeável	Gás mais permeável	*Recuperação de hidrogênio *Separação CO_2/CH_4 *Fracionamento do Ar
Pervaporação	Pressão de vapor	Líquido menos permeável	Líquido mais permeável	*Desidratação de álcoois

Fonte: adaptado de HABERT et al., 1997.

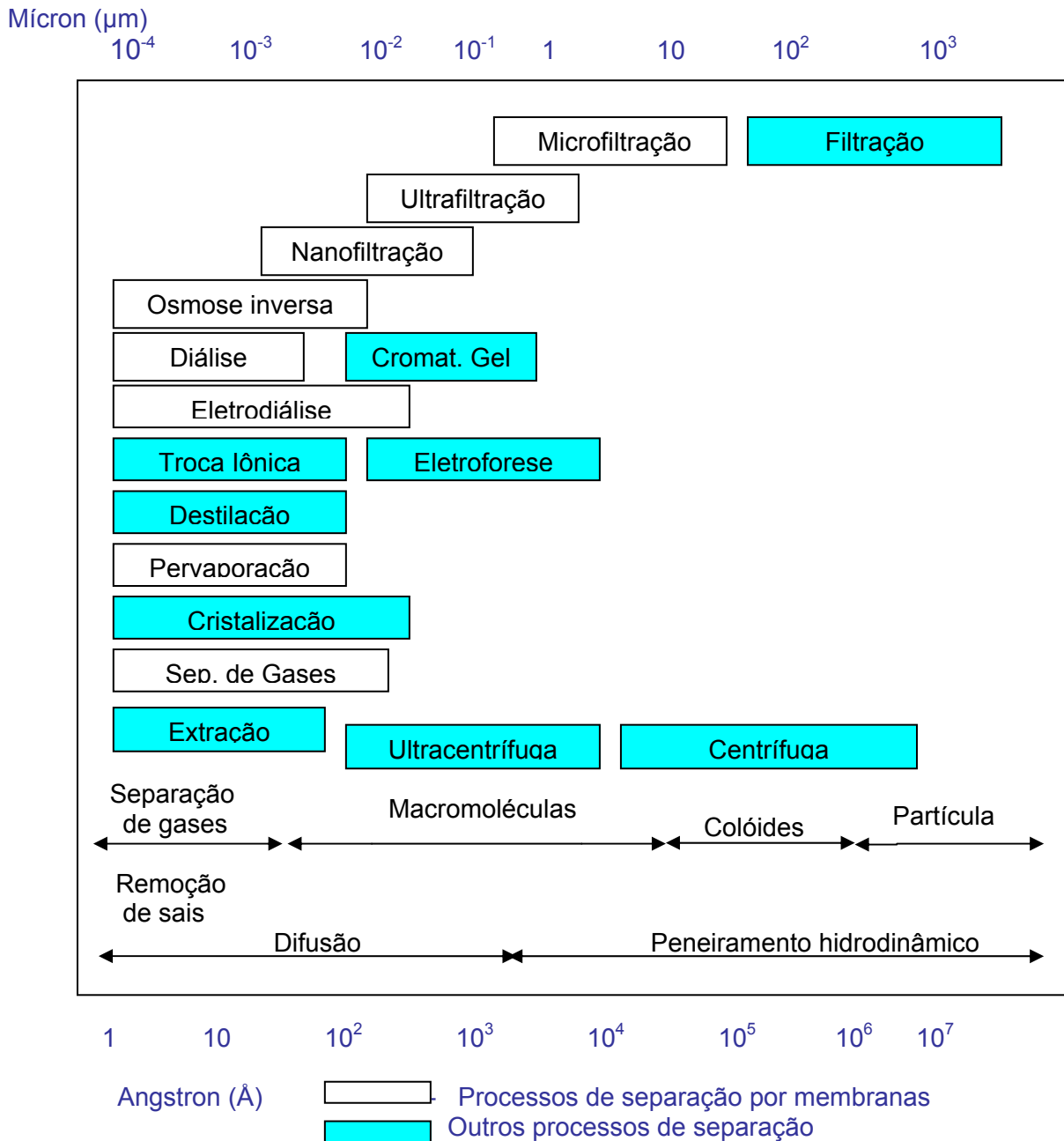


Figura 7 - Tabela comparativa entre processos clássicos de separação e processos com membranas em função das espécies a serem separadas. Fonte: adaptado de HABERT et al.,1997.

1.2.3 GENERALIDADES SOBRE A FABRICAÇÃO DE MEMBRANAS

As membranas apresentam diferentes morfologias na sua fabricação, dependendo do tipo de aplicação a qual se destinam. As membranas podem ser classificadas em porosas ou densas. Esta última não possui poros aparentes na sua superfície filtrante, sendo que ambas podem ser isotrópicas

ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas anisotrópicas possuem uma camada muito fina (cerca de 1 µm de espessura), chamada de pele, sendo onde ocorre a queda de pressão e a separação das espécies químicas. Esta pele é suportada por uma estrutura porosa que fornece resistência mecânica sem, entretanto influenciar na separação ou no fluxo do permeado, e representa de 90-99% da espessura da membrana. Desta forma uma membrana pode ser fabricada espessa o bastante para suportar as forças de compressão e com uma camada filtrante muito fina que proporcione fluxos aceitáveis (HUMPHREY E KELLER, 1997).

As membranas podem ser preparadas a partir de materiais cerâmicos, metálicos ou poliméricos, sendo estes últimos os mais utilizados e disponíveis comercialmente. Existe uma grande variedade de polímeros que podem ser utilizados na fabricação de membranas, porém, comercialmente apenas alguns destes são utilizados mais freqüentemente para este objetivo, como apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Exemplos de materiais utilizados na fabricação de membranas de osmose inversa, ultrafiltração e separação de gases

<i>Polímeros</i>	<i>Cerâmicos</i>	<i>Metais</i>
*Derivados de celulose (incluindo acetatos, outros ésteres e nitratos)	*Alumina	*Paládio e liga de paládio
*Celulose regenerada	Zirconia	
*Poliamidas aromáticas		
Polibenzimidazol e azolono		
Poliacrilonitrila		
Poliacrilonitrila e derivados		
*Polisulfona		
Poli(oxi-dimetilfenileno)		
Poli(fluoreto de vinilideno)		
Poli (metacrilato de metila)		
*Polidimetilsiloxano		

*Materiais mais freqüentemente utilizados. Fonte: HUMPHREY E KELLER (1997).

1.2.4. EQUILÍBRIO DE DIÁLISE

O equilíbrio da diálise é um método que possibilita a separação de componentes de alto peso molecular daqueles de baixo peso molecular utilizando para isto o diferencial de permeação entre membranas seletivas, de espessura entre 10 e 200 μm . A permeação das moléculas através da membrana depende da concentração do analito, do seu coeficiente de partição óleo/água e da área de superfície da membrana (TSAI, 2003).

O processo de equilíbrio de diálise é controlado por difusão e requer a passagem do soluto do lado doador para o lado receptor da membrana como resultado de um gradiente de concentração (QUEIROZ, et al., 2001).

A separação é obtida devido à capacidade da membrana de transportar de maneira mais rápida alguns componentes, em relação a outros, da fase doadora para a receptora. Esta técnica é considerada o método de referência, especialmente para a avaliação de drogas que saturam as proteínas plasmáticas, ainda em concentrações terapêuticas (KURZ, et al., 1977). Já para drogas lipofílicas que se ligam fortemente às proteínas plasmáticas, este método tem utilização limitada (SCHUMACHER et al., 2000).

As membranas utilizadas em equilíbrio de diálise podem ser planas ou na forma de bolsa (Figura 8) e se classificam quanto a sua estrutura (porosas ou não-porosas) e quanto à simetria (simétricas ou assimétricas). Os materiais constituintes das membranas são polímeros hidrofílicos, especialmente celulose regenerada e acetato de celulose. Estes materiais apresentam alta resistência a modificadores orgânicos e podem ser utilizados na faixa de pH de 2 a 8. Os mecanismos envolvidos no processo de permeação de fármacos pela membrana baseiam-se em forças dirigidas como diferença de concentração, de potencial elétrico e de pressão. Dentre estes mecanismos, os que apresentam maiores aplicações bioanalíticas estão relacionadas à concentração e à pressão (QUEIROZ, et al., 2001).

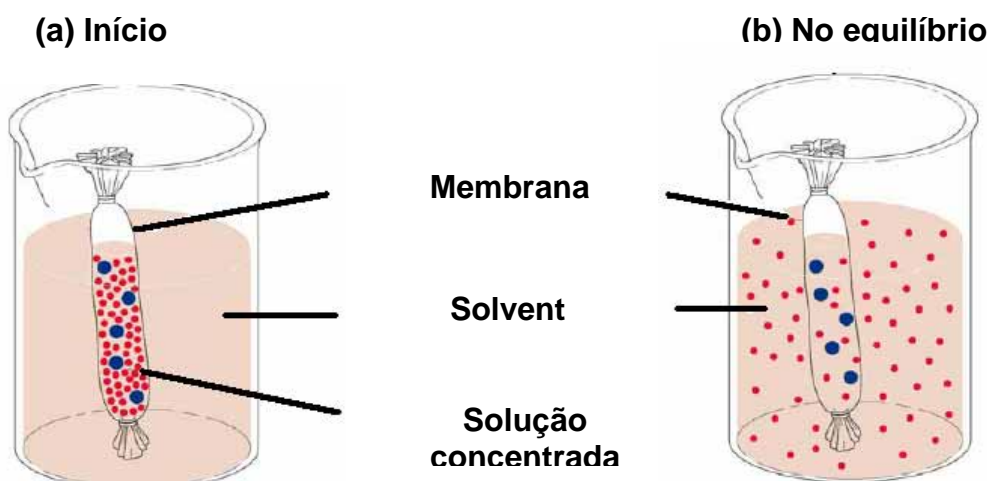


Figura 8 - Ilustração da técnica de equilíbrio de diálise utilizando membrana na forma de bolsa. (adaptado de: SILVA, 2006)

EVARISTO et al., 2005 relata a atividade nematicida da porção interna do material dialisado do extrato bruto de *Canavalia ensiformes*, (feijão de porco), frente a *Meloidogyne incógnita*.

1.3 ESQUISTOSSOMOSE

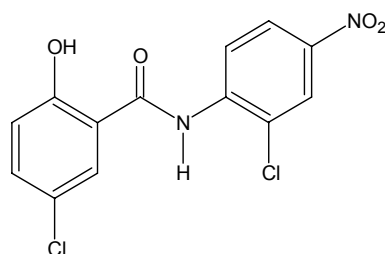
Esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta a população que tem contato com o molusco e que habita em áreas de grande umidade e trata-se de uma doença endêmica no Brasil. Esta doença afeta milhões de pessoas em diversos países e é um problema de saúde pública mundial (OMS, 1994). De todas as espécies de interesse médico *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. hematobium*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, apenas o *S. mansoni* foi encontrado no Brasil e está completamente adaptado ao meio (NOVAES et al., 1999; NEVES, 2000). Tem como agente etiológico, o helminto *Schistosoma mansoni* (família Schistosomatidae), que tem como vetor o molusco de ambientes úmidos, a espécie *Biomphalaria glabrata* (família Planorbidae). O *B. glabrata* é o mais importante vetor do *S. mansoni* no Brasil, apesar da ocorrência de outras duas espécies também hospedeiras do *S. mansoni* como: *B. straminea*, *B. tenagophila* (BARBOSA, 1995; TRUITI et al., 2005). No conhecido ciclo de transmissão da esquistossomose (Figura 9) (verme-ovo-miracídio-cercária-verme) pode-se pensar em atacar e romper o ciclo em vários pontos.

Um desses pontos é o caramujo *Biomphalaria glabrata*, o hospedeiro intermediário, no qual se processa a transformação do miracídio para cercária, a qual penetra a pele do hospedeiro definitivo, levando ao que popularmente se conhece como barriga d'água (LUNA et al., 2005).



Figura 9 – Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Na atualidade, existem poucos moluscidas sintéticos de uso liberado para o controle dos caramujos, sendo a niclosamida (**Bayluscide^R**), produzida pela Bayer e recomendada pela OMS, o moluscida mais conhecido e utilizado mundialmente para o tratamento de focos dos moluscos transmissores da doença. O alto custo desses produtos, a biodegradação lenta, a toxicidade ao meio ambiente e o surgimento da resistência dos caramujos, têm estimulado fortemente a busca por moluscidas de origem vegetal. O uso de plantas como moluscidas pode representar uma alternativa barata, além de apresentar um menor impacto ambiental (KLOOS & MCCULLOUGH, 1981; DOS SANTOS & SANT'ANA, 1999).



Niclosamida

Em 1933, Archibald propôs o controle do molusco usando-se frutos de *Balanites aegyptiaca*. LEMMA (1965) constatou que uma planta originária da Etiópia, a *Phytolacca dodecandra* conhecida popularmente como endod,

continha um grupo de saponinas altamente potentes como moluscidas e que estavam presentes nos extratos aquosos dos frutos. Esta planta ainda é uma das mais promissoras no combate ao molusco. As substâncias responsáveis pela ação moluscicida do endod são a lematoxina ($CL_{90} = 1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a oleanoglicotoxina ($CL_{100} = 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 10) (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985).

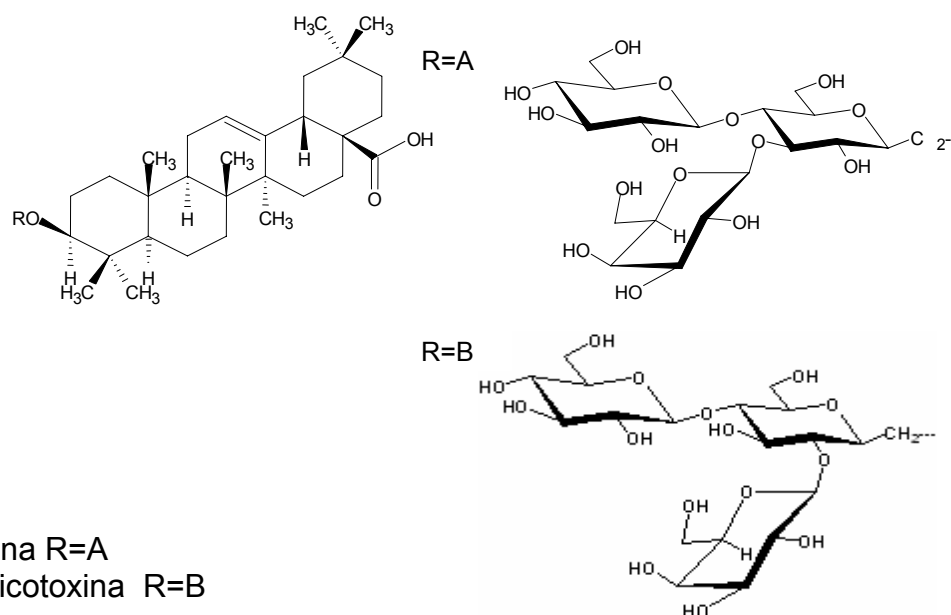


Figura 10 - Saponinas com ação moluscicida

O uso terapêutico de produtos naturais vem crescendo em todo mundo, bem como nas pesquisas sobre sua ação no controle de vetores de doenças. De acordo com SANTOS et al., 2003 1.426 espécies de plantas foram avaliadas em busca de atividade moluscicida até 2003.

1.4 BREVE CONSIDERAÇÃO SOBRE ANTIMICROBIANOS

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu o conhecimento das espécies antimicrobianas, uma vez que Hipócrates (460-337 a. C) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Durante a idade média os relatos pontuam o uso do Cloreto de Mercúrio para tratamento de infecções (YUNES et al., 2001).

Nas últimas sete décadas, as substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam talvez o maior avanço dentro da terapêutica medicamentosa. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1929, a partir do fungo *Penicilium* seguido de muitos outros estudos que introduziram a descoberta de novas substâncias ativas contra diversas espécies de bactérias, fungos e parasitas foi o marco inicial no desenvolvimento dos antibióticos (LIMA, 2001).

A busca de novos antibióticos vem constituindo uma constante preocupação, uma vez que a potência efetiva dos antibióticos existentes vem sendo pouco a pouco diminuída e algumas vezes anulada pela emergência de cepas resistentes (AHMAD e BEG, 2001).

No Brasil, entre o período de 1980 a 1990, foi documentado o surgimento de 27 cepas de microorganismos resistentes (NASCIMENTO et al., 2000). Em consequência disso, nas últimas décadas, observa-se um maior interesse na busca por novos agentes antibacterianos, e os produtos naturais vêm se colocando como uma fonte alternativa abundante dessas substâncias (NASCIMENTO et al., 2000).

O uso de substâncias químicas derivadas de plantas é tão antigo quanto a humanidade, mas somente com o crescente desenvolvimento da alquimia a partir do século XVI, as drogas medicinais passaram a serem obtidas por métodos laboratoriais. Inicialmente foram testados os fenóis, cresóis, formol e outras substâncias químicas, as quais se comportam de forma eficiente na destruição dos microrganismos, porém de forma não seletiva, restringindo assim seu uso na terapêutica antiinfeciosa devido à toxicidade que provocam à célula hospedeira. A pesquisa planejada conduziu a primeiras substâncias que utilizadas em doses adequadas, eram capazes de destruir os microrganismos sem destruir a vida humana (TAVAREZ, 1984; TRABULSI et al., 1999).

1.5 ASPECTOS GERAIS SOBRE A FAMÍLIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae é um importante componente da classe Magnoliopsida - angiospermas dicotiledôneas e pertencem à ordem Sapindales, cujos gêneros e espécies compõem tanto a configuração

vegetacional como a composição florística (AGAREZ et al, 1994). Compreende esta família 140 gêneros distribuídos nos trópicos e subtropicais de todo o mundo (JOLY, 1987) (Figura 11).



Figura 11 - Distribuição geográfica de espécies pertencentes a família Sapindaceae.(www.sementesdocerrado.bio.br/Especies/Sapindaceae/Serjania/lethalis_5219/lethalis_5219.html 06/12/07).

No Brasil, a família tem como a maior e mais representativa área de dispersão a região amazônica, de onde se distribui por todas as outras Unidades da Federação. A maioria das plantas aqui incluídas são constituídas por trepadeiras com gavinha com caule de crescimento em espessura anômalo, ou também arbustos e mesmo árvores com folhas alternas, compostas, sem estipulas ou às vezes inteiras (JOLY, 1987) As flores são pequenas, vistosas, em geral branco-esverdeadas, cíclicas, hermafroditas ou de sexo separado. O fruto é seco, de pericarpo de consistência cartilaginosa, com frutículos semaroides sempre com sementes no ápice (MELO, 2002; NETO et al., 2000).

Esta família é dividida em duas subfamílias, a sapindoideae (Eusapindaceae) com apenas um óvulo por lóculo e a dodanaeideae (Dyssapindaceae) que apresenta usualmente dois óvulos por lóculo. Porém cinco das quatorze tribos e cerca de 30 dos 150 gêneros pertencem à subfamília sapindoideae. A grande maioria dos gêneros encontra-se especialmente nos continentes da África e Ásia e ainda Madagascar e Austrália (WOODSON E SCHERY, 1976).

Dentre os exemplos mais antigos de plantas pertencentes a esta família e de uso popular temos (BALBACH, A., 1963):

- Guaraná: (*Paullinia cupana*): sua semente pode apresentar propriedades adstringentes, também atua contra enxaquecas e como calmante;

- Timbó (*Paullinia pennato*, *Paullinia uveta*, *Paullinia timbó*, *Serjania curassavica*): seu uso interno não é recomendado devido seu efeito narcótico. Mas é recomendado externamente como analgésico e para inflamações do fígado.

- Vassourinha-do-campo (*Dondonaea viscosa*): as folhas desta espécie podem apresentar propriedades de combate as afecções do coração e a secreção pulmonar.

A família Sapindaceae apresenta vasto potencial econômico devido as mais diferentes formas de utilização de suas espécies. Por exemplo, *Sapindus saponaria* L. é utilizada para ornamentação e arborização; a madeira de seu tronco é empregada na construção civil e na confecção de brinquedos. Os frutos são tidos como medicinais e como componente da fabricação de sabão e, as sementes, por conterem óleos são utilizadas como inseticidas e também no preparo de sabonetes. A espécie é empregada também para a recuperação de áreas degradadas, em margens de rios, por se adaptar bem em plantios pioneiros (TONIN, 2005).

A família Sapindaceae a qual espécie *Serjania lethalis* pertence, é uma fonte rica de isoprenóides e polifenóis (HEGNAUER, 1973), saponinas (VOUTQUENNE et al., 2002), triterpenos (CHAVEZ E DELGADO, 1994), diterpenos (ORTEGA et al., 2001), flavonóides (MAHMOUD et al., 2001), lectinas (FREIRE et al., 2002) e hidrogéis (GORIN et al., 1996). As sementes das plantas da família Sapindaceae são caracterizadas predominantemente pela abundância de óleos, onde alguns exercem atividade inseticida sendo rico em cianolipídeos (SPTIZER, 1996).

Pesquisadores como LEYTON et al. (2005) e LABOURIAL, (1973), descrevem que gêneros dessa família, tais como *Serjania* ssp (cipó-timbó) e *Sapindus saponaria* teriam demonstrado atividade moluscicida e citotóxicas, atribuídas as saponinas presentes nestes vegetais.

1.5.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO SERJANIA

O gênero *Serjania* é tradicionalmente de difícil avaliação dado a sua similaridade a outro gênero de Paullineae. Este é muito similar a outros cinco gêneros da família sapindaceae (*Paullinia* L., *Cardiospermum* L., *Urvillea* kunth, *Houssayanthus* hunz e *Lophostigma* radlk.). A distinção entre os gêneros com base nas características vegetativas não é totalmente impossível, porém requer um grande conhecimento e experiência. Por exemplo, a presença de uma estipula foliácea larga ($1 > \text{cm}$) é indicativa de Paullinea (com exceção de poucas espécies de *Serjania*). Algumas *Serjanias* podem ser distinguidas pela combinação de folhas biternete e outras pela ocorrência de algumas anomalias vasculares. (WOODSON E SCHERY, 1976).

A maioria das espécies do gênero *Serjania* conhecidas (cerca de 60%) foram descritas por RADLKOFER em inúmeros trabalhos entre 1878 e 1931. Ele deu uma grande contribuição no que se refere ao gênero *Serjania*, aumentando o número de espécies conhecidas de 52 para 190. Somente 38 destes nomes são considerados estudados biologicamente, dada à dificuldade taxonômica e o pouco conhecimento acerca da diversidade deste gênero. No Brasil cerca de 80 espécies de *Serjania* são encontradas na Região Central, ao longo da Costa Atlântica e particularmente na Região Sul incluindo a Bahia, a grande maioria ocorre em áreas abertas de clima úmido a seco. (NOGUEIRA et al., 1995; RODRIGUEZ, 1988).

De modo geral o gênero *Serjania* (Sapindaceae) é distribuído nas áreas tropical e subtropical do continente americano. No Brasil cerca de 80 espécies deste gênero podem ser encontrados ao longo das regiões Norte e Sul alcançando à costa atlântica. Este gênero consiste de aproximadamente 230 espécies das quais cerca de 40% ainda não são conhecidas. Existem ainda estudos cromossômicos envolvendo o gênero, NOGUEIRA et al., 1995 relata em estudo com seis espécies a *Serjania* como diplóide com cromossomos $2n=24$.

1.5.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE *Serjania lethalis* St. Hil

S. lethalis é uma espécie encontrada com o hábito de liana cuja característica é comum, em especial para gêneros da família Sapindaceae. A tabela 3 mostra as espécies de lianas pertencentes a esta família.

Tabela 3 - Lista das espécies vasculares registradas na Reserva Ecológica do IBGE, 2000.

<i>Espécies</i>	<i>Hábito</i>	<i>Ambiente</i>
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Árvore	Mata de galeria
<i>Matayba guianensis</i> Aubl.	Árvore	Mata de galeria, Cerrado
<i>Paullinia carpopodeia</i> Cambess.	Liana	Mata de galeria
<i>Paullinia millifolia</i> A.juss.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania caracasana</i> (jacq.) Willd.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania erecta</i> Radlk.	Subarbusto	Cerrado
<i>Serjania laroutteana</i> D. Dier.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania lethalis</i> A St. Hil	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania mansiana</i> Mart.	Liana	Cerrado
<i>Serjania marginata</i> Casar.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania multiflora</i> Cambess.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania cf. obtusidentata</i> Radlk.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania ovalifolia</i> Radlk.	Liana	Mata de galeria
<i>Serjania reticulata</i> Cambess.	Liana	Mata de galeria, Cerrado

Fonte: Estudos e Pesquisas e Informação Geográfica, 2004

A *Serjania lethalis* St. Hil. é uma trepadeira, de caule triangular, de ramos cilíndricos ou pouco triangulares, corpos lenhosos compostos, com folhas biternadas, medindo até 27 cm de comprimento e pecioladas; seus folíolos são lanceolado-elípticos, medindo de 8 cm a 15 cm de comprimento por 3 cm a 5 cm de largura, quase sésseis, obtusos, também acuminados, de base e ápice estreitos, íntegros ou com um a três dentes, os quais são glabros e coriáceos. As inflorescências se apresentam em tirso solitários ou reunidos

em pequenas panículas apicais. Suas flores são alvas e pequenas. O cálice possui sépalas lanuginosas. Os frutos são cordado-triangulares, medindo até 3 cm de comprimento. As sementes são subglobosas (NETO et al., 2000). A tabela 4 mostra as características etnobotânicas da espécie *Serjania lethalis*.

Tabela 4 – Características etnobotânicas da *Serjania lethalis*

Características	<i>Serjania lethalis</i>
Hábito	Trepadeira
Ambiente	Caatinga e Mata de altitude
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Sapindales
Família	Sapindaceae
Gênero	Serjania

Fonte: www.sementesdocerrado.bio.br/Especies/Sapindaceae/Serjania/lethalis_5219/lethalis_5219.html (em 05/112/07).

A espécie *S. lethalis*, têm sido estudada cientificamente devido o uso na medicina popular tradicional, contra doenças infecciosas e cutâneas, tais como úlcera, diarréia, febre e malária, e pesquisadas como possível agente com atividade leishmanicida e tripanocida. Na medicina tradicional a Casca da raiz tem utilidade em certas moléstias do fígado, principalmente nas inflamações. Também é usada para debelar as afecções nervosas, inflamação do ovário, cólicas uterinas, tosses, neuvragias, dores de cabeça, prisão de ventre, etc (CRUZ, 1979). A espécie *Serjania lethalis*, também é conhecida pelo seu uso como piscicida, (BALBACH, 1963a).

LIMA et al., 2006, demonstraram que os extratos etanólicos da casca e da folha da *Serjania lethalis* apresentam ação anti-bacteriana frente a cepa susceptível e resistente de *Staphylococcus aureus* (strain ATCC25922). O valor

da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as frações (acetato de etila, hidrometanólica) obtidas desta espécie foram menor que 100 µg/mL.

Os estudos realizados com extratos etanólicos da folha da *Serjania lethalis* revelaram a sua capacidade de atuar como agente imunomodulador (RIMBACH et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; RYU et al., 2003) e exercer atividade citotóxica (BOLZANI et al., 1999). Além disto, com o fracionamento do extrato óbito do caule foi possível encontrar agentes antiinflamatórios (NAPOLITANO et al., 2005).

As trepadeiras lenhosas são conhecidas comumente como cipós ou lianas, e seus ramos, usando árvores ou outras lianas como suporte, podem atingir o dossel da floresta e aí se desenvolver muito, entrelaçando-se em várias árvores (PUTZ, 1984; PUTZ E CHAI, 1987) e podendo atingir diâmetros de 15 cm e comprimentos de até 70m (JACOBS, 1988), já que suas copas podem ser tão grandes como a das árvores que as sustentam. Dentre as florestas tropicais, as trepadeiras são mais abundantes na África, enquanto nos neotrópicos a abundância é intermediária e menor na Ásia (GENTRY, 1991). Por outro lado, as florestas neotropicais são as que possuem a maior diversidade de espécies trepadeiras (RICHARDS, 1952).

As trepadeiras são plantas cujo crescimento em altura depende da sustentação mecânica fornecida por outras plantas (MORELLATO , 1991), pois não podem sustentar-se livremente em altura por causa de seu peso (PUTZ & MOONEY 1991) em relação ao pequeno diâmetro do caule. Mais de 90% de todas as espécies trepadeiras conhecidas no mundo estão restritas às regiões tropicais (WALTER, 1971).

Floristicamente, as plantas trepadeiras de uma maneira geral contribuem notavelmente para a riqueza de espécies vegetais desses ecossistemas. Podem representar de 7,4% (LIEBERMAN et al., 1985), 24% (GENTRY, 1991) e até 40% (RODRIGUES, 1988) da flora total presente nas florestas tropicais, enquanto na Europa este grupo corresponde a menos de 2% da flora (RICHARDS, 1952).

1.6 A PRESENÇA DE AÇUCARES EM PLANTAS

O isolamento e identificação de açúcares em plantas é algo bastante restrito. Trabalhos como os realizados por POPPER et al., (2001, 2003) relatam a identificação de açúcares na parede celular de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, porém poucos estudos abordam este isolamento em plantas terrestres, provavelmente por estes açúcares não estarem em grande quantidade.

A purificação de um açúcar pode ser realizada principalmente em espécies ricas em compostos glicosilados como saponinas ou flavonóides. Um exemplo pode ser dado pelo trabalho realizado por FONSECA et al., 2007 deste extrato foram isolados dois flavonóides glicosilados (Quercetina-3-O-ramnopiranosil-O-glicopiranosil-O-ramnopiranosil-O-galactopiranosídeo e Canferol-3-O-ramnopiranosil-O-glicopiranosil-O-ramnopiranosil-O-galactopiranosídeo) e um açúcar (dulcitol).

Os açúcares desempenham papéis importantes, como por exemplo (ICIDCA, 1999):

Xantana (Figura 12) é um polissacarídeo que dentre outras atribuições é utilizado como agente na elaboração de medicamentos e como ingrediente na textura de cosméticos;

Sorbitol (Figura 12) é um monossacarídeo muito utilizado na produção do ácido utilizado ascórbico (vitamina C) que é sintetizado a partir da L- sorbose, obtida por desidrogenação biológica do sorbitol.

Dextrana (Figura 12) é um polímero de glicose cujas ligações glicosídicas são do tipo 1-6. A hidrólise e fracionamento da dextrana permitem a obtenção de dextransas de diferentes pesos moleculares, as quais podem ter diversas aplicações farmacêuticas: dextrana clínica de alto peso molecular para expandir o volume plasmático; dextrana clínica de baixo peso molecular como melhorador do fluxo sangüíneo; feridextrana (dextrana com ferro, de uso humano e veterinário) para combater a anemia; sulfato de dextrana como anticoagulante e géis de dextrina iônicos e não-iônicos para preparação de derivados para a análise e purificação nos laboratórios e fabricas de processos químicos.

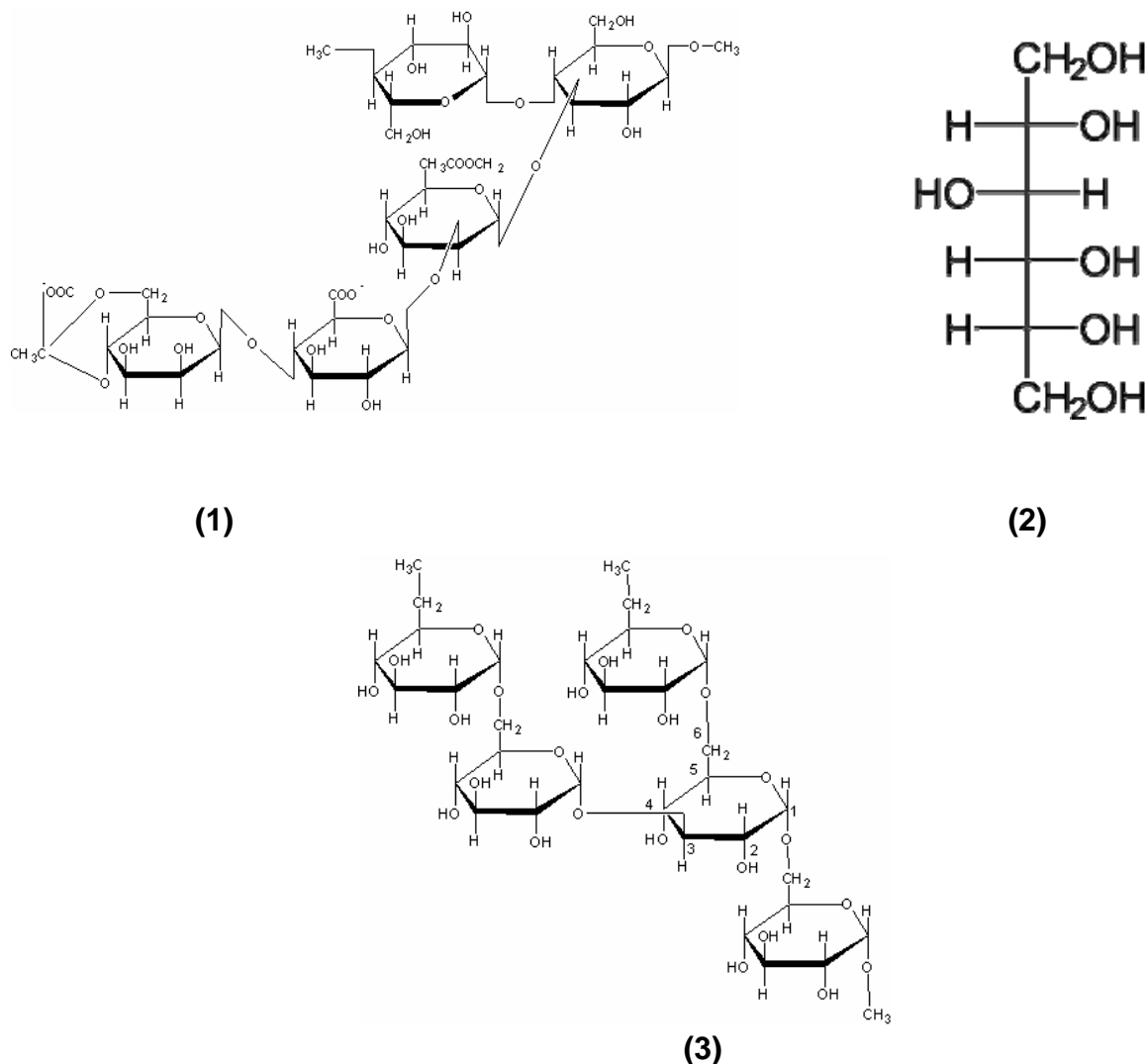


Figura12- (1) Xantana; (2) Sorbitol; (3) Dextrana

1.7 SAPONINAS: IDENTIFICAÇÃO E ATRIBUIÇÕES

As saponinas possuem atividades biológicas diversas como: moluscicida, piscicida, tóxica para vários animais, principalmente os de sangue frio, antiinflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida, redutora de colesterol, antiviral, antibacteriana e antifúngica. Uma das teorias mais aceita para explicar a alta concentração de saponinas em muitas espécies de plantas de muitas famílias diferentes é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, sejam estes fungos, bactérias ou vírus (SPARG et. al., 2004; MURGU, 2002; MAHATO et. al., 1988).

A identificação completa de uma saponina inclui: a determinação da estrutura da aglicona; a composição e a seqüência dos componentes monossacarídeos na porção carboidrato; como as unidades de monossacarídeos estão ligadas umas nas outras; a configuração anomérica de cada unidade de monossacarídeo glicosidicamente ligados; a localização da porção carboidrato na aglicona. Devido a esta complexidade, a identificação de saponinas é uma tarefa bastante árdua, fazendo-se necessária a inter-relação de diferentes técnicas de análise como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN-2D, eletroforese capilar, dentre outras técnicas. (GUTERRES, 2005).

Pequenas modificações na aglicona ou nas cadeias de açúcar, ou ainda, na seqüência em que as unidades glicosídicas estão ligadas, geram uma nova substância. Assim, a diversidade destas em uma mesma espécie de planta é muito grande, o que resulta em extratos com misturas altamente complexas devido á similaridade dos seus componentes. Aliado a isto as saponinas são muito polares e possui massa molecular elevada o que aumenta a dificuldade de isolamento e purificação (GUTERRES, 2005).

1.7.1 SAPONINAS TRITREPÊNICAS

Os esqueletos triterpênicos pentacíclicos podem ser exemplificados pelo lupeol, α -amirina e β -amirina (Figura 13) que são comumente encontrados na forma de saponinas triterpenóides. Saponinas deste tipo são raramente encontradas em monocotiledôneas, porém são abundantes em muitas famílias dicotiledôneas. Um exemplo bem comum é o do esqueleto da β -amirina, o qual pode possuir o grupamento de ácido carboxílico derivado da oxidação de grupos metila ligados aos carbonos nas posições 4 (C-23), 17 (C-28) e 20 (C-30) (DEWICK, 2002) (Figura 13).

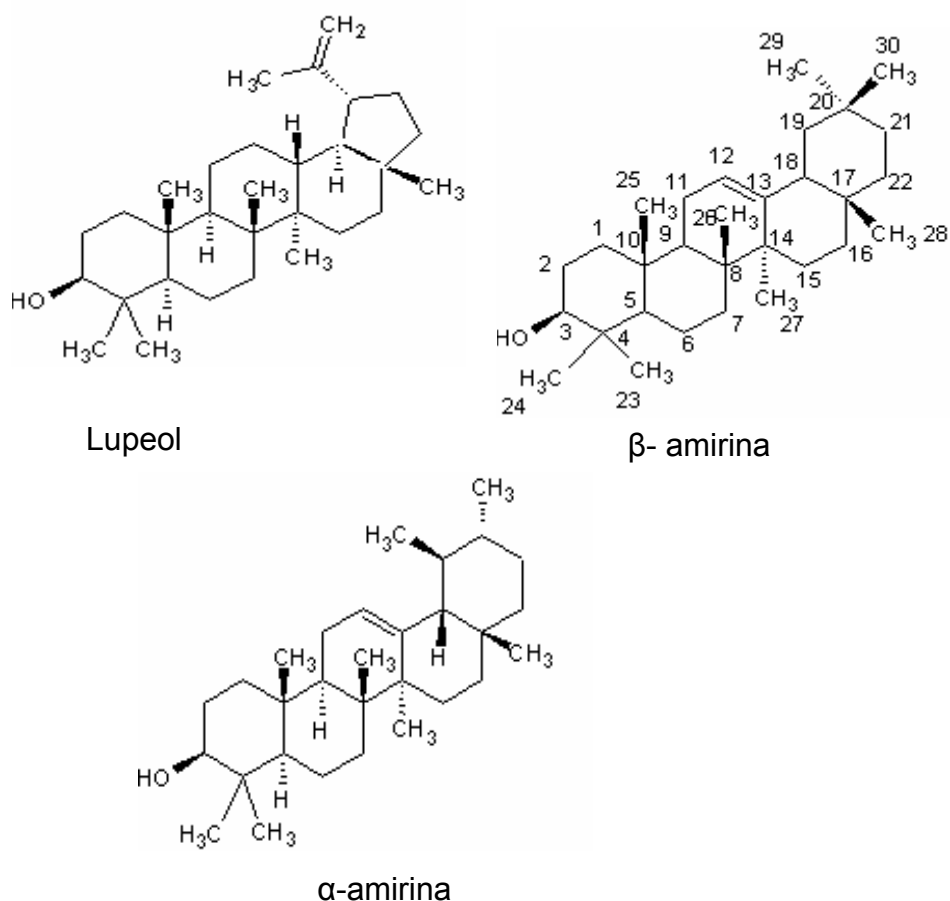


Figura 13- Esqueletos triterpênicos pentacíclicos mais comuns.

O resíduo de açúcar é usualmente encontrado ligado ao grupo hidroxila na posição 3, podendo conter de um a seis unidades monossacarídeas. Os mais comuns são glicose, galactose, raminose e arabinose, e menos freqüentemente unidades ácido urônico (ácido glucorônico e ácido galacturônico). A figura 15 demonstra a variedade de modificações estruturais que podem ocorrer envolvendo os esqueletos triterpenóides (exceto a estrutura sesquiterpenóide) (DEWICK, 2002). Uma das plantas que apresenta em sua constituição saponinas triterpênicas com ação moluscicida (Figura 10, pg 16) é a *Phytolacca dodecandra* (Phytolaccaceae) conhecida como Endod (AL-ZANBAGI et al., 2000), planta originaria da Etiópia e que foi a primeira usada para o controle da esquistossomos (LEMMA et al., 1970 e 1979).

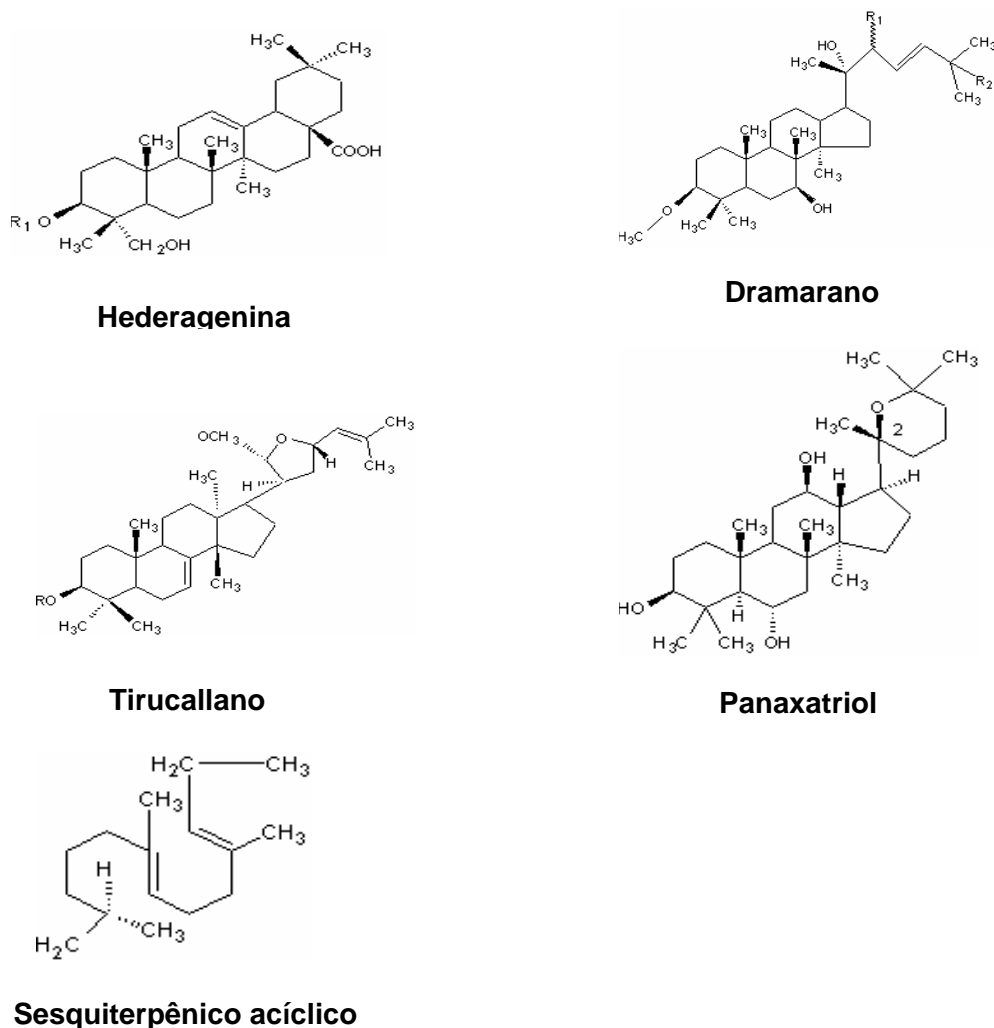


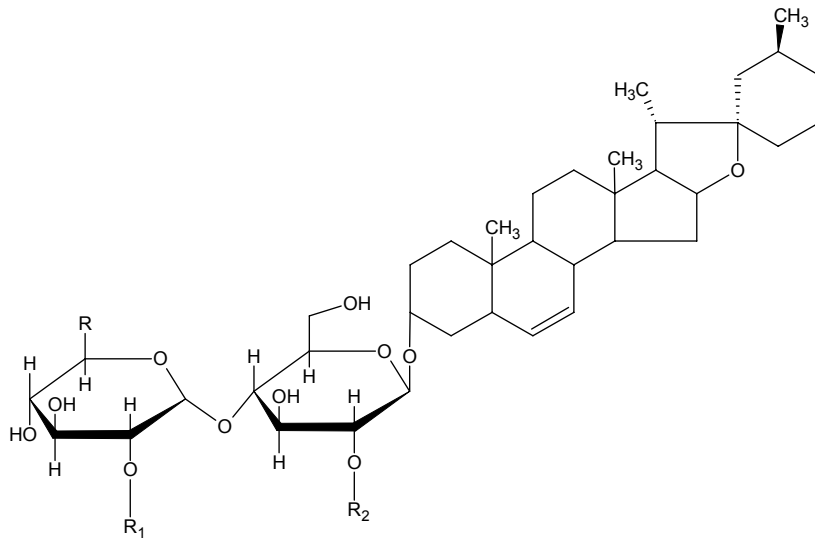
Figura 14 - Alguns tipos de esqueletos terpênicos envolvidos na formação de saponinas

1.7.2 SAPONINAS ESTERÓIDAIAS

As saponinas esteroidais possuem propriedades biológicas tem similares àquelas das saponinas triterpênicas, no entanto são menos distribuídas na natureza. Estão presentes em muitas famílias monocotiledôneas, especialmente nas famílias Dioscoreaceae (ex.; *Dioscorea*), Agavaceae (ex.; *Agave*, *yucca*) e Liliaceae (*Smilax*, *Trillium*). As sapogeninas esteróides C-27, com grupamento espirocetal são provenientes de modificações na cadeia lateral do colesterol (DEWICK, 2002).

A primeira tentativa para o controle da esquistossomose pelo uso de plantas moluscicidas foi realizada em 1930, quando R. G. Archibald

(ARCHIBALD et al., 1933) e Wagner (WAGNER, 1936) plantaram palma do deserto, *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae), ao longo dos cursos de água do Sudão e do Sudeste da África. Como resultado dos estudos em campo observou-se que os frutos desta planta derrubados na água inibiam o aumento da densidade populacional dos caramujos (KLOOS E MCCULLOUGH, 1982). Em 1982, foi determinado que os compostos responsáveis pela atividade moluscicida presentes nos frutos eram três saponinas do tipo esterois que foram identificadas como balanitininas 1, 2 e 3 (LIU E NAKANISHI, 1982).



Balanitinas:

R
R₁
R₂

1

CH₂OH
ramnose
ramnose

2

CH₂OH
ramnose
H

3

xilose
H
ramnose

EXPERIMENTAL

2. EXPERIMENTAL

2.1 ESPECIFICAÇÕES GERAIS DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Para as extrações e sistemas cromatográficos foram utilizados solventes de grau comercial marca Herzog (Brasil), os quais foram destilados no laboratório de destilação do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas. Para análise em CLAE foram adotados solventes ultra puros adquiridos da Merck (Alemanha) e Aldrich (Estados Unidos) e água ultra-pura obtida por purificador da marca Millipore;
- As frações contendo grande volume de solvente foram concentradas em evaporador rotativo sob baixa pressão, marca Büchi; enquanto que as frações contendo volume pequeno de solvente foram concentradas em capela de exaustão;
- As frações aquosas em grande volume foram submetidas à liofilização com equipamento da marca Thermo Savant;
- Nas separações cromatográficas em coluna, usou-se como adsorvente sílica 60G (70-230 Mesh ASTM) da Merck – (Darmastad- Alemanha) impregnada com polímero polimetiloctadecilsiloxano (PMODS). O comportamento e o diâmetro da coluna variaram de acordo com a quantidade da amostra e da sílica a serem empregadas. Além disso, também, fez-se o uso de carvão ativo (Reagen, Quimibrás, Indústrias Químicas, Rio de Janeiro);
- Para permeação em gel foi utilizada Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Up sala-Suécia), o qual permaneceu por 24 horas em contato com solvente a ser utilizado como fase móvel;
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA e CCD-C18) foram utilizadas placas da marca Merck – (Darmastad- Alemanha);
- Na cromatografia em camada delgada escala preparativa utilizou-se sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck (Darmastad- Alemanha). As cromatoplasmas foram preparadas manualmente utilizando-se suspensão de gel de sílica em água destilada, seguida de espalhamento (com camada de sílica de

0,5 a 1mm de espessura) através de um espalhador mecânico sobre as placas de vidro (20 x 20 cm), e ativação em estufa a 100°C por duas horas;

- As visualizações dos cromatogramas em CCD foram feitas através da exposição das placas a irradiação com luz no UV, nos comprimentos de onda 254 e 366nm e pulverização com solução ácida de Sulfato Cérico, Anisaldeído ou vapores de Iodo;
- A diálise foi realizada por meio de membrana sintética;
- As frações que foram analisadas por CLAE analítico, foram dissolvidas na fase móvel empregada na eluição e o volume de injeção de 20 µL, igual ao volume do lupe do aparelho;
- A análise de CLAE foi obtida utilizando-se um equipamento Shimadzu, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, composto de controladora SCL-10A, detector UV fotodiodo SPD-M10A, com coluna analítica fase reversa C18 da Shimpack; dimensão de (15cm x 0,46 cm; 5µm). Os cromatogramas foram monitorados on-line na faixa de 200 a 500nm, já que a maioria dos compostos orgânicos mostra o máximo de absorção dentro desta faixa de comprimento de onda.
- Banho ultra-sônico marca UNIQUE;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE 400 operando na frequência 400MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Em todos os casos, o referencial interno foi o Tetrametilsilano (TMS) utilizando-se como solvente CD₃OD. Os dados de RMN coletados foram processados usando-se o programa SPIN WORKS e TOP SPIN visando a obtenção dos espectros unidimensionais e bidimensionais. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz.

2.2 MATERIAL VEGETAL

A espécie *S. lethalis* foi coletada no mês de setembro, em Brasília no ano de 2002. A coleta e identificação da planta foram realizadas pelo professor Dr. José Elias de Paula da Universidade Federal de Brasília (UnB). Uma exsiccata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Brasília sob o número JEP 3698 UB.

2.2.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

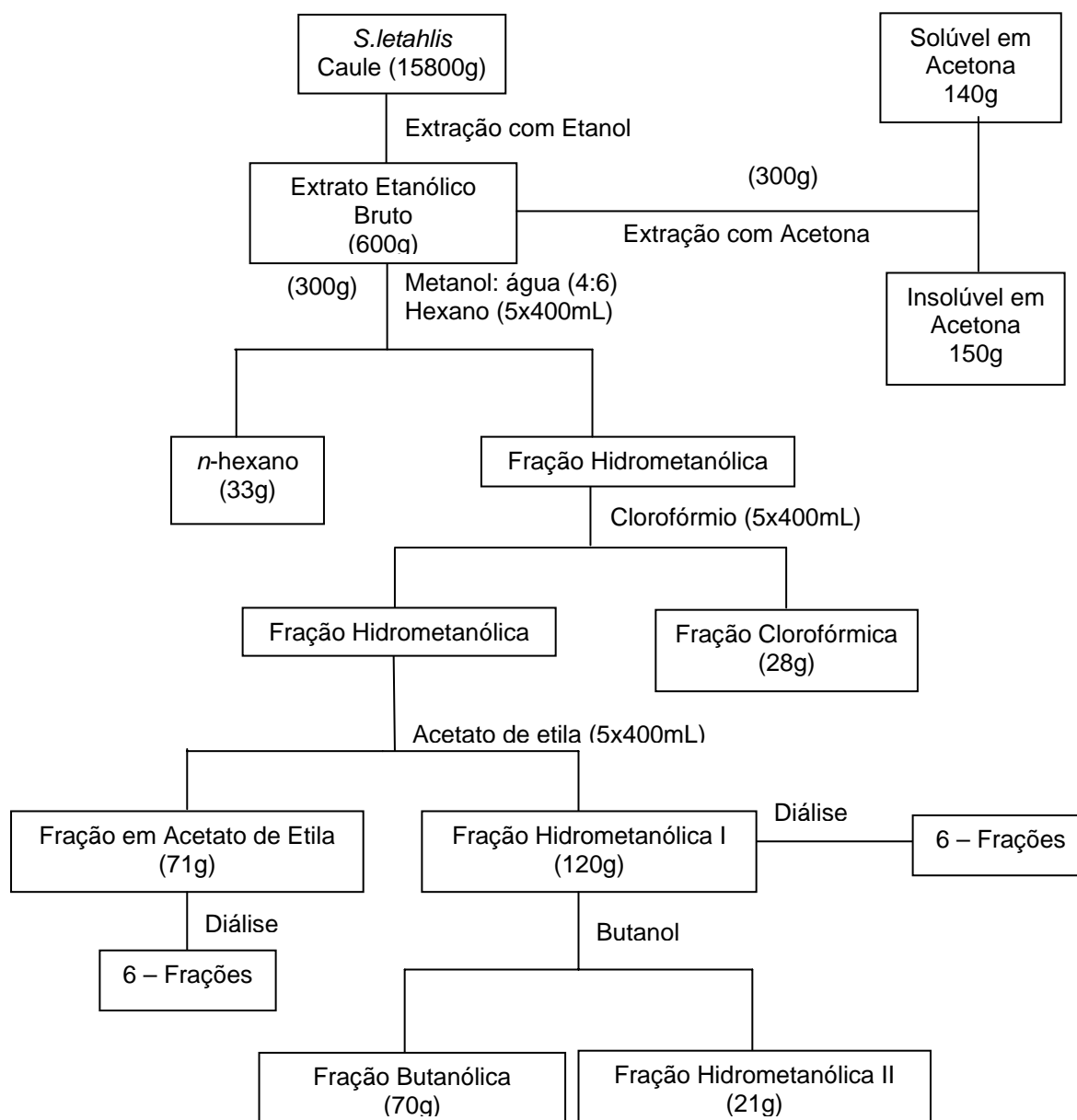
O caule (15800g), de *S. lethalis* após triturado e moído foi submetido a extração em aparelho de Soxhlet com etanol 90% e filtrado. A solução etanólica, após concentração do solvente, em evaporador rotativo sob pressão reduzida, forneceu 600g (3,8) de extrato etanólico bruto do caule. O mesmo procedimento foi adotado para obter o extrato bruto etanólico da madeira da raiz e folhas. A tabela 5 demonstra o rendimento de cada extrato.

Tabela 5 - Obtenção de extratos envolvendo casca da madeira, folha e caule da *S. lethalis*

Parte da planta (peso)	Extrato Etanólico Bruto (peso)
Madeira da raiz (1500g)	62g (4,1%)
Caule (15800g)	600g (3,8%)
Folha (800g)	40g (5,0%)

O extrato bruto dói dividido em duas partes uma envolvendo extração com acetona e outra partição líquido-líquido (Fluxograma1).

Fluxograma 1- Procedimentos gerais empregados neste estudo



2.2.2 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DA *SERJANIA LETHALIS*.

Parte do extrato etanólico bruto (300g) foi submetido à extração com hexano. Após extração com hexano o material A fração hidrometanólica foi extraída com clorofórmio e acetato de etila. As frações em hexano, hidrometanólica, clorofórmio e acetato de etila foram concentrados em aparelho rotatório a baixa pressão. Ao final foram obtidas em hexano (33g), hidrometanólica (120g), clorofórmio (28g) e acetato de etila (71) (Fluxograma 1).

2.3 ATIVIDADE MOLUSCICIDA

2.3.1 ENSAIO BIOLÓGICO

O teste para avaliação da atividade moluscicida envolveu basicamente a imersão do caramujo adulto *B. glabrata* em uma solução Água: Metanol 9:1 (v/v) das frações sob investigação (Figura 16), nas concentrações apropriadas (DOS SANTOS et al., 1999).

- A solução teste para cada extrato vegetal foi preparada a 100, 50 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o teste preliminar com o caramujo e, 100, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o teste preliminar. No teste apurado as concentrações foram selecionadas em função dos resultados obtidos nos ensaios preliminares e realizados em duplicata (caramujo adulto). O teste obedeceu a relação de 1 caramujo – 25 mL de solução-teste. Na etapa preliminar foram utilizados 5 caramujos por concentração e na etapa apurada 10 caramujos por concentração.
- Dois conjuntos de controle foram usados visando verificar a suscetibilidade dos caramujos, um positivo com niclosamida a 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou carbonato cúprico a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e um negativo - somente com Água: metanol 9:1 (v/v) O tempo de exposição destes organismos foi de 24 horas e o de observação 72 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos. Durante o período de observação foi fornecido alface para os caramujos.
- A morte dos caramujos foi indicada pela descoloração, ausência de contrações musculares, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo.
- Os valores de concentração letal (CL_{90}) foram estatisticamente calculados.
- Foram utilizadas para determinar a atividade moluscicida às frações: Solúvel em acetona (item 2.7), butanólica (item 2.9) e dialisada (item 2.8). As demais Frações como a: hidrometanólica e em

acetato de etila (Fluxograma 1) não foram testadas por conta de sua insolubilidade.

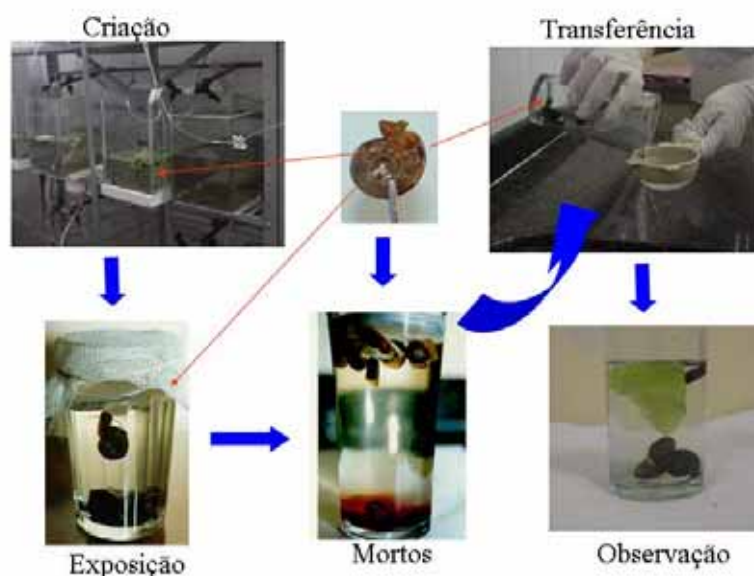


Figura 15 – Teste moluscicida – caramujo adulto *B. glabrata*

2.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados, concentração x mortalidade dos organismos-alvo, visando à determinação dos valores de concentração letal CL_{90} , foi realizada de acordo com o método Próbitos de análises disponível no programa computacional POLO (FINNEY, 1974).

2.3.3 TESTE ESQUISTOSSOMICIDA

2.3.4 *Schistosoma mansoni*

Todas as formas evolutivas do parasito, necessárias para este estudo, foram oriundas da cepa BH (Belo Horizonte), mantida pelos Laboratórios de Química da UFAL – Maceió (AL), de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou – Belo Horizonte (MG) e de Esquistossomose Experimental do Laboratório de Imunopatologia Keiko Asami - LIKA – Recife (PE).

2.3.5 OBTENÇÃO DAS FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITO

A manutenção da cepa BH de *S. mansoni* Sabom para fornecimento das formas evolutivas do parasito foi realizada usando-se o modelo *caramujo-camundongo* como descrito em SANTOS, 2005 e a atividade esquistossomicida *In Vitro* foi realizada por Aldenir Feitosa dos Santos.

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.4.1 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS TESTES

Os microrganismos aeróbios *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo (*Candida albicans*), foram adquiridos no laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Tabela 6).

Tabela 6- Microrganismos utilizados no ensaio microbiológico.

<i>Microrganismos</i>	<i>Cepas</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 27212 (IC55144, IC55068, IC55258, IC55671, IC55995, IC55295, IC55259, IC5354, IC55918).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA 39 (IC01, IC03, IC04, IC06, IC07, IC12, IC17).
<i>Candida albicans</i>	IC01, IC03, IC05, IC07, IC08, IC09, IC10, IC11, IC15.

2.4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DA *Serjania lethalis*

As soluções foram preparadas dissolvendo-se 9 mg da amostra (tabela 7) em 2 mL de etanol afim de se obter uma solução padronizada em 4,5 mg/mL.

Tabela 7 - Extratos e frações trabalhadas para o bioensaio.

<i>Parte da planta</i>	<i>Frações ou extratos enumerados</i>
Madeira da raiz	Extrato etanólico (21)
Caule	Fração clorofórmica (23)
	Fração solúvel (24)
	Fração insolúvel em acetona (25)
Folha	Extrato etanólico (22)

2.4.3 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS DISCOS

Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram saturados com as soluções padronizadas de cada uma das frações, e em seguida o solvente orgânico (etanol) foi evaporado e obtidos discos com uma concentração igual a 90 µg por amostra. Discos da amostra de Ofloxacina com 5 µg foram utilizados como padrões para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Para *C. albicans* foram utilizados discos com 75 µg de fluconazol.

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AOS MICRORGANISMOS AERÓBIOS.

2.5.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste estudo foram às cepas de *E. faecalis*, ATCC 27212 (IC55144, IC55068, IC55258, IC55671, IC55995, IC55295, IC55259, IC5354, IC55195, IC55918), *P. aeruginosa* UFPEDA 39 (IC01, IC02, IC03, IC04, IC06, IC07, IC12, IC17) e *C. albicans* (IC01, IC03, IC05, IC07, IC08, IC09, IC10, IC11, IC15).

2.5.2 CULTURA DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos *P. aeruginosa* e *E. faecalis* foram semeados em Placas de Petri de 90 mm contendo 18 mL de agar Mueller-Hinton enquanto

que a *C. albicans* foi semeada em placas de Petri de 90 mm contendo 18 mL de agar de Sabourraud.

2.5.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Os microrganismos foram obtidos a partir de pré culturas de 18 horas a 37⁰C em caldo de Mueller-Hinton para *E. faecalis* e *P.aeruginosa* e Sabouraud para *C. albicans*. O inóculo foi diluído em soro fisiológico de maneira a obter uma opacidade equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland o que corresponde a 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

2.5.4 MÉTODO

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *S. lethalis*. (Raiz, Folha e Caule) frente aos microrganismos *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi realizada pela metodologia preconizada por BAUER & KIRBY (1966). Os discos foram depositados sobre o meio semeado e incubados a 37⁰C por 18 horas para *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e incubados a 30⁰C por 24 horas para *C. albicans*.

2.5.5 LEITURA

A leitura foi realizada pela medição do halo de inibição em torno do disco por meio de uma régua milimetrada com escala de 0,1mm.

2.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS

Os extratos das plantas utilizadas neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de MATOS, 1997. Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos, e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro. Para os testes de 2.6.1 a 2.6.4 sete porções de 3-4mL de cada extrato dissolvidos em etanol, foram colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

2.6.1 TESTE PARA FENÓIS E TANINOS

No tubo de ensaio de número 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1molL^{-1} . Agitou-se bem e observou-se alguma variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 . A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) foi preparada adicionando-se 9g deste reagente em 50mL de água destilada contendo 2mL de ácido clorídrico 3molL^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3molL^{-1} foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100mL de solução, em um balão volumétrico.

2.6.2 TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONÓIDES

Ensaio com os tubos 2, 3 e 4. O tubo de número 2 foi acidulado a pH 3 com HCl 3molL^{-1} e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11 com NaOH 1molL^{-1} . A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir. Para se obter a solução de NaOH 1mol.L^{-1} dissolveu-se 4g deste reagente em água destilada para 100mL de solução em balão volumétrico.

Constituintes	Cor do meio		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

2.6.3 TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVONONAS

Acidulou-se o tubo 5 por adição de HCl 3molL^{-1} até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1molL^{-1} até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir:

Constituintes	Cor do meio	
	Ácido	Alcalino
leucoantocianidinas catequinas (taninos catéquicos)	Vermelha	-
flavononas	Pardo-amarelada	-
	-	Vermelho Laranja

2.6.4 TESTE PARA FLAVONÓIS, FLAVANONAS, FLAVANONÓIS E XANTONAS

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7.

O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

2.6.5 TESTE PARA ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES

Adicionou-se 10mL de uma solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extrauiu-se o resíduo seco de cada becker três vezes com porções de 1-2mL de CHCl_3 . Separou-se os extratos em tubos diferentes e colocou-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio

bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores.

A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

2.6.6 TESTE PARA SAPONINAS

Tomou-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma. Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

2.6.7 TESTE PARA ALCALÓIDES

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

2.6.7.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO REAGENTE DE DRAGENDORFF

5,0 g de subnitrato de bismuto foram dissolvidos em 50,0 mL de água destilada, seguido da adição de 12,0 mL de ácido clorídrico concentrado sob agitação. Em seguida, adicionou-se lentamente 25,0 g de iodeto de potássio. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100,0 mL de solução. A 25,0 mL desta solução foram adicionados 18,0 mL de ácido acético glacial, completando-se o volume final da solução com água destilada para 100,0 mL.

Esse reagente é empregado para a detecção de alcalóides e peptídeos, cicloexilaminas, polietilenoglicóis e derivados, compostos de óxido polietileno, lactamas, lipídeos e esteróides α,β -insaturados.

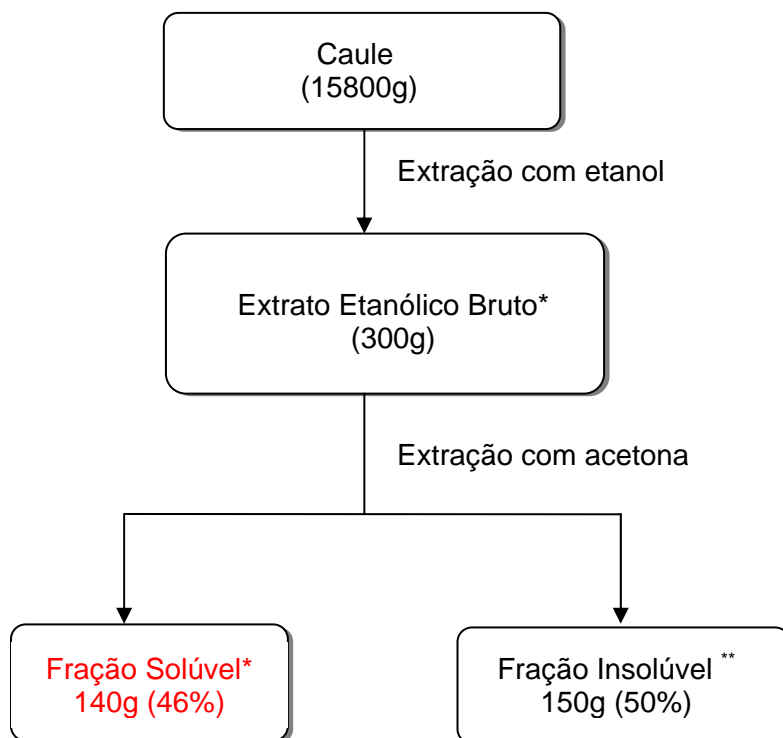
2.6.8 TESTE PARA ANTRAQUINONAS, ANTRONAS E COUMARINAS

Foram marcados os pontos com os extratos-teste em placas cromatográficas que foram eluídas com clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observou-se a presença das cores indicativas em luz UV 365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica coumarina.

2.7 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA *SERJANIA LETHALIS*

O extrato etanólico bruto (item 2.2.1) 300g foi então submetido a um simples extração com acetona (1L) (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 - Extração com acetona



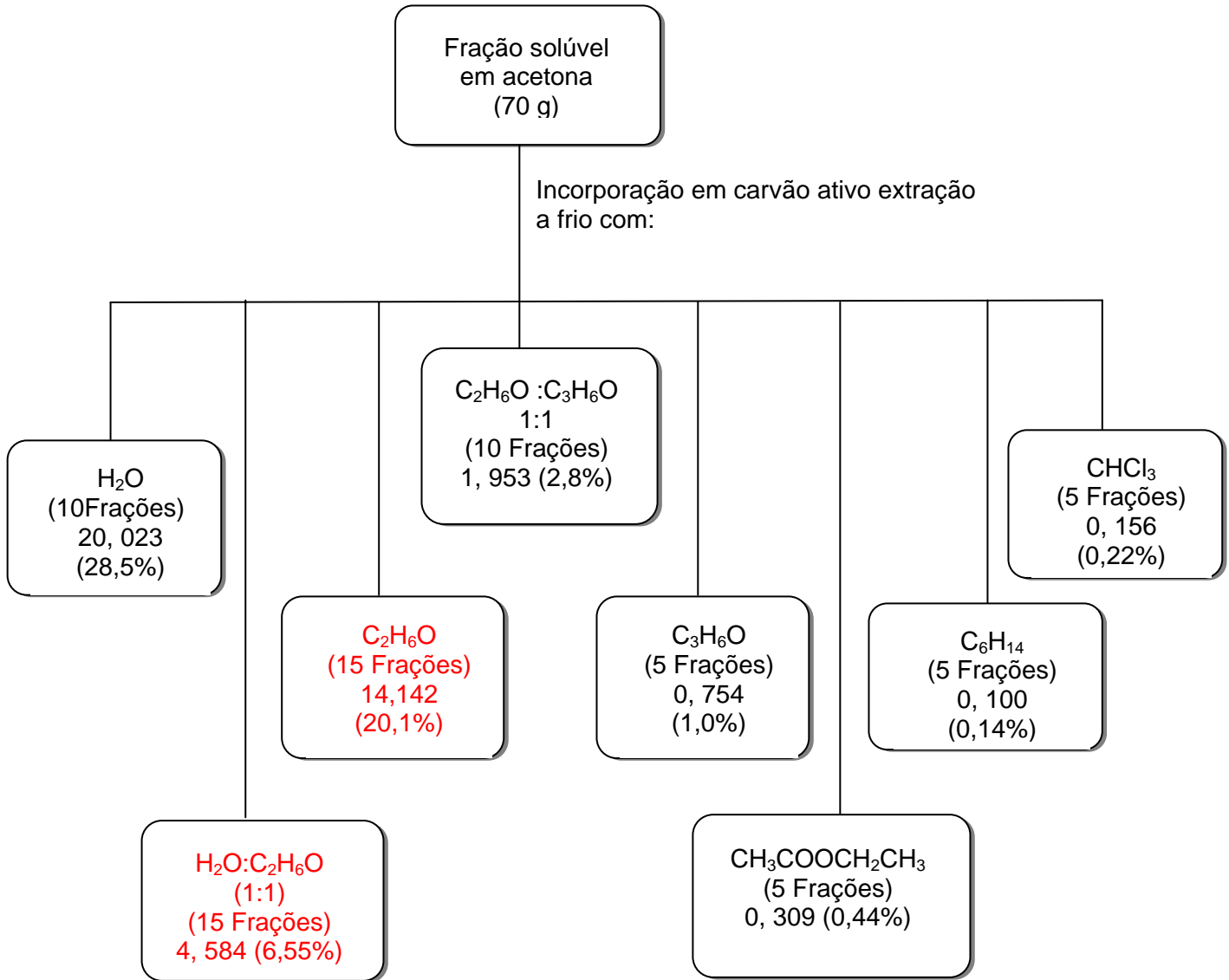
*Extrato Ativo nos ensaios Moluscicida e miracicida

**Fração com atividade no ensaio antimicrobiano

2.7.1 FILTRAÇÃO EM CARVÃO ATIVO

Parte da fração solúvel em acetona (70 g) foi solubilizado em metanol e incorporado no carvão ativo até que toda a fração tomasse forma de um pó. O sistema montado consiste de funil de Buchner forrado com papel de filtro e uma camada de gel de sílica (3 cm), seguindo com a adição da amostra incorporada e coberta com papel de filtro. A eluição foi feita utilizando como fase móvel: água, etanol: água (1:1), etanol, acetona: etanol (1:1), acetona, acetato de etila, hexano e clorofórmio, com a obtenção de 8 frações de volume iguais a 1,2L (Fluxograma 3). O rendimento de recuperação foi de 75%.

Fluxograma 3 - Fracionamento através de partição liquido-liquido



Tendo sido observada a total solubilidade da fração hidroetanólica de coloração amarelo pardo em metanol, foi feito o fracionamento de 800 mg (200 mg por coluna realizada) em coluna de sephadex LH 20, cujo rendimento foi de 90%. Foram coletadas 142 frações de 7 mL cada. As frações coletadas obtidas neste estudo foram analisadas em CCDA, tendo como eluente Piridina (P):Butanol (B):Água (A) (100:35:25v/v). Outras fases móveis foram avaliadas, mas não se observou em nenhum dos casos uma boa separação dos constituintes da amostra.

As fases móveis utilizadas não possibilitavam a visualização de qualquer separação cromatográfica em CCDA, demonstrando sempre manchas contínuas após revelação. Foi por isso que como alternativa buscou-se outra fase estacionária, para as placas de CCDA, a CCDA C-18. Após análise comparativa seguiu-se a reunião das frações em 10 grupos como demonstra a tabela abaixo:

Tabela 8- CCDA-C 18 das frações provenientes da cromatografia em sephadex

<i>Sistema de eluição</i>	<i>Grupos</i>	<i>Peso das frações(mg)</i>
AcOet:MeOH: Ac. Acético (8:2:0,01).	1-3	70
	4-17	300
	18-31	201
	32-49	97,4
	50-60	15,9r
	61-79	5,0
	80-101	12,9
	102-115	14,3
AcOet:MeOH:Ac. Acético (6,5:3,5:0,01).	116-131	29,5
	132-142	20,8

As placas de CCDA C-18 foram usadas e a fase móvel que possibilitou a melhor separação cromatográfica foi AcOet:MeOH:Ac.Acético (8:2:0,01). Isto nos levou a pensar em fazer uma cromatografia em coluna aberta usando a sílica C-18 (fase reversa) feita no laboratório (item 2.7.2.1), com técnica isocrática, mas a amostra 4-17 (Tabela 8) proveniente da

separação em sephadex LH 20 apresentou dificuldades de solubilidade nos solventes indicados para este tipo de cromatografia.

A fração 4-17 (300mg) em forma de cristais brancos com poucos pontos (CCDA-C18) foi novamente submetida à cromatografia em coluna de sephadex LH 20 e forneceu 51 frações com cerca de 7mL cada.

Nesta etapa a investigação comparativa em CCDA sílica foi realizada com a fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:2:0,01) (Tabela 9).

Tabela 9 - Reunidas das frações provenientes da coluna de cromatografia em sephadex LH- 20 da fração 4-7 (300mg).

Sistema de eluição	Grupos	Peso das frações(mg)
$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:2:0,01).	1-6	21
	7-11	18
	12-30	27
	31-35	82
	36-47	130

A purificação seguiu com a utilização da técnica de Cromatografia em Camada Delgada em escala Preparativa (CCDP) [sílica gel, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:2:0,01)] para a fração 36-47 (130mg) com apenas três pontos em CCDA sílica levando ao isolamento de um sólido branco codificado SLS (35mg).

2.7.2 FRACIONAMENTO EM FASE REVERSA C-18:

A característica polar do material estudado levou a necessidade de empregar uma fase estacionária quimicamente ligada. Para isto foi utilizada a sílica C-18 cuja preparação foi realizada conforme descrição abaixo.

2.7.2.1 PREPARAÇÃO DA FASE REVERSA

A sílica em fase reversa, denominada C-18, foi obtida por meio de metodologia adaptada (BOTTOLI, et al., 2002; TONHI et al, 2002). Inicialmente a sílica (20g) foi ativada a 150° C por 24 horas. O polímero PMDS (13,3g) (Figura 17) foi dissolvido em hexano (400mL) e a sílica foi adicionada aos poucos, com agitação, por 3 horas. O solvente foi então evaporado a temperatura ambiente e o pó branco obtido foi aquecido a 120° C por 4 horas. O excesso de polímero foi removido com acetato de etila (300mL) e depois metanol (100mL) e o material foi então seco a temperatura ambiente e depois a 60° C.

A modificação da superfície da sílica, com a introdução de uma camada quimicamente ligada ao suporte tem como objetivo principal unir, em um só material, as propriedades químicas do polímero com a rigidez e a estabilidade térmica da sílica (Figura 18) (TONHI et al, 2002). Para que tal reação aconteça, é importante fazer a ativação da sílica através de aquecimento para remoção de hidratação da sílica. Por isso, é importante também o uso de hexano anidro.

2.7.2.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA FASE REVERSA:

Foram realizados primeiramente testes em pequena escala para avaliar a eficiência do método. Em micro seringas de 3 mL com 500 mg de C-18 e condicionada com 5mL de metanol e 10 mL de água destilada, foram adicionados 12,5 mg da amostra proveniente da fração etanólica obtida da filtração em carvão. A amostra foi dissolvida em água e submetida a análise cromatográfica empregando como eluentes soluções binárias com crescente volume de metanol (Tabela 10). Desta vez o rendimento alcançado foi de cerca de 80%.

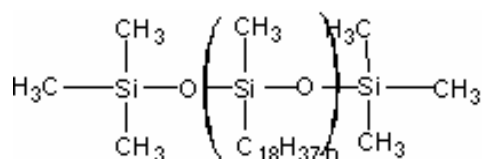


Figura 16 - Formula estrutural do polímero PMDS.

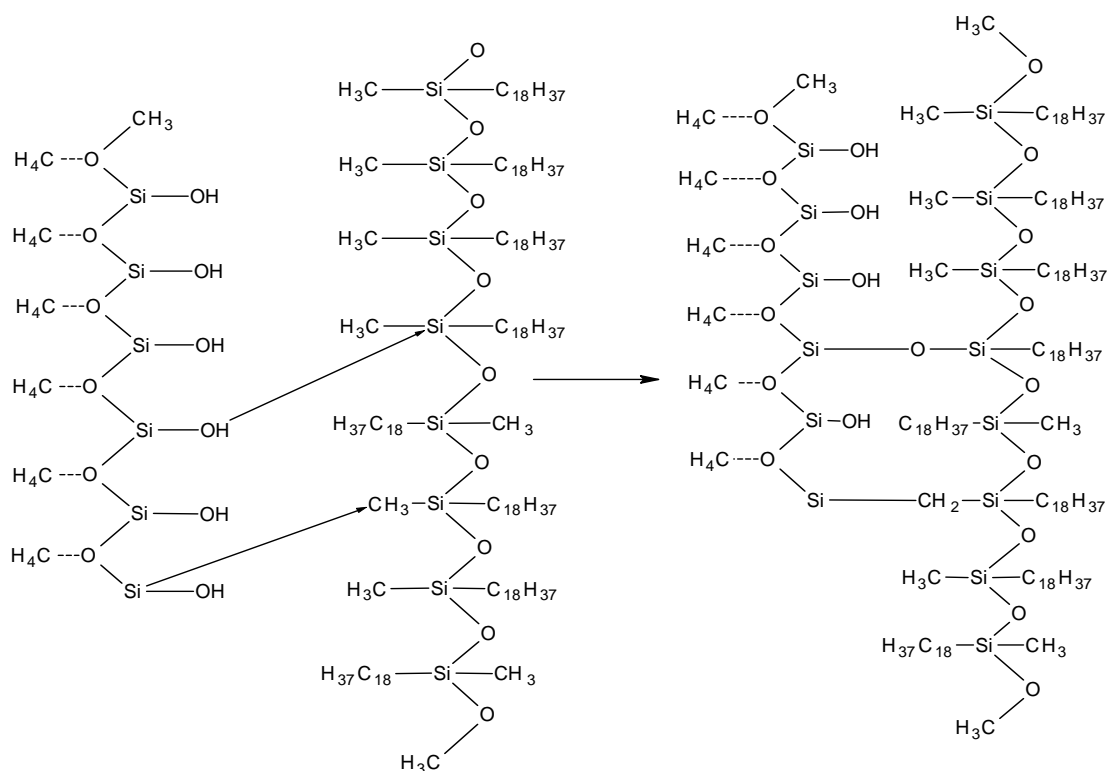


Figura 17 – Representação esquemática da reação de imobilização de PMODS em sílica (adaptada de TONHI et al, 2002).

2.7.2.3 ESCALA PREPARATIVA

A realização da cromatografia em fase reversa foi empregada em escala preparativa para o fracionamento da fração etanólica (carvão), foram utilizados 600 mg da amostra para 26 g de sílica C-18, e eluída com o mesmo gradiente empregado no teste (Tabela 10).

As frações 8,5:1,5 v/v (106mg) e 90:10 v/v (200mg) (Tabela 10) com apenas três pontos em CCDA foram reunidas e analisadas por CLAE coluna analítica (15 cm x 0,46 cm) fase reversa e fase móvel ACN:H₂O 10:90 (v/v), fluxo de 0,5 ml/min (Figura 19, pg 57) .

Tabela 10- Gradiente de eluição da cromatografia em sílica C-18

<i>Fração</i>	<i>Eluente</i>	<i>Peso das Frações(mg)</i>
1	(H ₂ O)	10,4
2	Água :Metanol H ₂ O :C ₁ H ₄ O (8:2 v/v)	6,4
3	Água :Metanol H ₂ O :C ₁ H ₄ O (7:3 v/v)	10,2
4	Água :Metanol H ₂ O :C ₁ H ₄ O (6:4 v/v)	85,7
5	Água :Metanol C ₁ H ₄ O: H ₂ O (5:5v/v)	47,9
6	Água :Metanol C ₁ H ₄ O :H ₂ O (7:3 v/v)	50,4
7	Água :Metanol C ₁ H ₄ O: H ₂ O (8,5:1,5 v/v)	106,00
8	Água :Metanol C ₁ H ₄ O:H ₂ O (9:1 v/v)	200,00
9	Metanol C ₁ H ₄ O	90,2

2.8 SEPARAÇÃO POR DIÁLISE

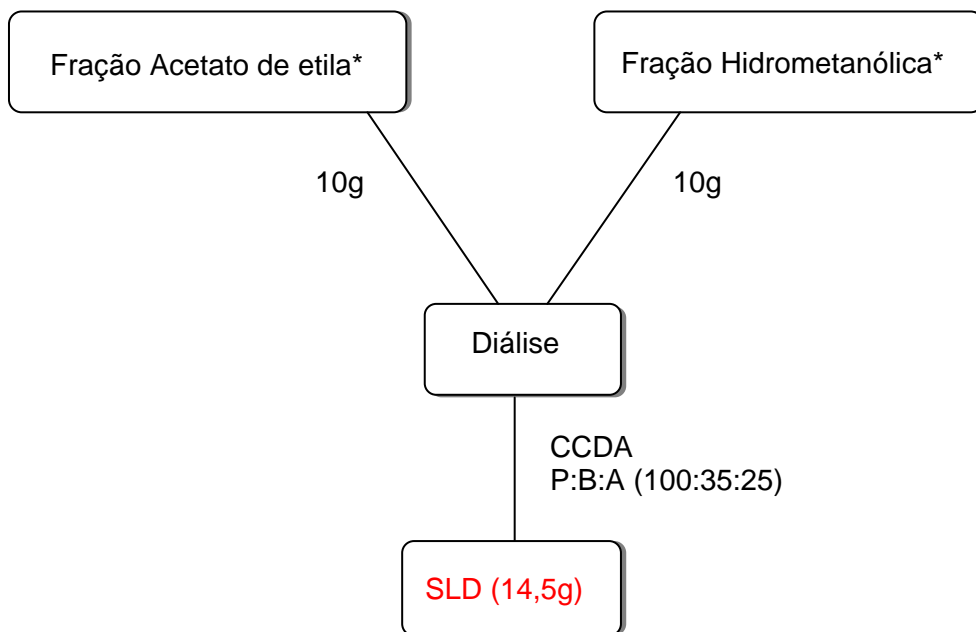
Para realizar diálise foram utilizadas as frações em acetato de etila e hidrometanólica provenientes de partição líquido-líquido (Fluxograma 1,pg 34).

A diálise foi realizada com a utilização de membrana sintética, na qual foram colocadas 10 g de cada fração e então imersa em 500 ml de água deionizada. A água do recipiente era substituída a cada 72 hs com a obtenção de seis frações para cada amostra as quais foram submetidas à liofilização para posterior análise.

O material dialisado envolvendo as frações hidrometanólica e acetato de etila tiveram suas análises qualitativas feitas por cromatografia em camada delgada (CCDA sílica) com fase móvel Piridina:Butanol:Água (100:35:25) e demonstraram tratar-se dos mesmos componentes, permitindo a reunião das

frações para a obtenção da substância SLD (Fluxograma 4). Foi realizada análise em CLAE (100mg), usando-se coluna de sílica (0,46cm x 15cm) com fase móvel diclorometano:hexano (60:20 v/v).

Fluxograma 4 – Diálise como método alternativo de separação



*Frações Ativas nos ensaios antibióticos.

A fração SLD de coloração vermelha (8g) foi fracionada em coluna de gel de sílica desativada com 10% de água (150g). Foram coletadas 140 frações de 50mL cada empregando-se na eluição das mesmas clorofórmio e metanol nas proporções abaixo:

Tabela 11- Gradiente de eluição da cromatografia em sílica desativada.

Frações	Eluentes
1-41	CHCl ₃
42-80	CHCl ₃ :MeOH 10%
81-104	CHCl ₃ :MeOH 20%
105-116	CHCl ₃ :MeOH 30%
117-123	CHCl ₃ :MeOH 50%
124-126	CHCl ₃ :MeOH 70%
127-134	CHCl ₃ :MeOH 90%
134-140	MeOH

Por comparação em CCDA foi possível reunião em dois grupos (Tabela 12)

Tabela 12 - CCDA das frações provenientes da cromatografia em sílica desativada

Sistema de eluição	Grupos	Peso das frações(g)
AcOEt:MeOH (9:1)	1-104	3,04
AcOEt:MeOH (7:3)	105-140	3,91

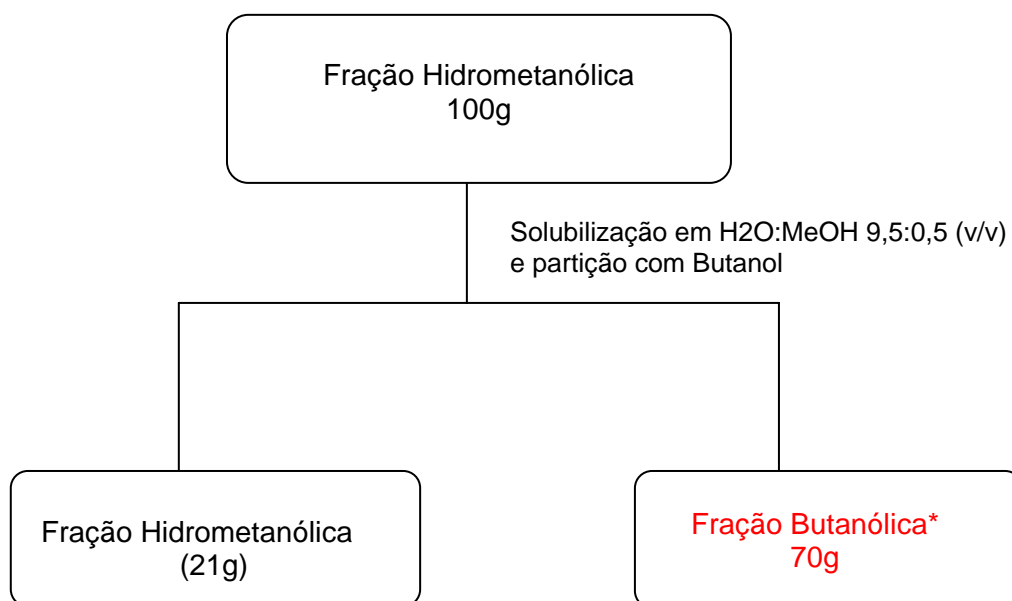
A fração 1-104 (3,04g) com aspecto e cor de mel analisada por CCDA demonstrou dois pontos bem separados e teve a purificação alcançada por separação em gel sephadex LH20. Este fracionamento foi realizado em 4 etapas empregando-se 750 mg de amostra por vez. Das quatro colunas realizadas foram coletadas cento e vinte frações de cerca de 7 mL cada.

O processo cromatográfico resultou em uma substância codificada como SLD (2,18 g), considerado puro após apresentar uma única mancha em cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se AcOEt:MeOH (9:1) e AcOEt:MeOH (7:3) como eluentes. A substância foi caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear.

2.9 PARTIÇÃO LIQUIDO-LIQUIDO DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DO CAULE DE *SERJANIA LETHALIS*

Parte da fração hidrometanólica (100g) obtida como mostra o fluxograma 1 página 34 foi submetida à extração com butanol. A fração foi solubilizada em 250mL de água:metanol 9,5:0,5 (v/v) e acrescentou-se 250 mL de butanol. Esta suspensão foi extraída sucessivamente com butanol (Fluxograma 5). As frações butanólica e hidrometanólica foram concentradas em aparelho rotatório a baixa pressão. Ao final foram obtidos 70 g da fração em butanol e 21 g da fração em água. A fração butanólica foi posteriormente testada no ensaio moluscicida.

Fluxograma 5 – Partição butanólica



*Material Ativo nos Ensaios Moluscicida.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

O estudo de prospecção fitoquímica foi efetuado utilizando a metodologia descrita por MATOS (1997) que tem como base as reações de coloração ou formação de precipitado. É um método rápido e bem informativo, porém não conclusivo. A prospecção fitoquímica da espécie *Serjania lethalis* envolvendo as frações estudadas para fracionamento apresentou os grupos químicos demonstrados na tabela 13.

Tabela 13 - Classes de compostos detectados nas frações trabalhadas para purificação.

Frações (Caule)	Fenóis	antocianinas, antocianidinas	Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis, Xantonas	Flavonas, Flavonóis e Xantonas	Esteróides Triterpenos	Leucoantocianidinas	Antraquinonas	Saponinas	Alcalóides
Fração Butanólica	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Fração Solúvel em Acetona	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Fração Hidrometanólica	+	-	-	-	+	-	-	+	-

+ = detectado; - = não detectado

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA

Foram utilizadas para determinar a atividade moluscicida às frações: Solúvel em acetona (item 2.7), e butanólica (item 2.9) e dialisada, e também o extrato etanólico bruto. O melhor resultado em termos de atividade moluscicida foi obtido com a fração butanólica que levou a 100% de mortalidade nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 80% na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (tabela 14).

Tabela 14- Atividade frente ao caramujo *B. glabrata*

<i>Extrato ou fração (Caule)</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	<i>Mortalidade (%)</i>	<i>Conc. Letal (CL_{90}) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	
Extrato etanólico	100	100	65,01	
	50	93		
	10	40		
	1	23		
Solúvel em acetona	100	100		
	50	40		
	10	0		
Butanólica	100	100		10,62
	50	100		
	10	80		
	5	80		
	1	0		
Dialisada	100	40		
	50	0		
	10	0		

A fração butanólica apresentou-se ativa com uma $CL_{90}=10,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 24 horas de exposição. Esse resultado foi considerado muito bom quando se compara levando em conta que se trata de uma fração ainda complexa, com a niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida), que é um composto puro e um moluscicida sintético que promove 100% de mortalidade no caramujo adulto, *B. glabrata*, na concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ em 2 horas de exposição (SANTOS, 2005). Porém este moluscicida sintético pode apresentar uma série de desvantagens como já foi discutido no item 1.3 (pg 15). Uma vantagem dessa planta é o fato de possuir ampla distribuição geográfica.

A partição com butanol pode ser considerado um bom caminho em busca de um princípio ativo, dado o decréscimo observado no valor da CL_{90} da fração butanólica em relação ao extrato etanólico bruto do caule, (utilizado para a partição) que foi determinado como sendo $CL_{90} = 65,01 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como objetivo principal deste trabalho foi obter componentes puros com atividade contra o *Schistosoma mansoni* a substância pura isolada e codificada de SLS (pg 46) foi ativa no teste frente ao verme adulto de *Schistosoma mansoni*.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A espécie *S.lethalis* teve sua atividade antimicrobiana testada em várias cepas de três diferentes microorganismos: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Dispondo-se de cinco amostras envolvendo extratos e frações da planta enumeradas de 21 a 25 (item 2.4.2) (90µg/mL/disco) e de um padrão de referência (Ofloxacina 5µg/mL por disco ou Fluconazol 75 µg/mL por disco).

Não foi verificada nenhuma atividade das frações frente a *Enterococcus faecalis* (padrão Ofloxacina), e apenas 12 e 8 mm de inibição para a fração insolúvel em acetona frente a *Candida albicans* (padrão Fluconazol, Tabela14), enquanto que para *Pseudomonas aeruginosa* houve uma ação bastante significativa para todas as amostras testada envolvendo pelo menos duas das cepas testada, a droga padrão foi Ofloxacina (Tabela15).

Tabela 15 - Resultados da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais frente a *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	Extrato Etanólico (Raiz)	Extrato Etanólico (Folha)	Fração CHCl ₃ (Caule)	Fração Acetona S ^a (Caule)	Fração Acetona I ^b (Caule)	Padrão ^c
IC01	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC03	-----	-----	-----	-----	-----	25mm
IC05	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC07	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC08	-----	-----	-----	-----	12mm	26mm
IC09	-----	-----	-----	-----	8mm	-----
IC10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC11	-----	-----	-----	-----	-----	15mm
IC15	-----	-----	-----	-----	-----	-----

^a Solúvel; ^b Insolúvel; ^c Fluconazol

Tabela 16 - Resultados da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais frente a *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Extrato Etanólico (Raiz)	Extrato Etanólico (Folha)	Fração CHCl ₃ (Caule)	Fração Acetona S ^a (Caule)	Fração Acetona I ^b (Caule)	Padrão ^c
IC01	-----	09mm	-----	-----	12mm	-----
IC03	-----	-----	17mm	-----	09mm	-----
IC04	11mm	-----	-----	-----	15mm	-----
IC06	13mm	10mm	-----	-----	-----	-----
IC07	-----	-----	-----	-----	09mm	-----
UFPEDA 39	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC12	-----	09mm	-----	-----	09mm	-----
IC16	-----	-----	-----	08mm	09mm	19mm

^a Solúvel; ^b Inolúvel; ^c Ofloxacina

3.3 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

3.3.1 CLAE DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA CROMATOGRAFIA EM FASE REVERSA C-18

Através do estudo cromatográfico das frações 8,5:1,5 v/v e 90:10 v/v (item 2.7.2.3 pg 49) observou-se um perfil cromatográfico com a existência de poucas bandas não muito bem resolvidas com absorção em comprimento de onda de 210nm. A semelhança cromatográfica permitiu a reunião destas frações e sua total solubilidade em metanol, possibilitou a sua purificação pela aplicação (160mg) em coluna de sephadex LH-20, com obtenção de 60 frações devidamente reunidas, fornecendo um cromatograma mais limpo e bem resolvido nas mesmas condições envolvendo as 29 frações de origem (Figura16). O cromatograma após cromatografia em sephadex demonstra a predominância de duas substâncias e sendo assim seria possível o isolamento das mesmas para posterior identificação estrutural (Figura 20 e 21).

Contudo o isolamento não foi adiante por conta da baixa solubilidade da amostra na fase móvel que melhor separou, sabendo que outras fases com

maiores volumes de metanol foram testadas sem sucesso na separação cromatográfica.

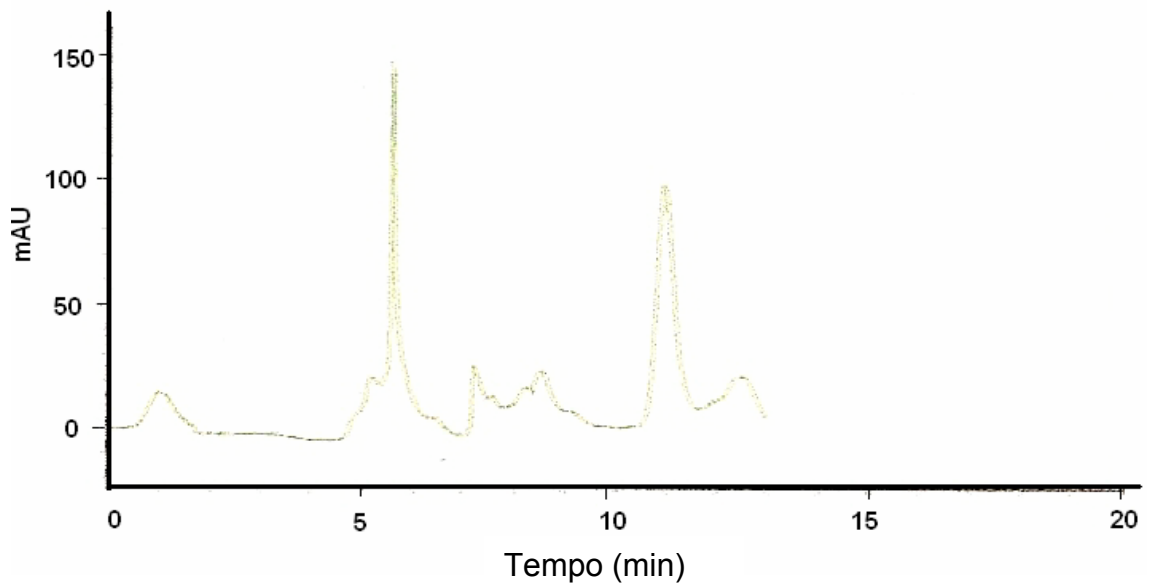


Figura 18 – Exemplo da separação analítica das frações 5 e 10 % provenientes da cromatografia em coluna aberta com C-18.

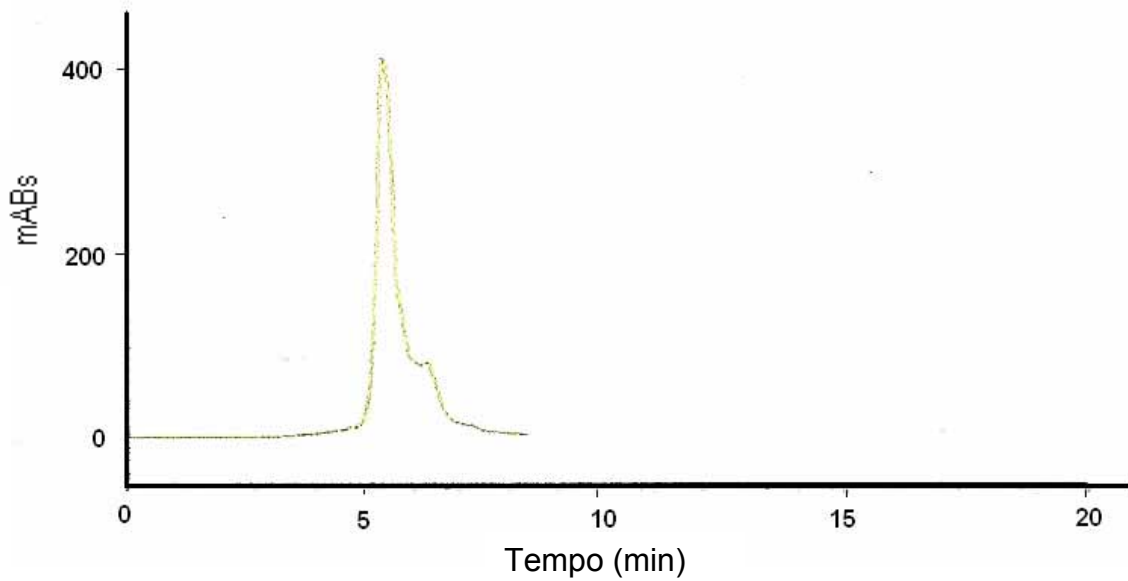


Figura 19 - Substância isolada a partir do cromatograma demonstrado na Figura 18.

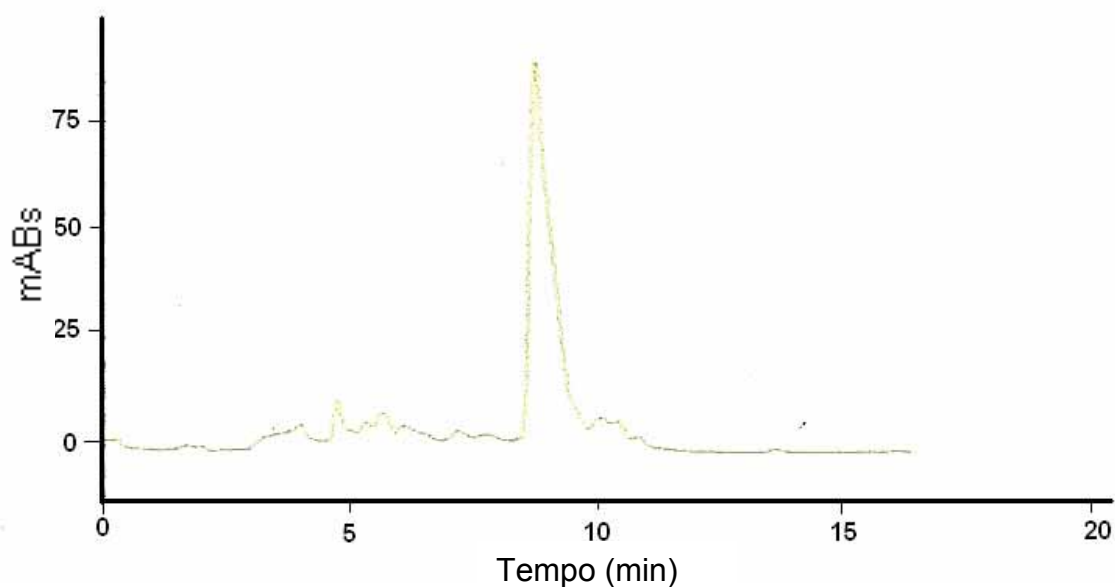


Figura 20- Substância isolada a partir do cromatograma demonstrado na Figura 18.

3.3.2 CLAE DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA DIÁLISE

A análise em CCDA apresentou $R_f = 0,5$, com apenas um ponto revelado, sugerindo um relativo grau de pureza para a fração proveniente de diálise (SLD) (item 2.9). Para confirmar a eficiência da separação foi realizada análise em CLAE, coluna de sílica (0,46cm x 15cm) com fase móvel diclorometano:hexano (60:20, v/v), cujo cromatograma indicou a presença de poucas bandas, com duas de boa resolução (Figura 22). Entretanto o isolamento não seguiu adiante por conta do baixo rendimento observado. Com injeção total de 100mg, resultou menos que 10mg da substância 1 e apenas 5mg da substância 2, levando-nos a acreditar que a terceira banda é quantitativamente maior ou que a fase estacionária não fosse a apropriada. O isolamento seguiu com o emprego da técnica cromatográfica em coluna aberta.

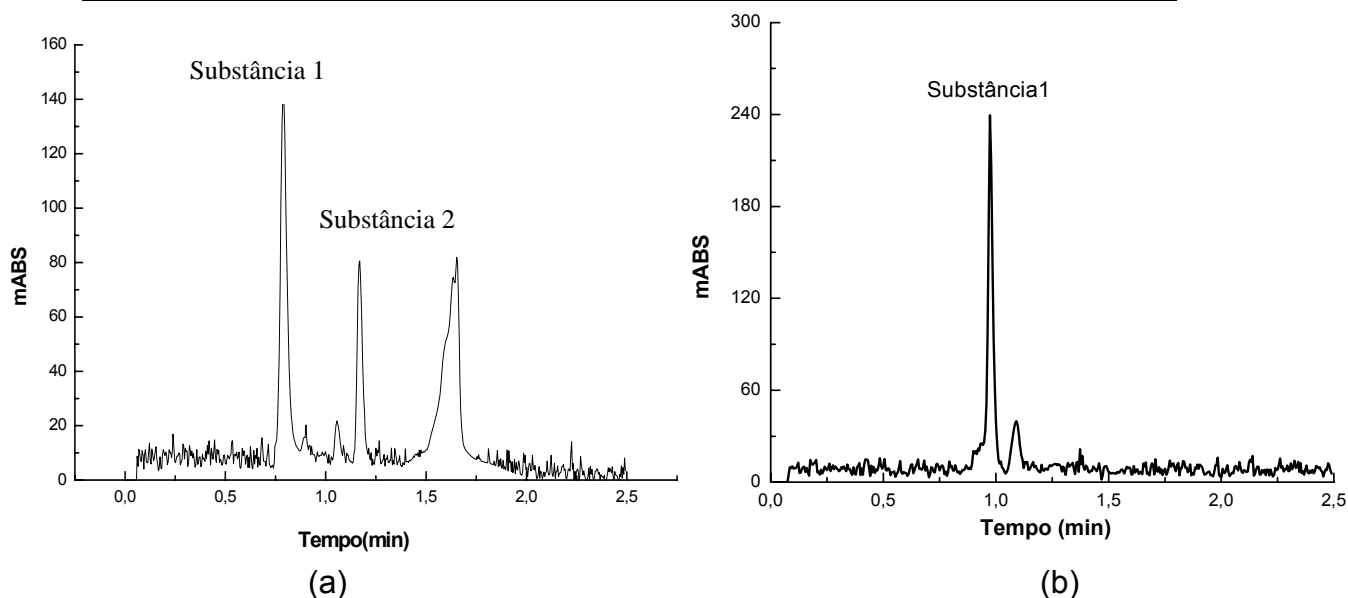


Figura 21 – (a) Perfil cromatográfico da fração 1 (diálise) e (b) Isolamento da substância 1.

3.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

3.4.1 SAPONINA SLS

A substância SLS foi isolada como cristais na forma de agulha incolor. A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 24) dessa substância registrado em CD_3OD indicou tratar-se um composto de estrutura bastante complexa. O espectro de hidrogênio mostrou a presença de sinais para seis grupos metila na região mais protegida δ (0,8-2,15). Na região entre δ 2,8-5,0 pôde se observada uma série de sinais, destacando-se, os hidrogênios anoméricos em δ 4,55 (d, $J = 4,52$ Hz), δ 5,05 (d, $J = 1,95$ Hz) e em δ 5,25 (d $J = 1,40$ Hz), característicos da porção glicona em uma saponina. Os sinais a δ 5,25 e δ 5,05 provavelmente referem-se ao H1 de duas unidades α -ranminose. Para a provável porção aglicona observaram-se sinais referentes a hidrogênios olefinicos δ 5,25 s e três hidrogênios oximetínicos em δ 3,12 (dd $J = 4,91$ e $J = 4,36$ Hz), δ 4,46 (d, $J = 6,69$ Hz) e 4,58 (d, $J = 7,34$ Hz). A presença de um sinal simples numa região de relativa desproteção δ 2.15 s refere-se provavelmente a um grupo metila α a um carbono carbonílico (δ 208,92).

A análise comparativa entre os espectros de RMN de carbono, DEPT 135 (Figura 26), obtidos em CD_3OD , permitiu verificar um total de 48 sinais correspondentes aos 48 átomos de carbono para a saponina SLS. Destes, sete

são quaternários, oito são metínicos, nove são metilênicos e seis são metílicos (Tabela 16). Os valores de deslocamento químico mostram entre os oito carbonos quaternários a presença de dois carbonos carbonílicos (δ 208,92 e δ 180,55), três carbonos de junção de anel (δ 41,49 e δ 39,16) um carbono olefínico (δ 143,80) e um carbono saturado ramificado (δ 48,37). Através da análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 25) é possível indicar para a substância dois carbonos carbonílicos (δ 180,55 e δ 208,92), uma ligação olefínica trissubstituída a δ 143,80 e 122,22. O espectro indica a presença de um grupo oximetilênico com sinal em δ 61,23 na porção aglicona. Os sinais em δ (103,43; 100,80; 100,62) referem-se aos carbonos anoméricos dos açúcares.

De acordo com os deslocamentos químicos observados e análise de comparação com a literatura foi possível propor a existência de três açúcares interligados onde dois deles são a ranminose e outro trata-se da 6-O-Metil galactose. A presença da ranminose justifica os dupletos numa região de desproteção δ 5,05 (d, $J = 1,95$ Hz) e δ 5,25 (d, $J = 1,40$ Hz), próprios dos hidrogênios anoméricos dos açúcares e também os dupletos na região de proteção (δ 1,27 $J = 6,2$ Hz e δ 1,20 $J = 6,1$ Hz) atribuídos ao grupo metila presente em cada açúcar. O sinal que caracteriza o hidrogênio olefínico apresentou sobreposição com o hidrogênio anomérico da ranminose em δ 5.26. Foi através dos dados obtidos com espectros de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT 135) que foi feita a proposta inicial da estrutura química desta substância

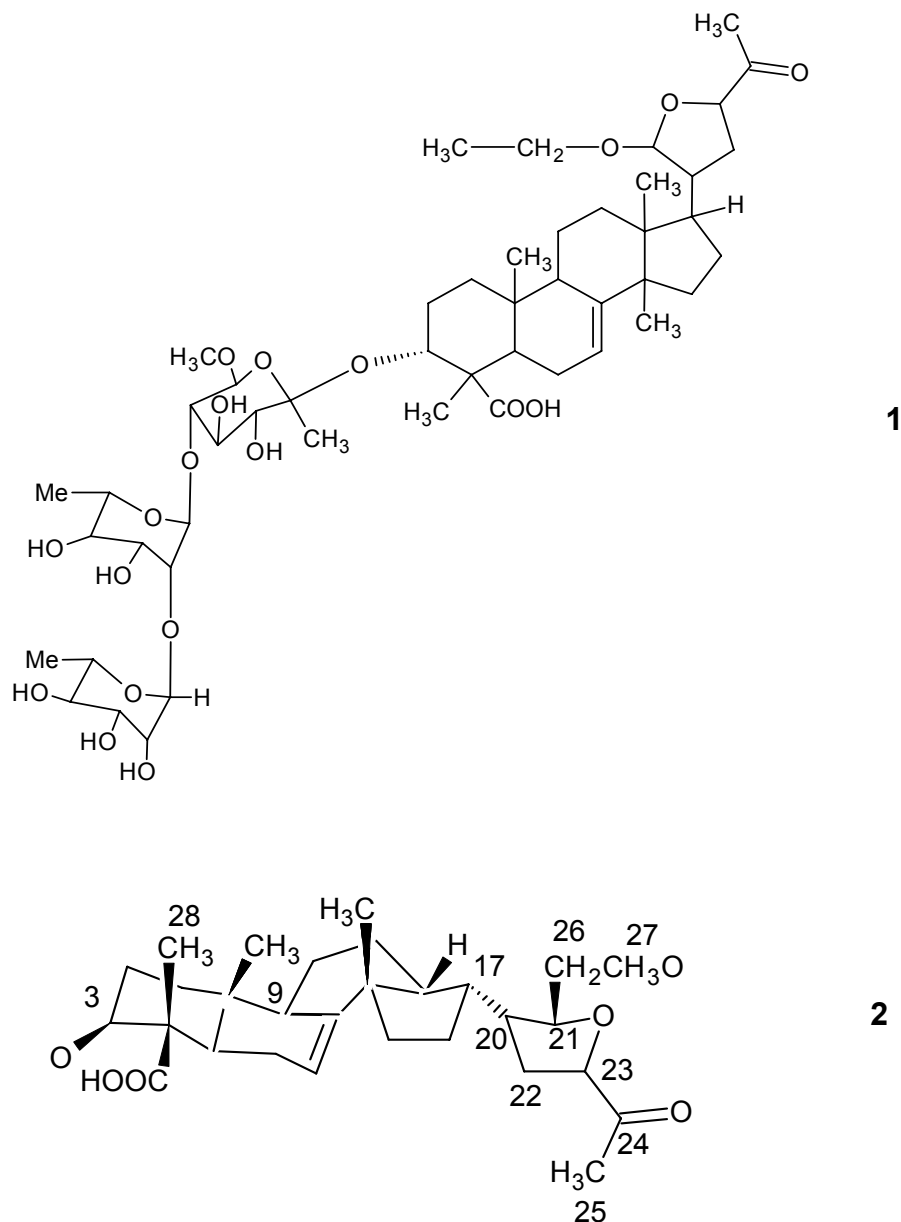


Figura 22 – (1) saponina 3-O- [β - O- galactopiranosil (1 \rightarrow 4) α -ramnopiranosil (1 \rightarrow 2) α -ramnopiranosil. (2) Sapogenina corretamente enumerada.

A análise dos mapas de contorno bidimensionais (HMBC, HSQC e COSY) reforçou a proposta estrutural inicial. A reunião dos dados de RMN sugere para a substância SLS a estrutura de um triterpeno do tipo Tirucallano (Figura 15, pg 28) (NI et al.,2006). Esta proposta estrutural está de acordo com LAVAUD, et al. 2001 que relata que a grande maioria dos heterosídeos obtidos de Sapindaceae possui um anel triterpênico como aglicona.

A sobreposição entre os sinais atribuídos ao hidrogênio olefínico da aglicona e o hidrogênio anomérico da raminose em δ 5.26 foi enfatizada pela análise do mapa de contorno HSQC (Figura 24).

A análise do mapa de contorno HMBC enfatiza a existência de um grupo metil cetona terminal, ao verificar o sinal que correlaciona o hidrogênio em δ 2.15s com o carbono carbonílico (δ 208,92) (Figura 29).

O COSY auxiliou na constatação de sinais que explicam fatos como a vizinhança entre o H-17(δ 2,85 d, J= 4,04 Hz) e o H-20 (δ 1,69). Além disso, correlações entre os dois hidrogênios oximetínicos H-21 (δ 4,46 J= 6,69Hz) e H-26 (δ 3,66 e δ 3,44), ajudaram na identificação estrutural. A não existência de qualquer correlação no mapa de contorno COSY no que se refere ao H-25 (δ 2,15 s) reforça a existência do grupo metila terminal. Apesar da sobreposição entre os sinais referentes ao hidrogênio olefínico e o hidrogênio anomérico da ranminose, ambos em δ 5,26 foi possível observar através de COSY suas correlações separadamente, onde o hidrogênio anomérico mostra correlação com δ 3,90 e o H-7 da dupla ligação correlaciona-se com H-6 em δ 1,90 (Figura 28).

A existência de duas ranminoses já tinha indícios evidentes nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , mas foi a partir do mapa de contorno HMBC que se propôs uma ligação do tipo 1-2 entre estas raminoses, uma vez que existe a correlação dos carbonos anoméricos em δ 100,80 (Ram1) e em δ 100,60 (Ram 2) com os hidrogênios anoméricos em δ 5,26 (Ram 2) e δ 5,05 (Ram1) respectivamente (Figura 29). A partir dos resultados obtidos foi dada a proposta representada na figura 23 para a substância codificada de SLS. Este tipo de esqueleto já foi relatado para outras duas substâncias isoladas da espécie *Sapindus mukorossi* pertencente à família Sapindaceae (NI et al., 2006; HUANG et al., 2007). É importante citar que de acordo com a avaliação literária realizada a substância isolada neste estudo é inédita. O isolamento de saponinas e outros compostos em geral na espécie *S. lethalis* é bem restrito. Apenas um relato na literatura foi encontrado referindo-se ao isolamento e identificação de uma saponina com esqueleto hederagenina nomeada de serjanosídeo (GIULIETTI ; 2006).

Tabela 17 – Dados de RMN da substância SLS

Posição Sapogenina	¹ H	J em Hz	¹³ C	HMBC
1	1,54m		32,59	0,85; 0,90; 1,01
2	1,17 ^{MI}		33,51	0,92
3	3,12 dd (1H)	4,91; 4,36	89,24	4,55
4	-		48,37	3,53; 3,17
5	0,85 m		55,61	0,90; 1,00
6	1,90 ^{MI}		22,66	0,80
7	5,26 d(1H)	1,95	122,22	-
8	-		143,80	1,17
9	0,90s (1H)		36,52	090
10	-		32,22	1,01; 0,85; ,16
11	0,80 ^{MI}		32,41	0,90; 1,00; 0,85
12	1,80 ^{MI}		25,60	-
13	-		41,49	0,80
14	-		39,16	0,81; 1,00; 094
15	0,94 ^{MI}		23,13	0,98; 1,69
16	0,98 d (2H)	4,39	27,45	094; 0,98
17	2,85 dd (1H)	4,04; 3,96	41,33	0,81
18	0,83 s(3H)		16,33	1,05
19	0,84 s(3H)		15,65	1,16; 0,84
20	1,69 ^{MI}		47,63	0,93; 0,80
21	4,46 d (1H)	6,69	104,67	-
22	1,64 ^{MI}		38,46	1,04
23	4,58 d (1H)	7,34	102,60	-
24	-		208,92	2,15
25	2,15 s (3H)		29,32	-
26	3,66;3,86 ^{MI}		61,23	-
27	1,05 s(3H)		27,26	-
28	1,16 s (3H)		25,06	-
29	-		180,55	-
30	0,96 s(1H)		14,66	0,85

MI Multiplicidade indefinida

Continuação

Porção Glicona	¹ H	J em Hz	¹³ C	HMBC
6-O-Metil galactose*				
1	4,55 d1(H)	4,52	103,43	-
2	3,53		77,02	-
3	3,17		76,40	-
4	3,70		76,64	-
5	3,96		75,69	-
6	3,34s (3H)		68,60	-
Ranminose1*				
1	5,05 d (1H)	1,37	100,80	5,26
2	3,95		76,35	5,05
3	3,85		70,18	5,05
4	3,39		72,62	1,28
5	3,75		69,02	1,28; 5,05
6	1,28 d (3H)	6,2	16,67	3,39
Ranminose2*				
1	5,26 d (1H)	1,95	100,60	5,05
2	3,90		78,17	5,26
3	3,44		70,69	5,05; 5,26
4	3,40		72,55	1,22
5	4,00		69,23	5,26; 1,22
6	1,22 d (3H)	6,1	22,63	-

*Não foi possível definir a multiplicidade de alguns hidrogênios glicosídicos

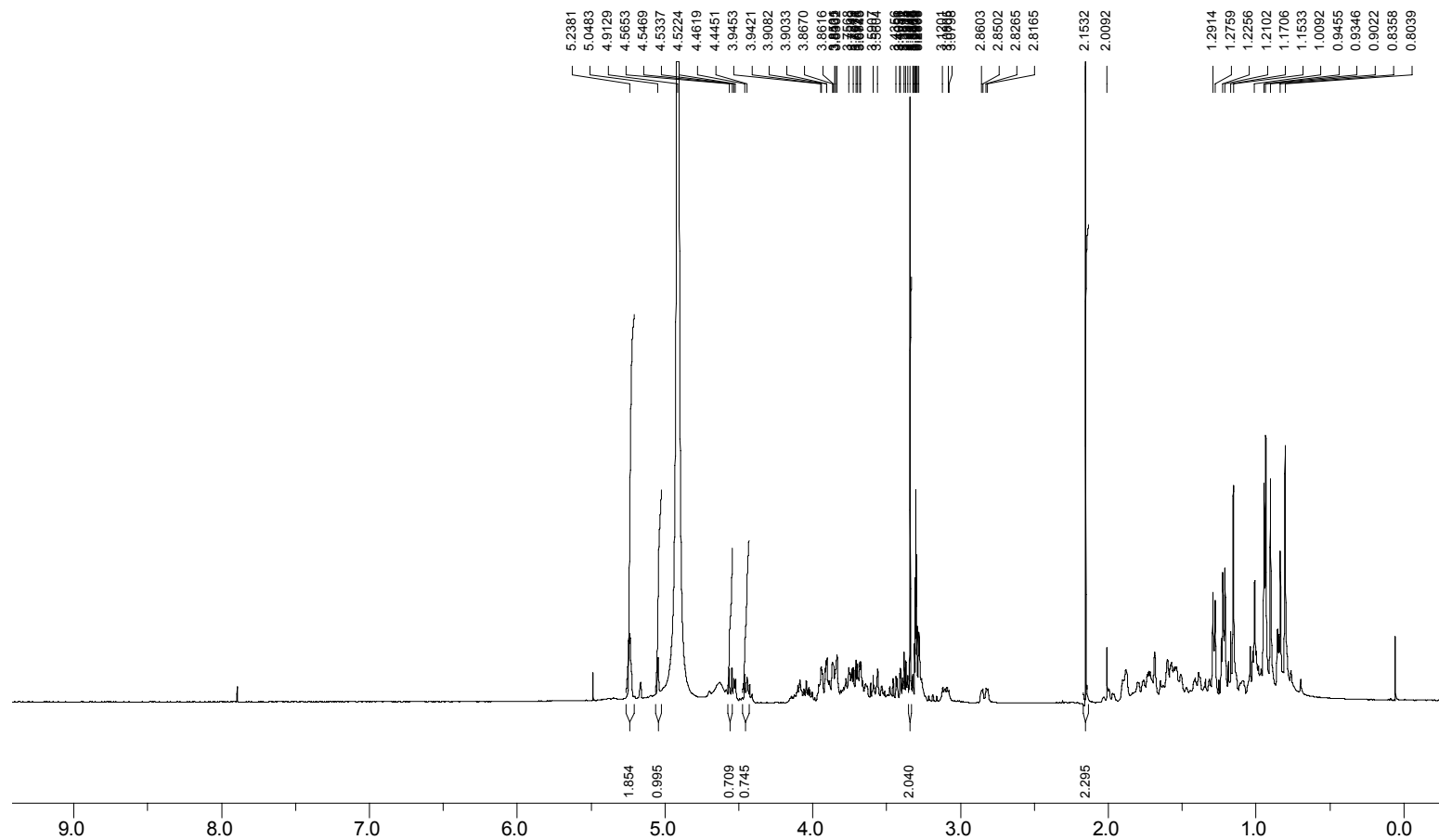


Figura 23 – Espectro de RMN de hidrogênio em CD₃OD a 400 MHz da substância SLS, padrão interno TMS

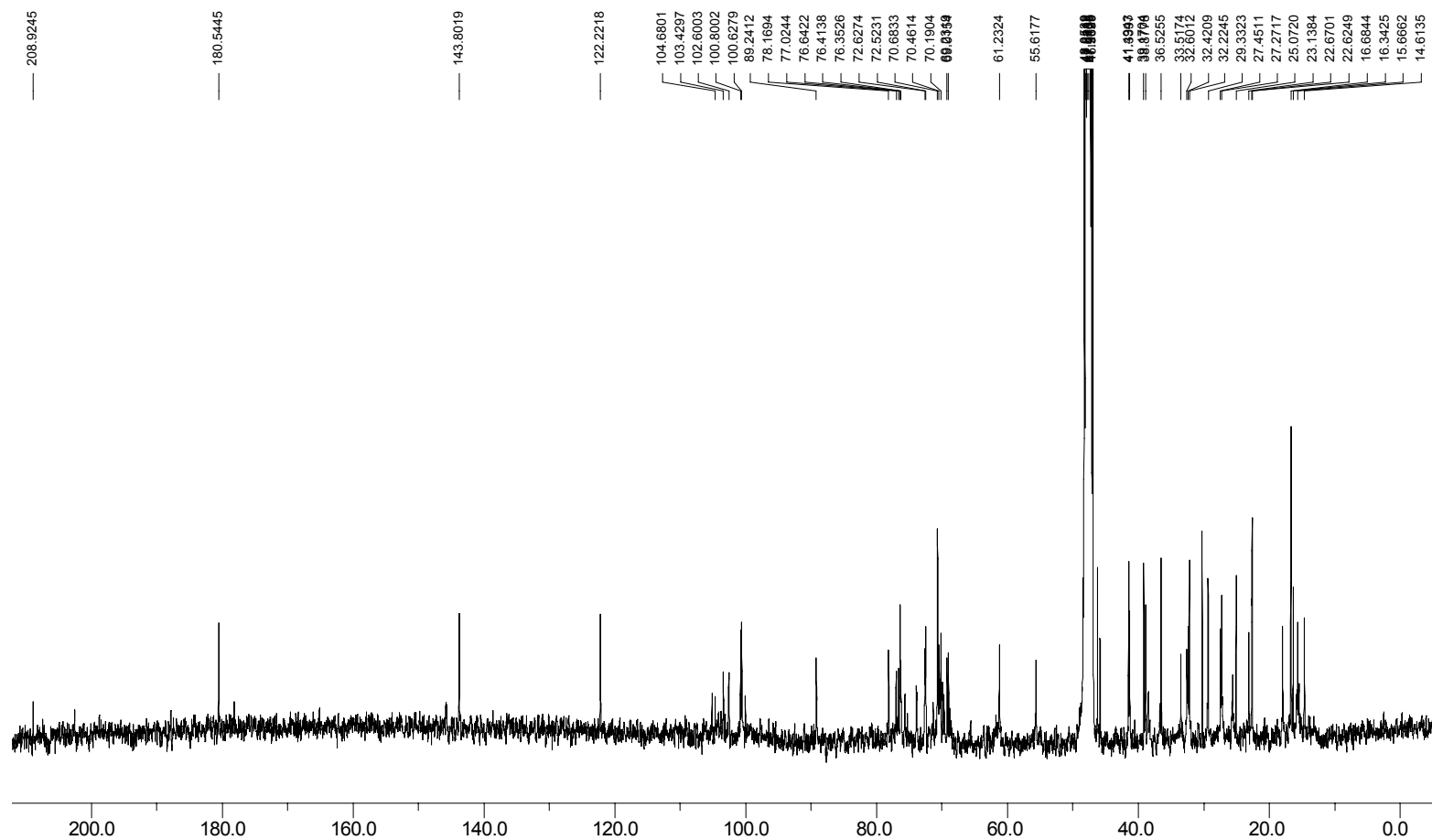


Figura 24 – Espectro de RMN de carbono em CD₃OD a 100 MHz da substância SLS, padrão interno TMS

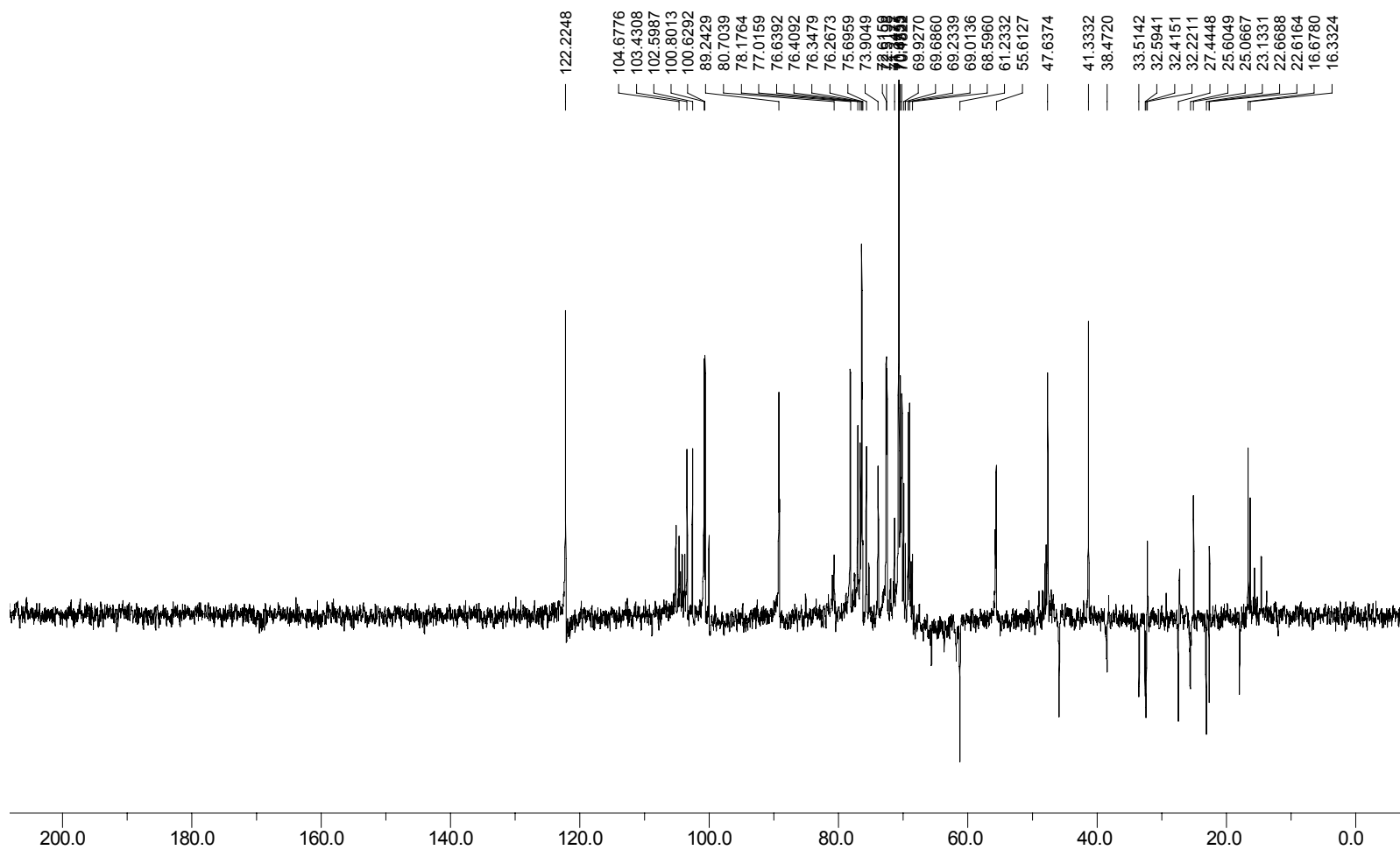


Figura 25 – Espectro de RMN DEPT 135 em CD₃OD a 100 MHz da substância SLS, padrão interno TMS

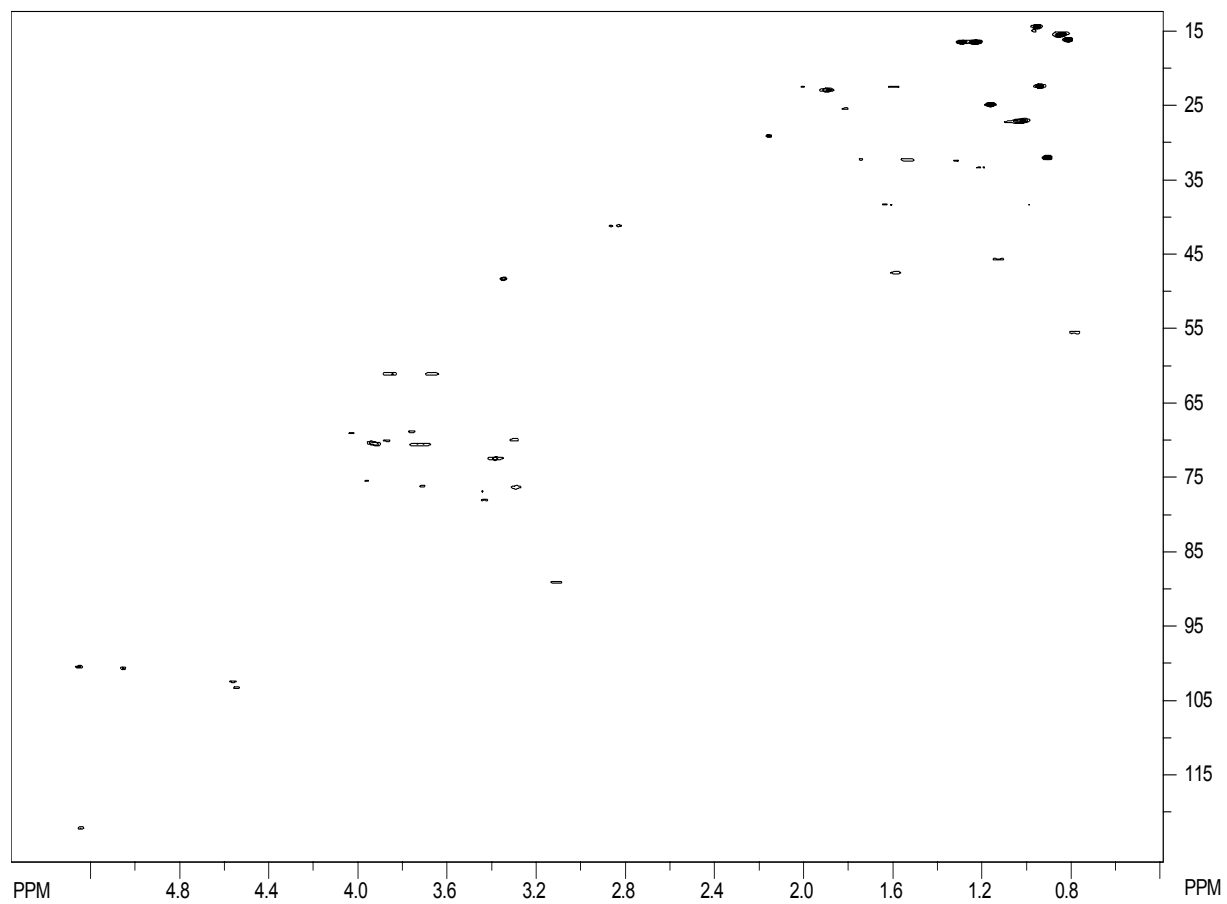


Figura 26 – Mapa de contornos HSQC da substância SLS

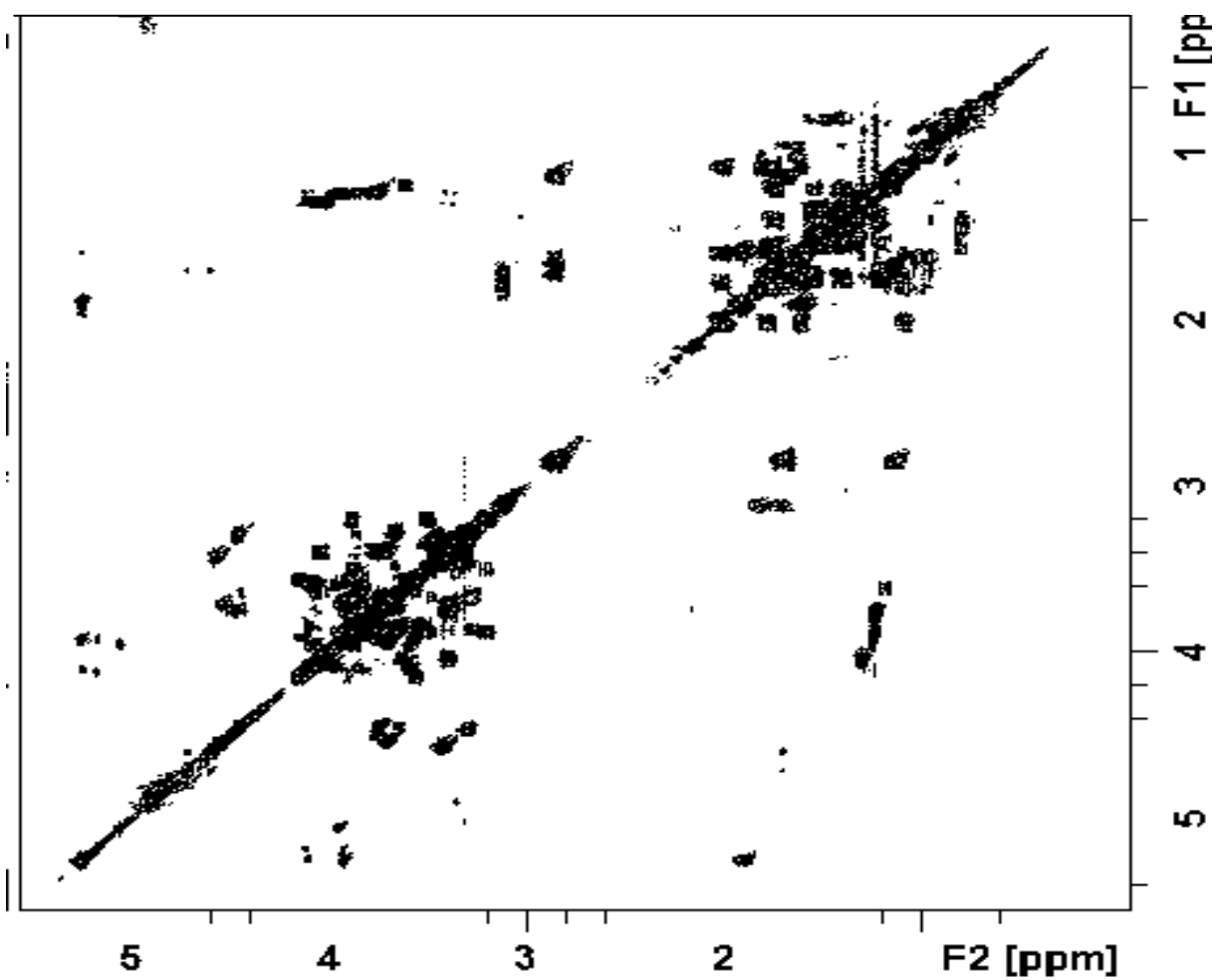


Figura 27 – Mapa de contornos COSY da substância SLS

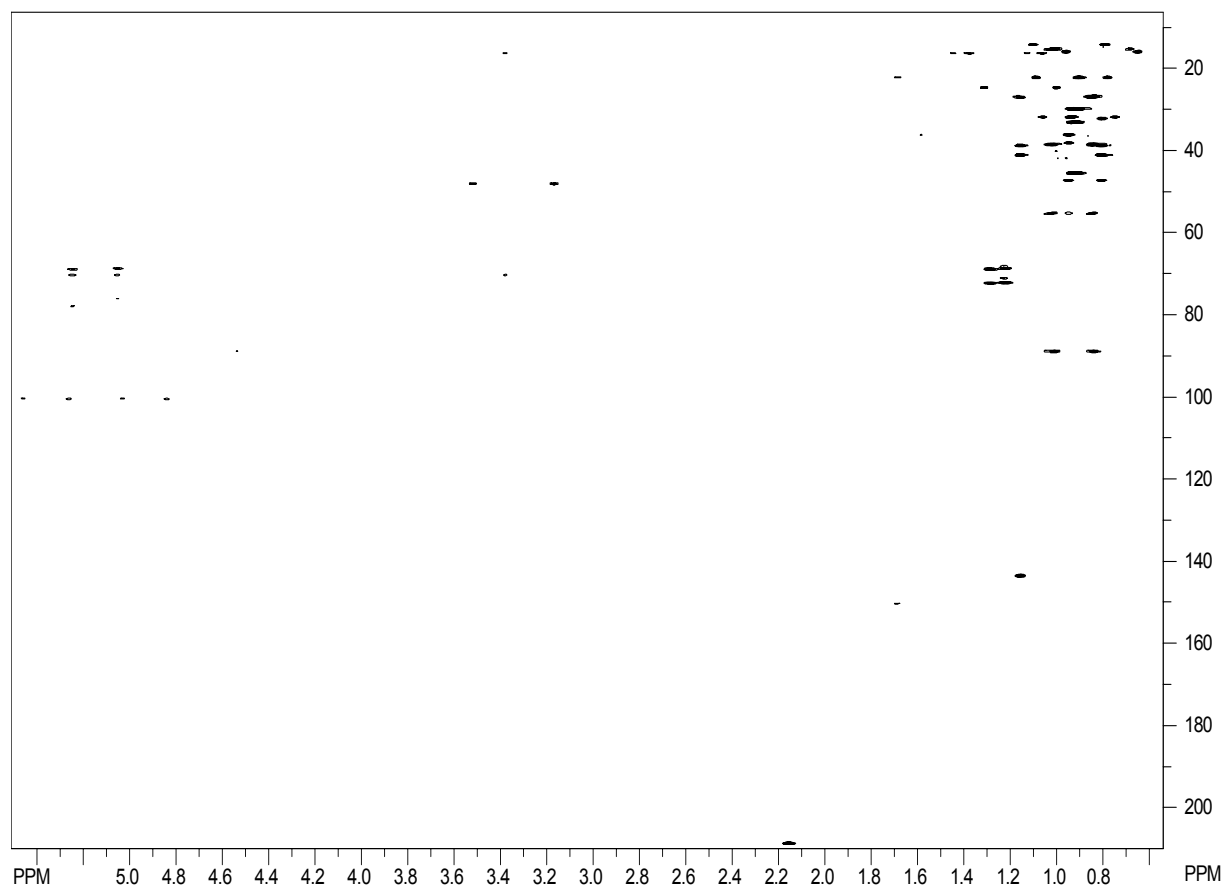


Figura 28 – Mapa de contornos HMBC da substância SLS

3.4.2 DISSACARÍDEO SLD

O espectro de RMN H^1 (Figura 32) da substância SLD obtido a, em CD_3OD mostra sinais numa região de desproteção, indo de δ 3.3 a δ 5.6. Entre estes sinais podemos destacar dois dupletos numa região de maior desproteção relativa que provavelmente trata-se de hidrogênios oximetínicos em δ 4,5 d, $J = 7,81\text{Hz}$ e em δ 5,1 d, $J = 3,65\text{ Hz}$.

A análise comparativa dos espectros de RMN de carbono e DEPT 135 (Figura 33 e 34), obtidos em CD_3OD , permitiu verificar um total de 12 sinais correspondentes aos 12 átomos de carbono para a substância SLD. Destes, um é tetrasubstituído e não hidrogenado (δ 101,74) oito são metínicos, e três são metilênicos (δ 61,29; 62,96 e 64,44) (Tabela 17, Figura 33 e 34).

As correlações obtidas nos espectros de RMN 2D, em especial HMBC (Figura 37) forneceram informações primordiais para a proposta aqui colocada. Além disso, algumas correlações de C-H mal resolvidas apresentadas no espectro HSQC, foi possível propor pela análise de correlações H-H vicinais (COSY) (Figura 36). Como exemplo, temos δ 4,05 vicinal a δ 3,53 e δ 3,79 vicinal a δ 3,47, onde os deslocamentos δ 3,53 e δ 3,47 não estavam bem definidos no espectro HSQC (Figura 35).

Tabela 18 – Dados de RMN da substância SLD.

Posição	H^1	J em Hz	C^{13}	HMBC
1	5,1d (1H) 4,5 d (1H)	3,65*; 7,81**	97,85 92,51	3,64; 3,47 3,70; 3,79
2	3,78		70,38	5,1; 3,70
3	3,64		75,28	-
4	3,56		81,91	3,64; 4,05; 3,70
5	3,79		69,81	-
6	3,47		61,29	-
1'	3,70		64,44	-
2'	-		101,74	-
3'	4,05		76,55	5,1
4'	3,53		76,02	4,05
5'	4,07		72,45	3,64; 370
6'	4,08		62,96	

*H-1 α ** H-1 β

Para chegar a proposta final também foi feita a comparação com dados relatados na literatura. Os valores de deslocamentos químicos do espectro de Carbono 13 foram comparados com os dados espectroscópicos da sacarose e O-β-D-frutofuranosil-(2-6)-D-glicose (SR) apresentados na tabela 18 e Figura 30.

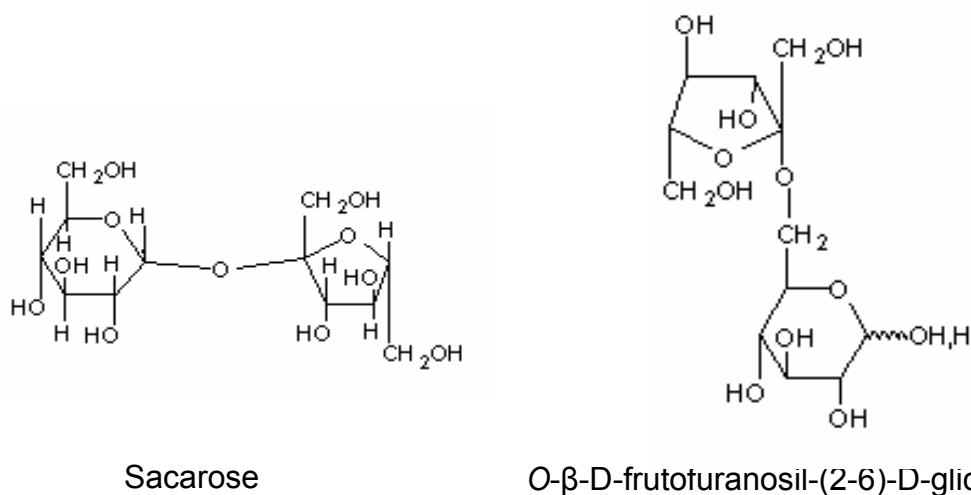


Figura 29 - Estrutura química da Sacarose e O-β-D-frutofuranosil-(2-6)-D-glicose

Os deslocamentos químicos do carbono anomérico (C1') são dados como sendo δ 97,85 e δ 92,51 para C1'β e C1'α, respectivamente, estando de acordo com sinais apresentados no espectro de RMN ¹H em δ 4,5 d com uma constante de acoplamento J= 7,81Hz sugerindo uma configuração *beta* e em δ 5,1 d com uma constante de acoplamento J= 3,65 Hz indicativa de uma configuração do tipo. O núcleo furanosídico é sugerido a partir da observação comparativa dos espectros de Carbono e DEPT 135 que demonstra que em δ 101,74, tem-se um sinal que pode ser atribuído ao carbono anomérico (C-2) não hidrogenado (frutose). No entanto este valor é significativamente diferente do que se observa para este átomo de carbono (C-2) na sacarose (Tabela 18), muito embora é similar ao que se observa para o O-β-D-frutofuranosil-(2-6)-D-glicose ocorrendo em δ 101,5 . Com base nestes resultados a substância SLD foi determinada como sendo O-β-D-frutofuranosil-(2 - 4)-D-glicose (Figura 31), a qual não apresenta nenhum relato sobre seu isolamento nos dados da literatura.

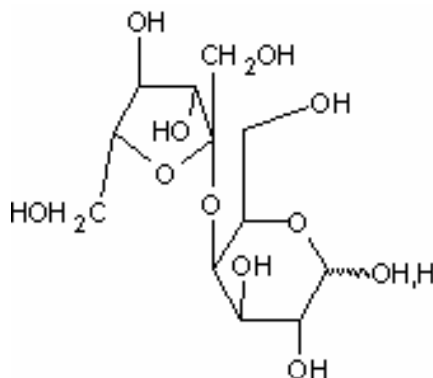


Figura 30- Substância isolada identificada como O-β-D-frutofuranosil-(2-4)-D-D-glicose.

Tabela 19- Dados de RMN C¹³ da sacarose e O-α-D-frutofuranosil-(2-6)-D-glicose em comparação a substancia SLD

Posição	Sacarose	SR*	SLD
1	92,9	96,2	97,85
		92,4	92,51
2	72,1	70,0	70,38
3	73,6	74,5	75,28
4	70,2	69,3	81,91
5	73,3	71,5	69,81
6	61,1	67,9	61,29
1'	63,3	63,7	64,44
2'	104,4	101,0	101,74
3'	77,4	76,1	76,55
4'	75,0	75,4	76,02
5'	82,2	81,0	72,45
6'	63,4	64,3	62,96

*O-α-D-frutofuranosyl-(2-6)-D-glicose

Fonte: THAVARAJA; LOW , 2006.

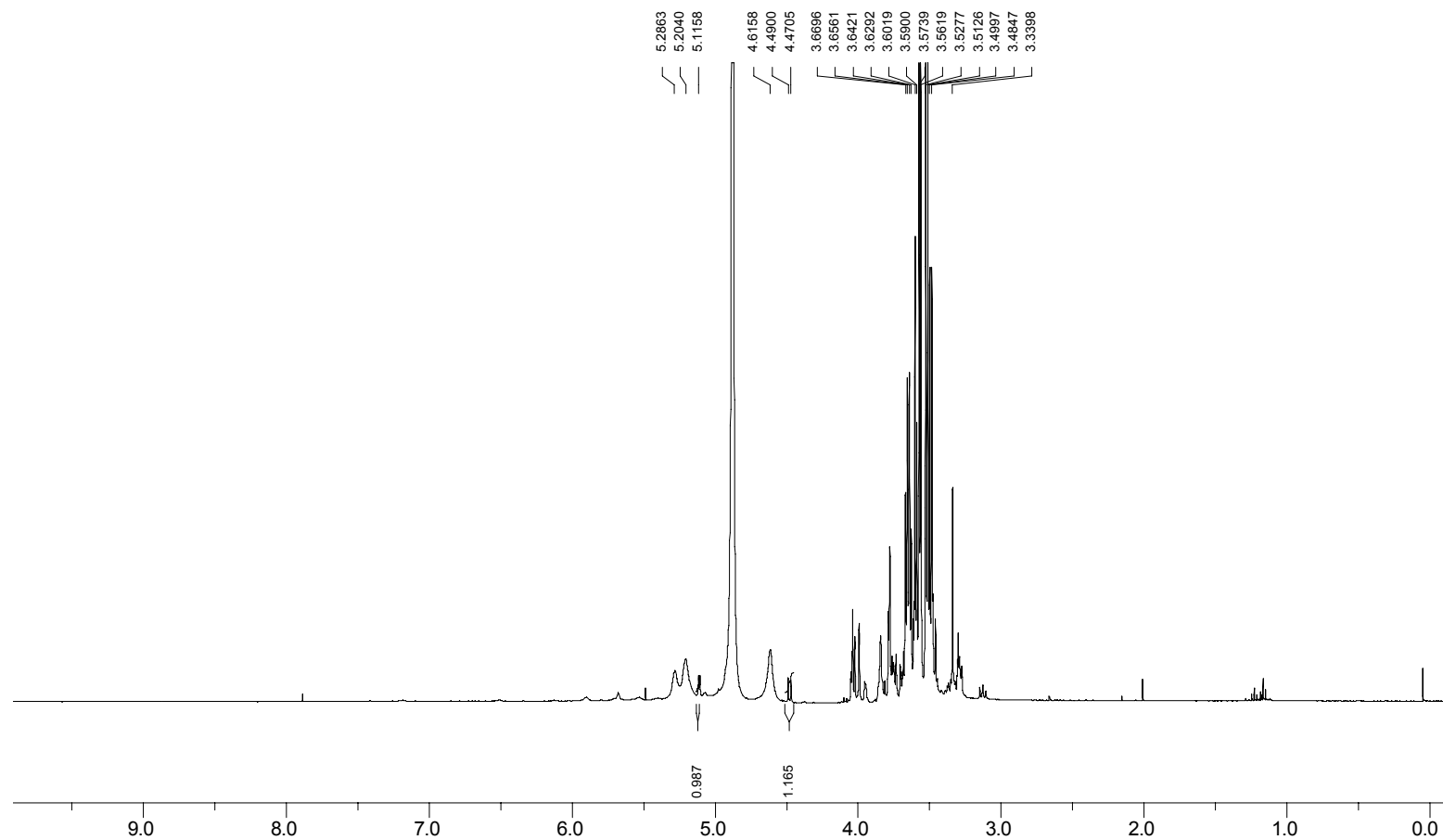


Figura 31 – Espectro de RMN de hidrogênio em CD₃OD a 100 MHz da substância SLD, padrão interno TMS

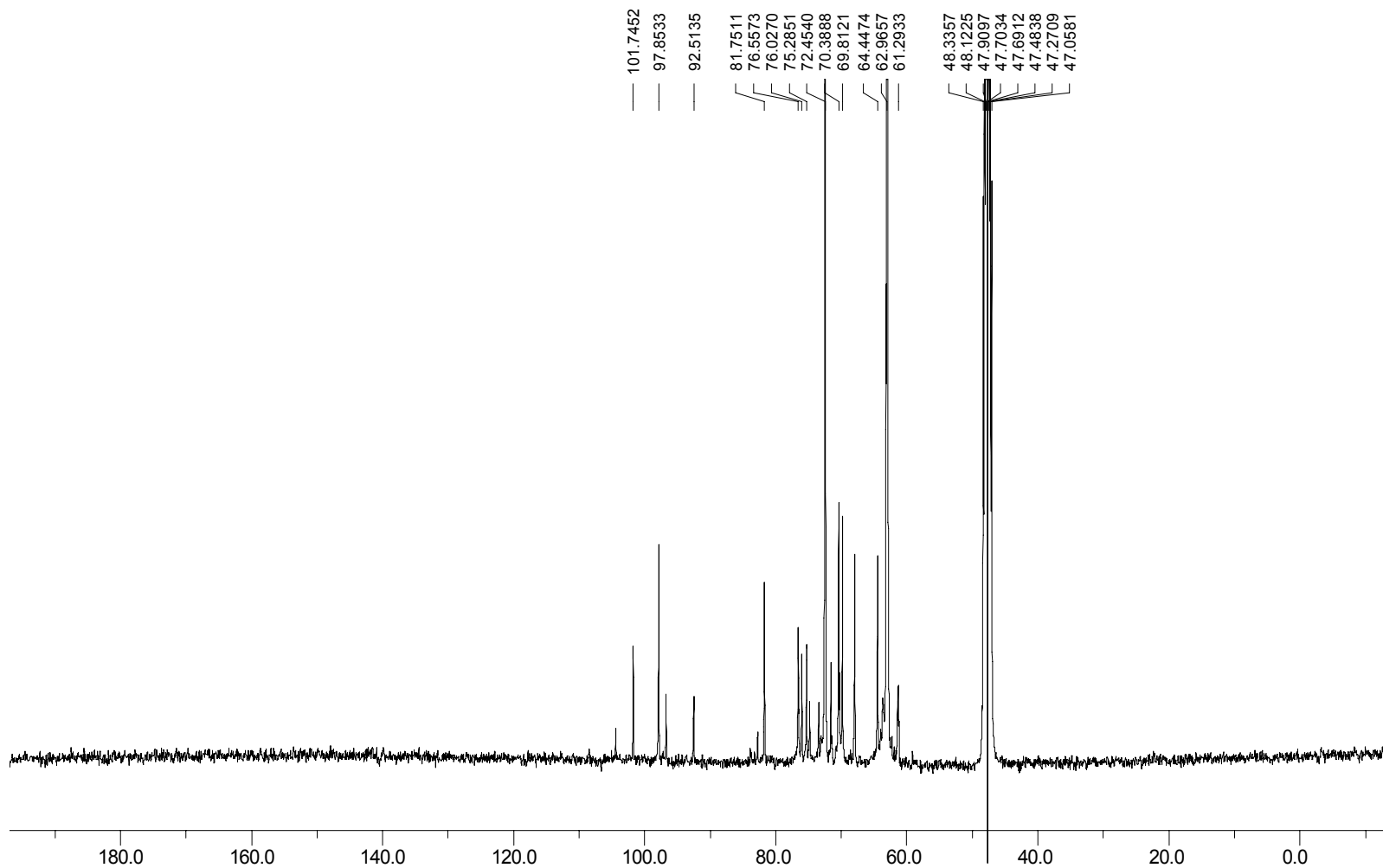


Figura 32 – Espectro de RMN de carbono em CD₃OD a 100 MHz da substância SLD, padrão interno TMS

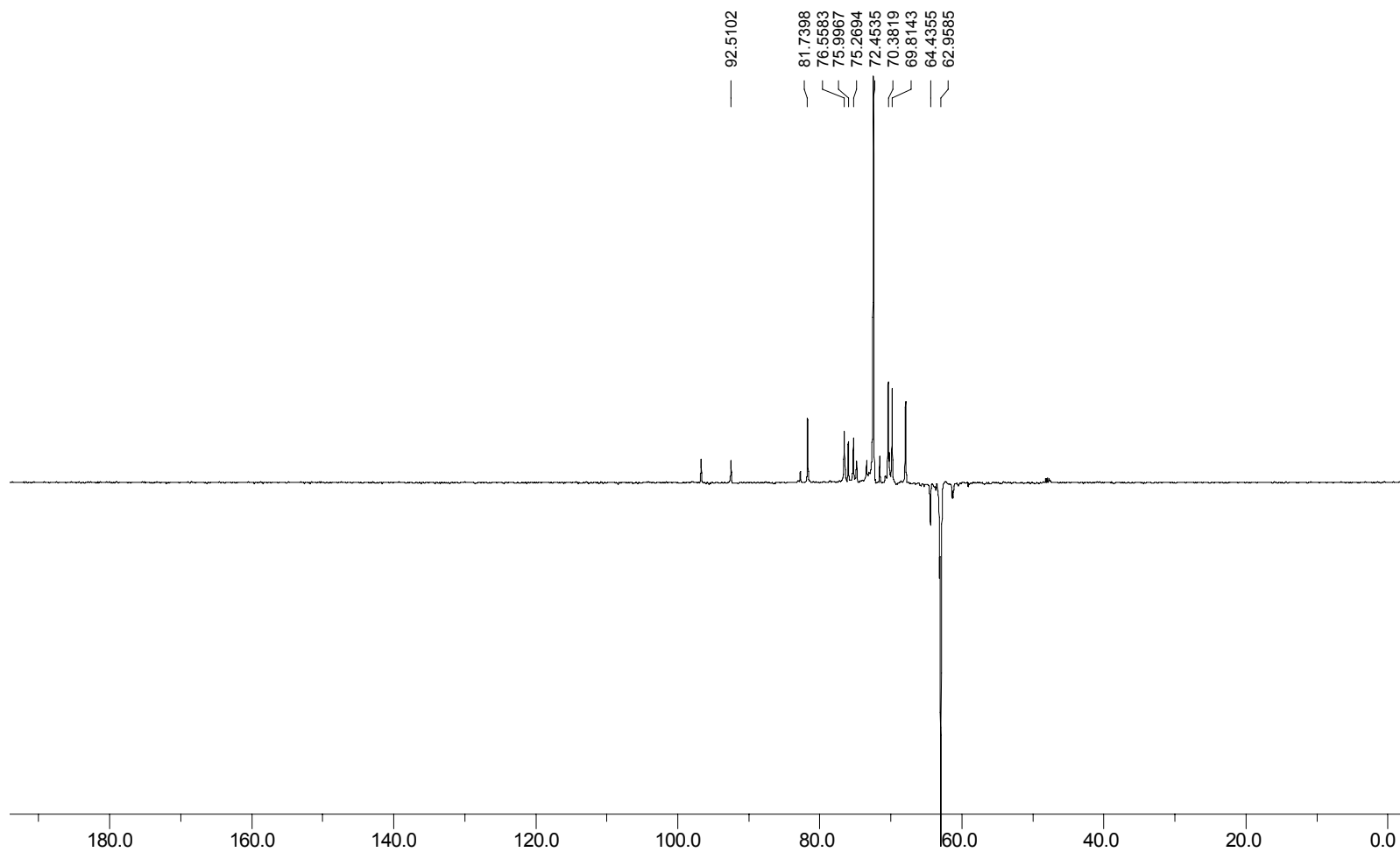


Figura 33 – Espectro de RMN DEPT 135 em CD₃OD a 100 MHz da substância SLD, padrão interno TMS

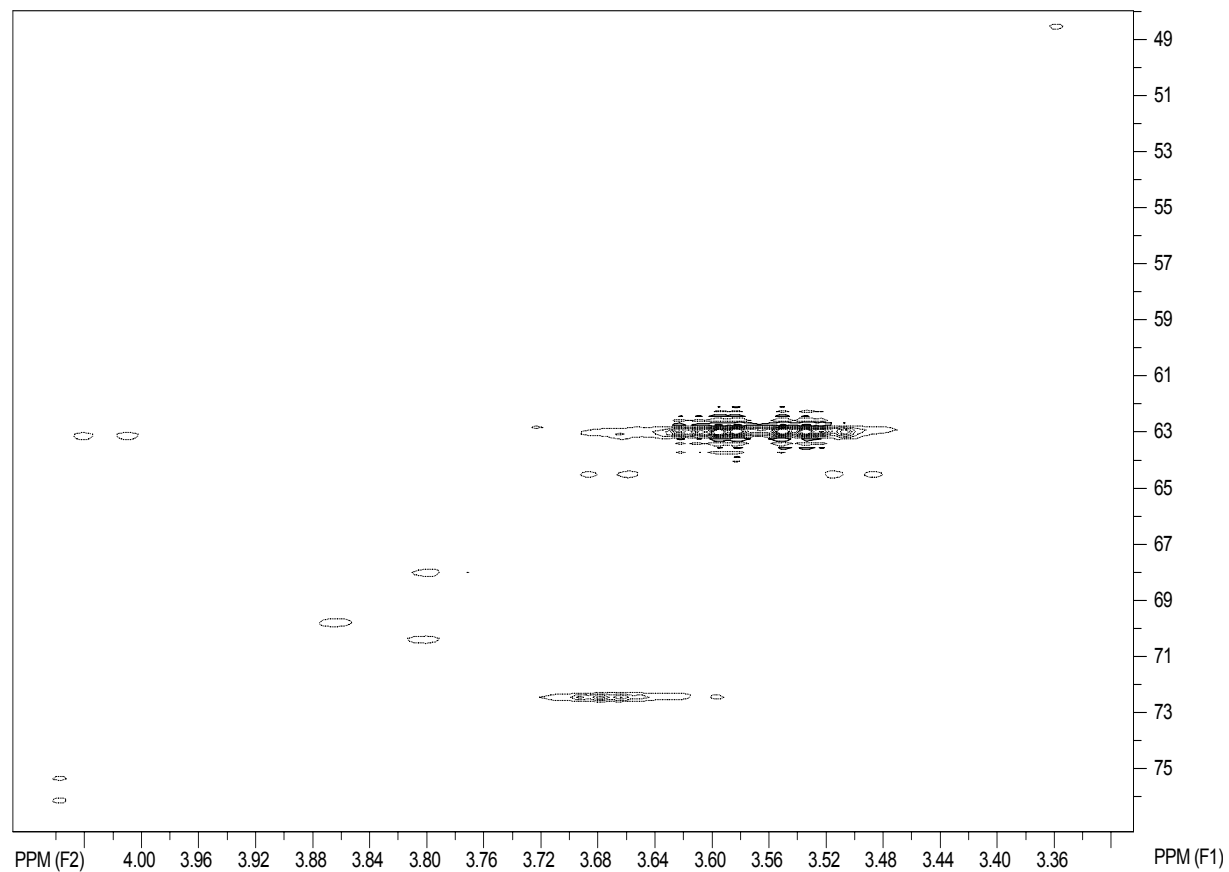


Figura 34 – Mapa de contornos HSQC da substância SLD.

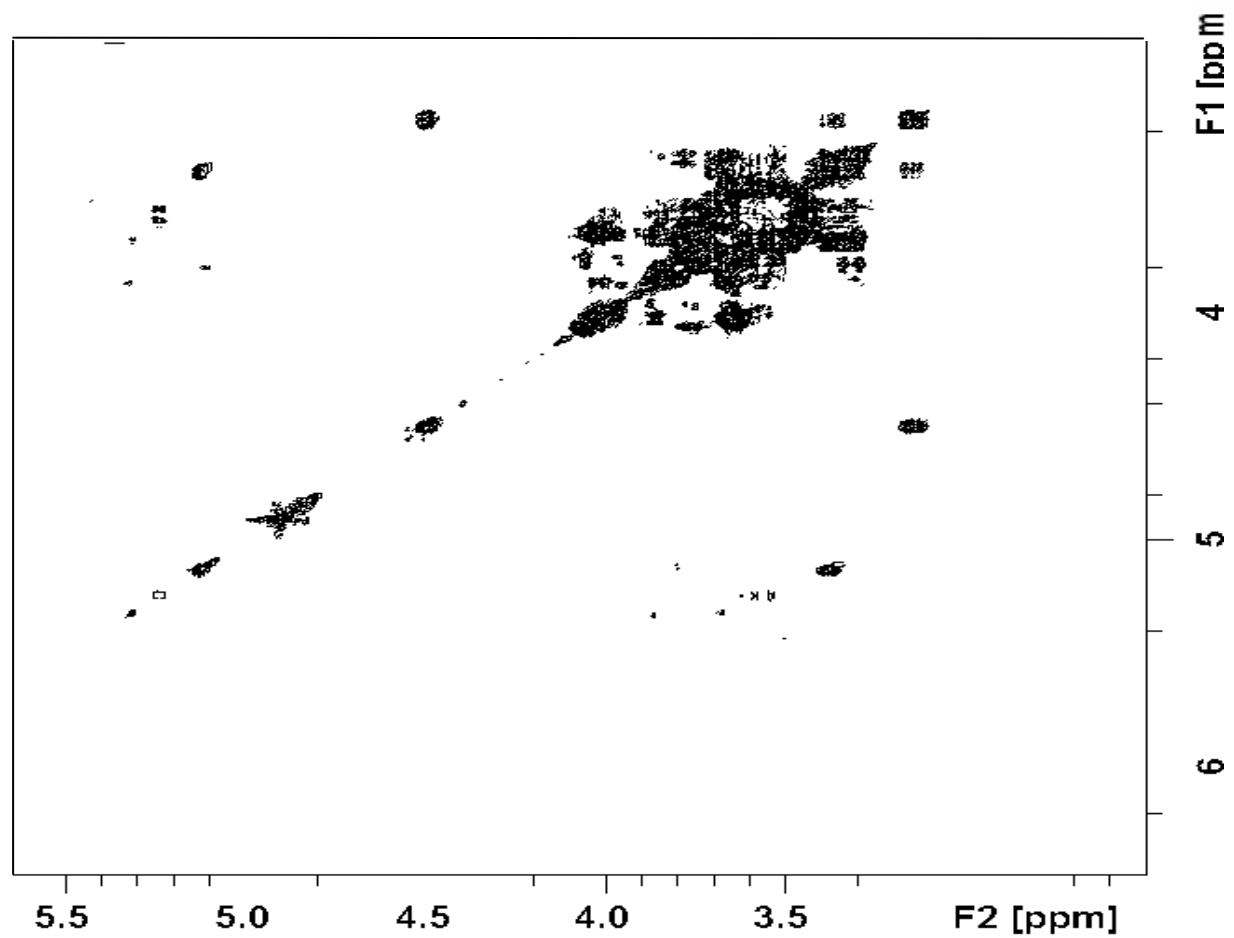


Figura 35 – Mapa de contornos COSY da substância SLD.

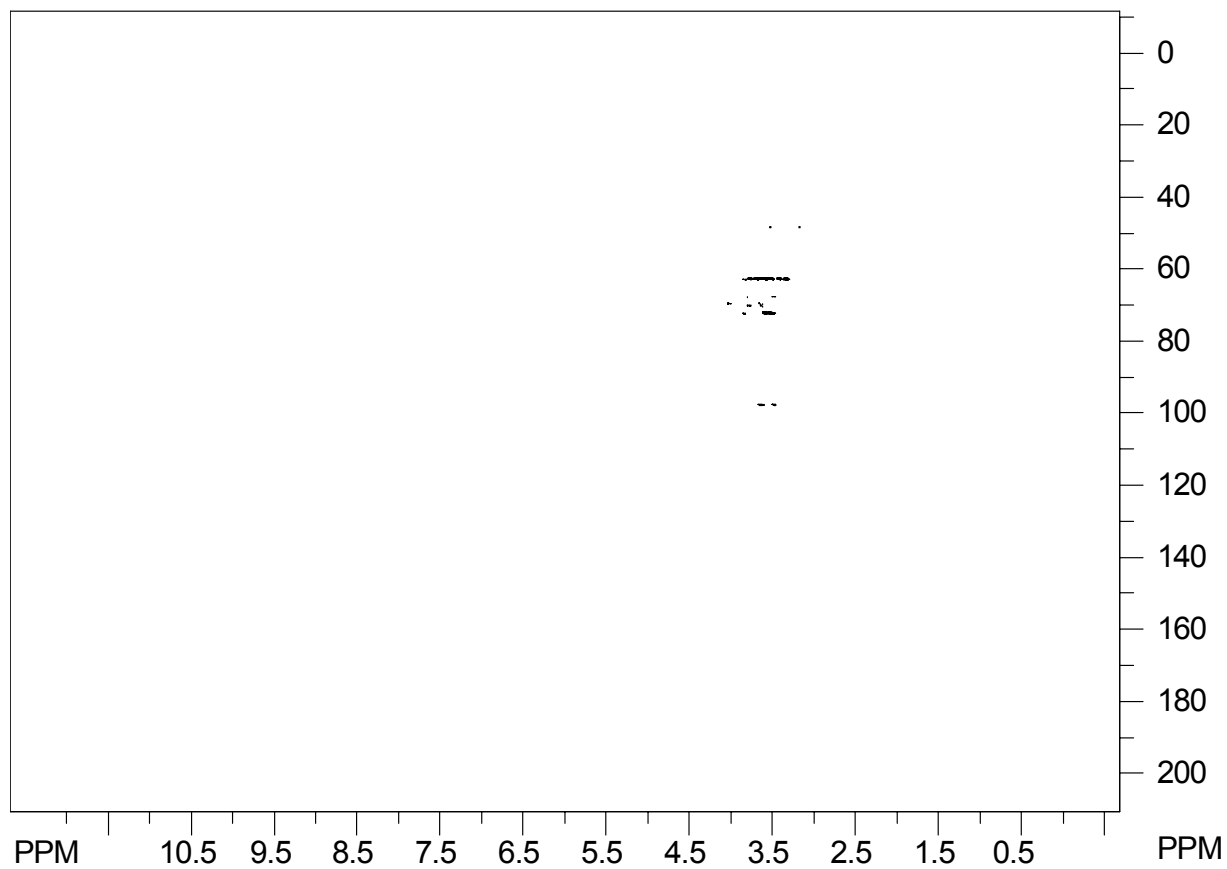


Figura 36 – Mapa de contornos HMBC da substância SLD.

CONCLUSÃO:

O extrato etanólico bruto da *S. lethalis* apresentou uma CL_{90} para atividade moluscicida frente ao caramujo *B. glabrata* de $65,01\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partição líquido-líquido forneceu a fração em butanol a qual contém o princípio ativo, apresentando uma $CL_{90}=10,62\mu\text{g mL}^{-1}$.

A extração em acetona levou a porção insolúvel em acetona, a qual demonstrou bom halo de inibição frente às cepas da *Pseudomonas aeruginosa* com valores 12mm, 09mm, 15mm, 09mm, 09mm, 09mm para as cepas **IC01**, **IC03**, **IC04**, **IC07**, **IC12**, **IC16** respectivamente.

O estudo fitoquímico do extrato do caule da *S. lethalis* conduziu ao isolamento de um triterpeno do tipo Tirucallano identificada como 3-O- [β - O-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) α - ramnopiranosil (1 \rightarrow 2) α - ramnopiranosil o qual apresentou atividade contra o *Schistosoma mansoni*. Esta substância até o presente momento é inédita na literatura.

O método de separação empregando diálise possibilitou o isolamento do dissacarídeo O- β -D-fructofuranosil-(2 \rightarrow 4)-D-glucose.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. Disponível em <http://www.sbg.org.br/PN-NET> em 05/12/07.
- AGAREZ, F.V; RIZZINI, C.M; PEREIRA, C. **Botânica Angiospermae Taxonomia, morfologia e reprodução**. 2ª ed. 1994. 208 p .
- AHMAD, I E BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharmacol.** 74, 113-123, 2001.
- AL-ZANBAGI, N. A.; BANAJA, A. A.; BARRET, J. Molluscicidal activity of some Saudi Arabian Euphorbiales against the snails *Biomphalaria pfeifferi*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 70, p. 119-125, 2000.
- ARCHIBALD, R.G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Trans. Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.**, v. XXVII, n. 2, p. 207-210, 1933.
- BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica II**. A Verdade Presente, São Paulo. 23 ed 1963a.
- BARBOSA, F. S. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro, **Fio-Cruz**, 1995.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; T URK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol**, v.45, p.493-496, 1966.
- BERG, G.B.; SMOLDERS, C.A. **Flux Decline in Membrane Processes. Filtration e Separation**, v. 25, n. 2, 1988.
- BIODIVERSIDADE DO MUSEU GOELDI. Disponível em: <http://www.museu-goeld.br/biodiversidade/not0005.asp> em 06/12/2007.
- [BOLZANI et al., 1999](#) V.S. BOLZANI, M.C. YOUNG, M. FURLAN, A.J. CAVALHEIRO, A.R. ARAUJO, D.H. SILVA AND M.N. LOPES, **Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest**, Anais da Academia Brasileira de Ciências 71. 1999, pp. 181–187.
- BOTTOLI, C.B.G; CHAUDHRY, Z.F; FONSECA, D.A; COLLINS, K.E; COLLINS, C.H. Poly (alkmethyldioxanes) thermally immobilize on silica as stationary phases for high-performace liquid chromatography. **Jornal of Chromatography**, v. 948, p.121-128, 2002.

- BOWMAN, W.; WEBER, W.F., Membranes Replacing Other Separation Technologies. **Chemical Engineering Progress**, v. 82, nº 11, p. 23-28, 1986.
- CORRÊA, M.B. Uso de Membranas de Ultra e Nanofiltração no Fracionamento do Extrato de Romã. **Boletim da Fapej**, 2005.
- CRUZ, G. L., **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, Editora Civilização Brasileira RJ, n. 2094, 1979.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. 2ed. School of Pharmaceutical Sciences. John Wiley & Sons Ltd, 2002. p 219, 221, 225 and 237.
- DOS SANTOS, A. F. & SANT'ANA, A. E. G. Moluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **Phytotherapy Research**. v. 13, p.660-664, 1999.
- EVARISTO, R.G.S; ALMEIDA, C.D.S; MAGALHÃES, J.C.C; FRANCO, P; SALOMÃO, D; RANDIG, O; CARNEIRO, R.M.D.G; GROSSIDE SÁ, M.F; ROCHA, T.L. Investigação de Biomoléculas Existentes no Extrato Aquoso de Sementes de Plantas Antagonistas com Efeito Nematicidasobre Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyneincognitaraça*, 2005. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP/PDFsLIMPP/Workshop/Thales8.pdf>.
- EMMONS, L.H; GENTRY, A.H. **The American Naturalist**, n. 4. v. 121, 1983, p. 513-524.
- FERREIRA, A.P., SOARES, G.L., SALGADO, C.A., GONÇAVES, L.S., TEIXEIRA, F.M., TEIXEIRA, H.C., KAPLAN, M.A. Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. **Phytomedicine** v.10, 154–158. 2003
- FILHO,V.C; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p.99-105, 1998.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve**. University press, Cambridge, 1974.
- FONSECA, A.P.N.D; SILVA, G.D.F; CARVALHO, J.J; SALAZAR, G.M; DUARTE, L.P; SILVA, R. P; JORGE, R.M; TAGLIATI, C.A; ZANI, C.L; ALVES, T.M.A; PERES, V; FILHO, S.A.V. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata*

- Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 842-847, 2007.
- FREIRE, M.G.M., GERNES, V.M., CORSINI, R.E., MACHADO, O.L.T., DE SIMONI, S.G., NOVELLO, S.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, 61–68. 2002.
- GENTRY, A.H. 1991. The distribution and evolution of climbing plants, p. 3-49. In: F.E. PUTZ & H.A. Mooney (eds.) **The biology of vines**, Cambridge, University Press.
- GIULIETTI A.M; QUEIROZ L.P, Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica, v . 4 p. 447, 2006.
- TONIN, G.A. São **Efeito da época de coleta, condições de armazenamento, substratos e sombreamentos na emergência de plântulas e produção de mudas de *Ocotea porosa* (Nesse et Martius ex.: Nees) (Lauraceae) e de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. São Carlos, 2005 Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo (USP)
- GORIN, A.J.P., TEIXEIRA, A.Z.A., TRAVASSOS, R.L., LABORIAN, S.L.M., LACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magnosia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research** v. 282, 325–333. 1996.
- GUTERRES, S.B. **Estudos dos extratos dos frutos de *Sapindus saponaria* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. São Carlos, 2005. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo (USP).
- HABERT, A.C; BORGES, C.P.; NOBREGA, R, **Processos de Separação com Membranas**. – Apostila, UFRJ, COPPE, Programa de Engenharia Química, Rio de Janeiro – RJ, 1997
- [HEGNAUER](#), R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen. , Birkhäuser Verlag, **Basel** (1973).
- HO, W.S.W; SIRKAR, K.K., **Membrane Handbook**. New York, USA, Van Nostrand Reinhold, 1992.

- HOLETZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DA, NAKAMURA CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz** 97:1027-1031. 2002.
- HUANG, H.C; TSAI, W.J; LIAW, C.C; WU, S.H; WU, Y.C; KUO, Y. Anti-platelet Aggregation Triterpene Saponins from the Galls of *Sapindus mukorossi* **Chem. Pharm. Bull.** v. 55, n.9, 1412—1415. 2007.
- HUMPHREY, J.L.; KELLER II, G.E, Separation Process Technology. **McGraw- Hill**, 1997 (ISBN 0-07-031173-0).
- ICIDCA INSTITUTO CUBANO DE PESQUISA DOS DERIVADOS DA CANA- DE - AÇÚCAR. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. 1º ed 1999. p.377- 390.
- JACOBS, B. L., and IMANI, F. Histone proteins inhibit activation of the interferon-induced protein kinase by binding to double-stranded RNA, **J. Interferon Res**, v. 8, 821–830. 1988.
- JOLY, A.B. **Botânica – introdução a taxonomia vegetal**. v 4, 8 ed. Companhia Editorial Nacional 1987. p. 428-430.
- KLOOS, H.; MCCULLOUGH, F.S. Plant molluscicides. **Plant. Med.**, v. 46, n. 4, p. 195, 1982.
- KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. Plant molluscicides: a review. **WHO schisto**. v. 51, p.59, 1981.
- KURZ, H. Differences in the binding of drugs to plasma proteins from newborn and adult man. **European Journal of Clinical Pharmacology** n. 6 v.11, 1977.
- LABOURIAL, M.L.S A semente de *Magonia pubescens* St. Hil. – Morfologia e germonação. **Anais da academia Brasileira de Ciências**. v. 45 , p. 501-537. 1973.
- LAVAUD, C; MARIE-LAURE, C; POUNY, I; LITUDON, M; SEVENET, T. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elatostaches apetala*. **Phytochemistry**. 57, n 3, p.469-478. 2001.
- LEMMA, A.; HEYNEMAN, D.; KLOOS, H. Studies on the molluscicidal and other properties of the Endod plant *Phytolacca dodecandra*. **Ethiopia**, p. 522, 1979.
- LEMMA, A. Laboratory and field evaluation of the molluscicidal properties of *Phytolacca dodecandra*. **Bull**, v. 42, p. 597-612, 1970.
- LEMMA, A. A preliminary report on the molluscicidal property of Endod (*Phytolacca dodecandra*). **Ethiop. Med**, v. 3, p.187-190, 1965.

- [LEYTON, M.](#); MARCO LEYTON, PH.D.1,2, DIKSIC, M; BENKELFAT, C [et al., 2005](#)
M. LEYTON, M. Diksic and C. Benkelfat, Brain regional α -[^{11}C]methyl-I-tryptophan trapping correlates with post-mortem serotonin tissue content and [^{11}C]5-hydroxytryptophan accumulation, **Int. J. Neuropsychopharmacol.**n.4 v.8 p. 633–634. 2005.
- LIEBERMAN, D., LIEBERMAN, M., PERALTA, R. & HARSTSHORN, G.S. Mortality patterns and stand turnover rates in a wet tropical forest in Costa Rica. **Journal of Ecology**, 73, 915-924. 1985.
- LIMA, R. S. Esquistossomose em Alagoas – Evolução e situação atual do programa de controle. **Gerência Técnica de Esquistossomose – Alagoas – 1999.**
- LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas, uma leve análise histórica in: **YUNES, R.A, CALIXTO J.B.** Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Editora Argro 1º ed. 2001 p 481-502.
- LIMA, M.R.F; LUNA, J.S; SANTOS, A.F; ANDRADE, M.C.C; SANT'ANA, A.E.G; GENET, J.P ; MARQUEZ , B; NEUVILLE, L; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.137–147, 2006.
- GIULIETTI A.M; QUEIROZ L.P, **Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica.** v.4 2006. p.447.
- LIU, H. W.; NAKANISHI, K. The structure of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*. **Tetraedron**, v. 38, p. 513-519, 1982.
- CARLSON, L.H.C. **Otimização de um sistema de separação da mistura CO₂ supercrítico/limoneno com membranas de osmose inversa.** Santa Catarina, 2006 Tese (Doutorado) - Pós- Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2006.
- LUNA, J.S; SANTOS, A.F; LIMA, M.R.F; OMENA, M.C; MENDONÇA, F.A.C; BIEBER, L.W; Sant'Ana, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** [v. 97](#), n. 2 p. 199-206. 2005.
- MAHATO, S.B., SARKAR, S.K. and PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry** v. 27, p. 3037–3067. 1988.

- MAHMOUD, K., ZHIOUA, F., KEFI-ATTAUOI, L., BEN ARIBIA, M., MEHERZI, F. NEMSIA, J., GHALLEB, M. and ELOUAKIB, M. Controlled ovarian stimulation (COS) in assisted reproductive technologies: rFSH alone or rFSH and hMG combined? *Hum. Reprod.*, 16 (Abstract book), 92. 2001.
- MARTINS, E.R. Plantas Medicinais. **Edição Imprensa Universitária - UFV.** Viçosa. Minas Gerais. 1995. 220p.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry.** v. 24, p.639-652, 1985.
- MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. **Fortaleza. Edições UFC,** 1997.
- MELO, V.P. **Propriedades químicas e disponibilidade de metais pesados para a cultura do milho em dois latossolos que receberam a adição de biossólido.** 2002. 134p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S.Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química nova,** n. 1 v. 24, 105-111, 2001.
- MORELLATO, L. P. C. 1991. **Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- MURGU M. **Saponinas e glicosídeos de Sapindus saponaria: metodologias de análise por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos.** São Carlos, 2002 Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Paulo.
- NAPOLITANO, N.R ; MINEO, J.R;. DE SOUZA, M.A; DE PAULA, J.E; ESPINDOLA, L.S; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology** p. 594, 172. 2003.
- NASCIMENTO G.G.F; LOCATELLI, J; FREITAS P.C; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extrats and phytochemicals onantibiotic resisten bacteria. **J. Microbiologia** v.34, pp 247-256. 2000.
- NETO, M.S.P.; GONÇALVES, J.L. de M.; TAKAKI, M. ; CENCI, S.; GONÇALVES, J.C. Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que ocorrem na mata atlântica em função do nível de luminosidade. **Revista Árvore, Viçosa,** v.24, n.1, p.35-45, 2000.

- NETO, G.G; SANTANA, S.R. A FAMÍLIA SAPINDACEAE PARA A FLORA DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL. Os desafios do novo milênio. **III Simpósio sobre recursos naturais e sócioeconômicos do Pantanal** p.35 24-30 de novembro 2000 Corumbá –MS.
- NEVES, D. P. (2000). **Parasitologia Humana**. São Paulo, Atheneu, 2000.
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P. & ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmintos praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova**. v. 22, p.5-10, 1999.
- NI W; HUAY; LIU H.Y, TENG R.W; KONG Y.C; HU X.Y; CHEN C.X. Tirucallane-Type Triterpenoid Saponins from the Roots of *Sapindus mukorossi* **Chem. Pharm. Bull.** n.10 v.541443—1446 (2006).
- NOGUEIRA, C.Z; RUAS, M.R; RUAS, C.F; FERRUCI, M.S. Karyotypic study of some species of *Serjania* and *Urvillea* (Sapindaceae; Tribe Paullinieae) **American Journal of Botany** n.5 v. 82 646-654. 1995.
- O.M.S . Cause-of-death statistics and vital rates, civil registration Systems and alternative sources of information. **World Health Statistics Annual** 1993. Section A/B-3: China: 11-17. 1994.
- ORTEGA, A., GARCIA, E.P., CAIDENAS, J., MANCERA, C., MARQUINA, S., GORDUNO, C.I.M., MALDONADO, E. Methylodonates, a new type of diterpene with modified derodane skeleton from *Dodenaea viscosa*. **Tetrahedron** v.57, p.2981–2989. 2001.
- RODRIGUEZ, P.A. Novelties in *Serjania* (sapindaceae), **Brittonia**, n.3 v.40, p. 283-289. 1988.
- PINTO, A.C; SILVA, D.H.S; BOLZANI, V. S; LOPES, N. P; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p.45-61, 2002.
- POPPER, Z.A; SADLER, I.H; FRY, S.C. α -D-Glucuronosyl-(1→3)-L-galactose, an unusual disaccharide from polysaccharides of the hornwort *Anthoceros caucasicus*. **Phytochemistry** v.64 325–335. 2003.
- POPPER, Z.A; SADLER, I.H; FRY, S.C. 3-O-Methyl-d-galactose residues in lycophyte primary cell walls. **Phytochemistry** v.57 711–719. 2001.
- PUTZ, F.E. The natural history of lianas on Barro Colorado Island, **Panama. Ecology** n.6 v.65: 1713-1724. 1984.

- PUTZ, F.E. & CHAI, P. Ecological studies of lianas in Lambir National Park, Sarawak, Malaysia. **Journal of Ecology** v.75: 523-531. 1987
- PUTZ, F.E. & MOONEY, H.A. 1991. **The biology of vines**. Cambridge, Cambridge University Press.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. n. 1 v. 24, , p. 68- 76, 2001.
- RADLKOFER L. Ueber Sapindus und damit in Zusammenhang stehende Pflanzen. **Sitzungsberichte der Mathematisch-Physikalischen Classe der k. b. Akademie der Wissenschaften zu München**. v.8 p.221–408. 1878.
- RESERVA ECOLÓGICA DO IBGE. Estudos e Pesquisas e Informação Geográfica. **Ambiente e plantas vasculares**. n 3, Rio de Janeiro 2000.
- RICHARDS, P. W. 1952. **The tropical rain forest**. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- [RIMBACH](#) G; RIMBACH, Y.C; PARK, Q. GUO, H. MOINI, N. QURESHI, C. SALIOU, K. TAKAYAMA, R. VIRGILI and L. PACKER, Nitric oxide synthesis and TNF-alpha secretion in RAW 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation, **Life Science** 67 p. 679–694. 2000.
- ROCHA, M.A. **Fitoterapia**. Disponível em URL: <http://www.geocities.com/Athens/Parthenon/5140/Substveg.htm> em 10/12/1998.
- RODRIGUES, R.R. Métodos fitossociológicos mais usados. **Casa da Agricultura**. v.10 p20-24. 1988.
- RYU, J.H., AHN, H., JIN Lee, H. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. **Fitoterapia** v.74 p.350–354. 2003.
- SANTOS, A.F. **Determinação da atividade anti-esquistossomótica de extratos e substâncias puras obtidas de plantas**. Alagoas, 2005 Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- SANTOS, J.A.A; TOMASSINI, T.C.B; XAVIER, D.C.D; RIBEIRO, I.M.; SILVA, M.T.G. FILHO, Z. B.M. Molluscicidal Activity of *Physalis angulata* L. Extracts and Fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under Laboratory Conditions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.3, p.425-428, 2003.

- SCHUHMACHER, J.; BUHNER, K.; WITT-LAIDO, A. Determination of the free fraction and relative free fraction of drugs strongly bound to plasma proteins. **J Pharm Sci.** v. 89, n. 8 p. 1008-1021, 2000.
 - SILVA, F. F. S; DA CUNHA, L.C; REZENDE, K. R. Métodos de avaliação da fração de fármaco ligado (% b) a proteínas de fluidos biológicos. **Revista eletrônica de farmácia** v. 3, n. 2 p.99-108. 2006.
 - [SPARG et al., 2004](#) SPARG, S.G., JÄNGER, A.K., MAGWA, M.L., VAN S, J., 2004. Cultivating the medicinal plant *Merwillia natalensis* as a crop: a small-scale farming approach. **Outlook on Agriculture** (in press).
 - SPTIZER, V. **Fatty acid composition of some seed-oils of the Sapindaceae.** **Phytochemistry** v. 42, p.1357–1360. 1996.
 - SUYENAGA ES, RECHE E, FARIAS FM, SCHAPOVAL EE, CHAVES CG, HENRIQUES AT. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research** v.16, 519–523. 2002.
 - TAVAREZ, W. **Manual de antibióticos.** 3ed. São Paulo: Atheneu, 1984, p.374.
 - THAVARAJAH P; LOW N.H. Isolation and Identification of Select Oligosaccharides from Commercially Produced Total Invert Sugar with a Proposed Mechanism for Their Formation. **J. Agric. Food Chem.** 2006, v. 54, 2754-2760.
 - TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; **Química Nova** v.25, p. 616, 2002.
 - TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
 - TRUITI, M.C.T; FERREIRA, I.C.P; ZAMUNER, M.L.M; NAKAMURA, C.V. SARRAGIOTTO M.H e SOUZA, M.C. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** December 2005, v.38, n.12, 1873-1878.
 - TSAI, T-H. Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques. **J Chrom B.** v. 797, p. 161-173, 2003.
- URL:http://www.sementesdocerrado.bio.br/Especies/Sapindaceae/Serjania/lethalis_5219/lethalis_5219.html em 05/12/07) -
- VOUTQUENNE, L., KOUKOUGAN, C., LAVAND, C., POUNY, I., LITAUDON, M. Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austrocaledonica*. **Phytochemistry** v.59, 825–832. 2002.

- WAGNER, V.A. The possibility of eradicating billarzia by extensive planting of the tree Balanites. **South Afr. Med. J.** v. 10, p. 10-11, 1936.
- WALTER, H. **Ecology of tropical and subtropical vegetation; versão para o inglês de Dieter Mueller-Dombois.** Edinburgh, Oliver & Boyd, 1971 539 p.
- WOODSON, R.E; SCHERY. Flora of Panamá. **Missouri Bot. Gard.** v.63: 419-540, 1976.
- YUNES, R; FILHO, V. Breve **análise histórica da química de plantas medicinais** in: YUNES, R.A, CALIXTO J.B. Plantas medicinais. Cap. 1 Editora Argo, Santa Catarina . 2001 p20-26.