

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

EXTRATOS PADRONIZADOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS:
Serjania marginata Casar. (SAPINDACEAE)

SILVIA CRISTINA HEREDIA VIEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara-SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

EXTRATOS PADRONIZADOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS:
Serjania marginata Casar. (SAPINDACEAE)

SILVIA CRISTINA HEREDIA VIEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara-SP
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

V657e Vieira, Silvia Cristina Heredia
Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Serjania marginata* Casar
(Sapindaceae) / Silvia Cristina Heredia Vieira. – Araraquara, 2014
141 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade
de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Wagner Vilegas

1. *Serjania marginata*. 2. Sapindaceae. 3. Cipó-uva. 4. Potencial gastroprotetor. 5.
Atividade antiradicalar. I. Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados pessoais

Nome: Silvia Cristina Heredia Vieira
Filiação: Néstor Antonio Heredia Zárate e Maria do Carmo Vieira
Naturalidade: Dourados-MS
E mail: silviacristina_85@hotmail.com

2. Formação acadêmica

Graduação

Instituição: Universidade para o desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande-MS
Curso: Ciências Farmacêuticas
Período: 2004-2007
Título da Monografia: Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS
Bolsista de Iniciação Científica na UNIDERP, sob orientação da Prof. Dra. Rosemary Matias, com o trabalho “Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de *Richardia brasiliensis* Gomes”. Período: fevereiro de 2006 a janeiro de 2007.

Mestrado

Instituição: Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR
Curso: Ciências Farmacêuticas
Título da Dissertação: Atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico de Piperaceae
Orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez
Bolsista: CAPES. Período: agosto de 2008 a fevereiro de 2010.

3. Publicações

HEREDIA VIEIRA, S.C.; Paulo, L.F de; ESTIVALETI, T.I.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, A.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D.A.G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

HEREDIA VIEIRA, S.C.; SOLON, S; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, p. 28-34, 2010.

4. Capítulos de livros publicados

VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H.; CARDOSO, C.A. de L.; SANGALLI, A.; HEREDIA VIEIRA, S.C.; TABALDI, L.A. Preservação e produção *ex situ* em Mato Grosso do Sul das espécies nativas: *Campomanesia*, *Jacaranda decurrens* ssp. *symmetrifoliolata* e *Schinus terebinthifolius* Raddi. In: Lin Chau Ming; Christina de Mello Amorozo; Carolina Weber Kffuri. (Org.). Agrobiodiversidade no Brasil:

experiências e caminhos da pesquisa. 2ed. NUPEEA: Recife-PE, 2012, v. 6, p. 293-323.

5. Participações em eventos científicos

Participação em 57 eventos nacionais, com a apresentação de 20 resumos, todos em forma de pôster.

6. Organização de eventos

HEREDIA VIEIRA, S.C. 14º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. 2011.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 13º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul e 3º Empório da Agricultura Familiar. 2010.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 12º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul e 2º Empório da Agricultura Familiar. 2009.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 11º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul e 1º Empório da Agricultura Familiar. 2008.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 9º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. 2006.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 6º Jornada Acadêmica e 2º Encontro de Produção Científica do Curso de Farmácia. 2006.

HEREDIA VIEIRA, S.C. 8º Workshop de Plantas Medicinais do Mato Grosso do Sul. 2005.

7. Assessoria e consultoria

HEREDIA VIEIRA, S.C. Consultor *ad hoc* externo de trabalhos científicos apresentados no 14º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. 2011.

HEREDIA VIEIRA, S.C. Consultor *ad hoc* externo de trabalhos científicos apresentados no 13º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. 2010.

HEREDIA VIEIRA, S.C. Consultor *ad hoc* externo de trabalhos científicos apresentados no ENEPE-UFGD - 1º Encontro de Ensino de Graduação - 3º Encontro de Pós-graduação - 4º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Extensão da UFGD. 2010.

“La suerte favorece al cerebro mejor entrenado” (Louis Pasteur)

"Andei tanto e não conheci quase nada
estudei tanto e não sei do mundo nem decimais
por isso, a vontade de conhecer aumentou
para ajudar à família e, se possível, à nação"

(HEREDIA ZÁRATE & HEREDIA VIEIRA. Poesias e rimas em portunhol. 2004.)

À você vovó, que foi minha segunda mãe, que vibrou, que chorou e que sorriu comigo, à você dedico mais esta vitória. “É só fechar os olhos por alguns segundos que sinto a sua presença, é como voltar no tempo, quando as suas mãos, com nem tanta delicadeza, me faziam pegar no sono. Choro, sorrio, me desespero, me tranquilizo. Os sentimentos permanecerão embaralhados, mas o amor, as lembranças, as lições e tudo aquilo que vivi com você, ficarão claramente estampados em minha alma e com o mais bonito sentimento que existe em mim.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me levado aonde eu jamais imaginei chegar, por ter feito dos meus sonhos muito maiores do que almejei e por ter me transformado em uma mulher, guerreira, confiante e com muito mais fé;

Em um certo dia papai me disse: “Você pode fazer parte da minoria, mas isso não significa que não valha a pena lutar. Vá, que eu estarei seguindo os seus passos”. Papais disseram que não seria fácil, mas disseram também que não seria impossível. Portanto, a vocês, meus mestres, meu muito obrigada, por me ensinarem o respeito, a igualdade, a perseverança e a fé. Por me ensinarem a não desistir, a persistir e a lutar de cabeça erguida, com confiança e com muita dedicação;

Aos meus irmãos, Néstor Daniel e Danilo Augusto (Blood Brothers), pelo imenso amor, amor inexplicável, incondicional, o meu amor mais bonito entrego a vocês e unidos seguiremos por toda a eternidade;

Ao meu namorado, Rafael Eduardo Ferreira, por ter sido meu companheiro, meu alicerce, por ter seguido ao meu lado em busca deste lindo sonho, por ter me acalmado em meus momentos de pranto e por ter confiado e me dado força para concluir mais esta etapa;

Ao meu orientador, prof. Dr. Wagner Vilegas, por ter confiado em meu trabalho e no trabalho dos meus pais, por deixar-me “voar”, buscando a melhor forma de resolver a proposta do meu projeto. Agradeço pelos elogios, ensinamentos e conselhos, os quais foram essenciais para que eu pudesse enfrentar a distância e terminar, com dedicação e honestidade, esta batalha;

À profa Dra Ana Simonet, minha mãezinha sanduíche, que se preocupou não só com o meu trabalho, mas com minha saúde, com meus sentimentos, comigo. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, por ter transmitido essa imensa paixão pela profissão e por ter formado mais uma “loca enamorada” pelas saponinas;

Ao prof. Dr. Francisco Antonio Macías e a todos os amigos do grupo de Alelopatia da Espanha, pela amizade, pelos ensinamentos, pela preocupação e por todos os maravilhosos momentos que passei neste grupo de pesquisa - “Gente pequenita haciendo cosas pequenitas pueden cambiar el mundo”;

À profa Dra Cláudia Andrea Lima Cardoso, por ter me aceitado em seu laboratório de pesquisa da UEMS desde a minha graduação, sendo muito mais do que uma supervisora, sendo amiga, me ensinando, sugerindo, esclarecendo e me aconselhando; obrigada pela colaboração e amizade;

À profa Dra Clélia Akiko Hiruma-Lima e à sua aluna Larissa Lucena Périco, do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), pelos ensaios de toxicidade aguda e atividade gastroprotetora realizados;

À profa Dra Eliana Aparecida Varanda e à sua aluna Flávia Aparecida Resende, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, pelos ensaios de mutagenicidade realizados;

Aos meus amigos Rafha, Mary, Luiz, Nanda, Camila e Joanna, por serem meu “porto seguro”, por se fazerem presentes em minha vida, mesmo estando tão longe. Obrigada pelas risadas! Com vocês a minha vida fica bem mais divertida;

À amiga Cláudia Rocha, por ter me acolhido desde o início do doutorado, sem nem ao menos me conhecer, por ter me guiado, me ensinado e esclarecido todas as minhas dúvidas com muita paciência e humildade, sendo uma grande profissional e amiga;

Aos amigos do laboratório de fitoquímica da UNESP de Araraquara-SP, por terem me recebido tão bem no grupo, pela paciência e pela linda amizade construída;

À CAPES, pela bolsa concedida para realização do doutorado sanduíche (Processo: PDSE-17995/12-4);

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida e pelos auxílios financeiros (Processo: BIOTA/FAPESP - 2009/52237-9);

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela ajuda e orientações prestadas;

À UFGD, pelo material vegetal concedido;

Às pedras e tropeços em minha caminhada, por terem me ensinado a ser mais forte e perseverante para vencê-los e subir degrau por degrau;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Plantas nativas (A) e cultivadas (B) de <i>S. marginata</i> . Detalhe de inflorescências (C) e frutos (D).	7
Figura 2	Flavonoides isolados das raízes e/ou folhas da <i>S. erecta</i> . Canferol (1), canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo (2), epicatequina (3), isovitexina (4), vitexina (5), canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (6) e canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (7).	9
Figura 3	Sapogeninas isoladas das partes aéreas da <i>S. triquetra</i> . 11 α -hidroperoxi-hederagenina (A), estigmasterol (B), ácido oleanólico (C), ácido morólico (D) e hederagenina (E).	10
Figura 4	Saponinas isoladas dos caules de <i>S. salzmanniana</i> .	11
Figura 5	Triagem cromatográfica por CCDC do extrato EtOH 70% com Anisaldeído/H ₂ SO ₄ (A), NPPEG (B), Cloreto Férrico (C) e Dragendorff (D) (Ext = Extrato EtOH 70%, Rut = Rutina e Quer = Quercetina; Silica gel, Fase móvel: BAW 65:25:15).	29
Figura 6	Testes para determinação de flavonoides (A), saponinas (B), taninos (C), esteróides/triterpenos (D) e alcalóides (E).	29
Figura 7	Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% das folhas de <i>S. marginata</i> nativa do Cerrado (254 nm).	30
Figura 8	Espectros no UV para os flavonoides destacados no cromatograma da figura 4 (A – Picos 6, 7 e 11, B – Picos 4, 5, 8, 9 e 10).	31
Figura 9	Espectros no UV para os compostos fenólicos destacados no cromatograma da figura 4 (Picos 1, 2 e 3).	31
Figura 10	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> nativa, modo positivo.	32
Figura 11	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 1051, modo positivo, energia de colisão de 30%.	32
Figura 12	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 621, modo positivo, energia de colisão de 25%.	33
Figura 13	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 593, modo positivo, energia de colisão de 30%.	33
Figura 14	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 579, modo positivo, energia de colisão de 20%.	33
Figura 15	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 316, modo positivo, energia de colisão de 30%.	34
Figura 16	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 289, modo positivo, energia de colisão de 30%.	35
Figura 17	CCDC das frações obtidas no primeiro fracionamento do extrato EtOH 70% de <i>S. Marginata</i> .	37
Figura 18	Perfil cromatográfico da fração n-butanólica (254 nm, 1-12 = Picos monitorados).	38
Figura 19	Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> nativa do Cerrado (254 nm, 1-5 = picos monitorados).	39
Figura 20	Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B), destacados no cromatograma da figura 19 (A – Picos 1 e 2, B – Picos 3, 4 e 5).	39

Figura 21	Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B), destacados no cromatograma da figura 23 (A – Pico 1; B – Pico 2).	39
Figura 22	Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B e C), destacados no cromatograma da figura 18 (A – Picos 1, 3 e 4, B – Picos 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12; C – Pico 11).	40
Figura 23	Perfil cromatográfico da fração aquosa (254 nm, 1-2 = Picos monitorados).	40
Figura 24	Espectro de massas da SAP-A.	44
Figura 25	Espectro de RMN ¹ H da SAP-A (3,5 T, Piridina-d ₅).	45
Figura 26	Espectro de RMN ¹³ C da SAP-A (14,1 T, Piridina-d ₅).	46
Figura 27	Espectro de gHSQC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-d ₅).	49
Figura 28	Espectro de gHMBC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-d ₅).	51
Figura 29	Espectro de gCOSY da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-d ₅).	52
Figura 30	Espectro de TOCSY 2D da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-d ₅).	54
Figura 31	Correlações HMBC que permitiram localizar o carbono oxigenado e a instauração na cadeia do ácido oleanólico.	55
Figura 32	Correlações mais significativas observadas no espectro de ROESY-2D da aglicona da SAP-A.	56
Figura 33	Espectros TOCSY-1D. A) β-glicose (irradiação em δ5,12); B) α-ramnose (irradiação em δ6,26 e δ1,55); C) α-arabinose (irradiação em δ5,30) e D) β-arabinose (irradiação em δ4,74).	58
Figura 34	Espectros ROESY. A) β-glicose (irradiação em δ5,12); B) α-ramnose (irradiação em δ6,26 e δ1,55); C) α-arabinose (irradiação em δ5,30) e D) β-arabinose (irradiação em δ4,74).	60
Figura 35	Correlações evidenciadas nos espectros de gHMBC e ROESY-2D da parte glicosídica da SAP-A e da união com a aglicona.	60
Figura 36	Estrutura proposta para a SAP-A.	61
Figura 37	Estrutura proposta para a SAP-C	64
Figura 38	Estrutura proposta para a SAP-B.	67
Figura 39	Estrutura proposta para a SAP-D.	68
Figura 40	Estrutura proposta para a SAP-E.	69
Figura 41	Espectro de massas do FEN-A, modo negativo.	70
Figura 42	Espectro de massas do FEN-B, modo negativo.	71
Figura 43	Espectro de RMN ¹ H das substâncias FEN-A (A) e FEN-B (B) (2,9 T, CD ₃ OD).	72
Figura 44	Correlações evidenciadas no espectro de gHMBC da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose do FEN-B.	74
Figura 45	Estrutura proposta para o FEN-B.	75
Figura 46	Estrutura proposta para o FEN-A.	76
Figura 47	Equilíbrio ceto-enólico e deuterização dos oxo-açúcares.	77
Figura 48	Estrutura proposta para o FEN-C.	79
Figura 49	Espectro de massas do FEN-D, modo negativo.	81
Figura 50	Estrutura proposta para o FEN-D.	81

Figura 51	Espectro de massas do FEN-E.	82
Figura 52	Espectro de RMN ^1H do FEN-E (3,5 T, MeOD).	82
Figura 53	Espectro de RMN ^{13}C do FEN-E (14,1 T, MeOD).	83
Figura 54	Correlação observada no espectro de ROESY-1D para confirmar a ligação da unidade de glicose no anel B da apigenina.	84
Figura 55	Correlações observadas no espectro de gHMBC que justificam a natureza da unidade do açúcar cujo hidrogênio anomérico foi evidenciado em $\delta 5,39$.	85
Figura 56	Correlações observadas no espectro ROESY-2D para a unidade de açúcar cujo hidrogênio anomérico foi evidenciado em $\delta 5,39$.	86
Figura 57	Correlações observadas no espectro ROESY-1D resultante da irradiação do H-2'/6' do anel B da apigenina.	87
Figura 58	Estrutura proposta para o FEN-E.	89
Figura 59	Estrutura proposta para o FEN-F.	90
Figura 60	Estrutura proposta para o FEN-G.	92
Figura 61	Estruturas propostas para o TAN-A e TAN-B.	94
Figura 62	Estrutura proposta para o TAN-C.	96
Figura 63	Tempos de retenção das substâncias FEN-B (A), SAP-A (B) e TAN-C (C), determinadas no UHPLC.	98
Figura 64	Peso corpóreo dos camundongos fêmeas (A) e machos (B) ao longo do tempo, tratados com o extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> .	100
Figura 65	Número de quedas de camundongos machos tratados oralmente com o extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> na dose de $5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$, no modelo de Rota-Rod. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste <i>a posteriori</i> de Dunnett com $***p < 0,001$.	102
Figura 66	Início das quedas de camundongos machos tratados oralmente com o extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> na dose de $5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$, no modelo de Rota-Rod. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste <i>a posteriori</i> de Dunnett com $***p < 0,001$.	103
Figura 67	Ação do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto (A) e por indometacina (B) em ratos. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste <i>a posteriori</i> de Dunnett com $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ (A) e $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ (B).	107
Figura 68	Ação do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> no modelo de indução de úlcera duodenal por cisteamina em ratos. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste <i>a posteriori</i> de Dunn's com	

	**p<0,01.	109
Figura 69	Teor de flavonoides (μg de quercetina mL^{-1}) e teor de fenóis (μg de ácido gálico mL^{-1}) obtidos em extratos EtOH 70% de <i>S. marginata</i> nativa coletada antes (AF), durante (DF) e após o florescimento (PF). Valor médio \pm desvio padrão.	122
Figura 70	Capacidade sequestradora de radicais livres dos HDA-AF, HDA-DF e HDA-PF de <i>S. marginata</i> e dos padrões ácido gálico e quercetina, sobre o DPPH. Absorbância em 517 nm após 30 min de reação.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Agrupamento das frações obtidas no primeiro fracionamento do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> e as respectivas massas.	37
Tabela 2	Agrupamento das frações obtidas no segundo fracionamento do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> e as respectivas massas.	41
Tabela 3	Fracionamento de S1(9-10) e as respectivas massas.	42
Tabela 4	Fracionamento de S1(11) e as respectivas massas.	42
Tabela 5	Fracionamento de S1(15-16) e as respectivas massas.	43
Tabela 6	Fracionamento de FS7 e as respectivas massas.	43
Tabela 7	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada SAP-A (14,1 e 3,5 T, Piridina- <i>d</i> ₅ , ppm).	47
Tabela 8	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C obtidos com os descritos na literatura, da unidade de arabinose terminal da substância denominada SAP-A (14,1 e 3,5 T, Piridina- <i>d</i> ₅ , ppm).	62
Tabela 9	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C descritos por EKABO <i>et al.</i> (1996), FAN <i>et al.</i> (2010), HAI <i>et al.</i> (2012) e da SAP-A referentes à unidade sacarídica terminal.	63
Tabela 10	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C da parte glicosídica das substâncias denominadas SAP-A, B, C e D (3,5 T, Piridina- <i>d</i> ₅ , ppm).	65
Tabela 11	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C da aglicona das substâncias denominadas SAP-A, B, C e D (3,5 T, Piridina- <i>d</i> ₅ , ppm).	66
Tabela 12	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da parte glicosídica da substância denominada SAP-E (11,7 e 2,9 T, Piridina- <i>d</i> ₅ , ppm).	69
Tabela 13	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada de FEN-B (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	74
Tabela 14	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose da substância denominada FEN-A (11,7 e 2,9 T, 50°C; CD ₃ OD e DMSO – <i>d</i> ₆ , ppm).	76
Tabela 15	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada FEN-C (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	78
Tabela 16	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada FEN-D (14,1 e 3,5 T, CD ₃ OD, ppm).	80
Tabela 17	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada FEN-E (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	88
Tabela 18	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada FEN-F (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	90
Tabela 19	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada FEN-G (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	91
Tabela 20	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância denominada de TAN-A (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	93
Tabela 21	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância	

	denominada de TAN-C (11,7 e 2,9 T, CD ₃ OD, ppm).	95
Tabela 22	Toxicidade em fêmeas - relação peso órgão/peso animal.	101
Tabela 23	Toxicidade em machos - relação peso órgão/peso animal.	101
Tabela 24	Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com extrato EtOH 70% de folhas de <i>Serjania marginata</i> , em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica	105
Tabela 25	Efeito do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> em ratos submetidos à ligadura de piloro oral e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.	110
Tabela 26	Efeito do extrato EtOH 70% de <i>S. marginata</i> em ratos submetidos à ligadura de piloro intraduodenal e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.	111
Tabela 27	Temperaturas médias mínima e máxima e precipitações mensais nos meses de coleta das folhas das plantas da <i>S. marginata</i> .	113
Tabela 28	Folhas de <i>Serjania marginata</i> Casar. frescas e secas e resíduo sólido (1-Coletada em fevereiro de 2011; 2-Coletada em outubro de 2011 e 3-Coletada em dezembro de 2011).	114
Tabela 29	Quantidade de pó, etanol 70% e tempo de extração da <i>S. marginata</i> nativa e cultivada com adubos verdes e nitrogênio (Coletadas em 1-fevereiro de 2011; 2-outubro de 2011 e 3-dezembro de 2011).	115
Tabela 30	Rendimento dos extratos EtOH 70% de <i>S. marginata</i> nativa e cultivada em solo coberto com três adubos verdes, com ou sem nitrogênio, coletadas em fevereiro, outubro e dezembro de 2011, em Dourados-MS.	119
Tabela 31	Massas fresca (MFF) e seca (MSF) de folhas e caule (MFC e MSC) e área foliar (AF) de plantas de <i>S. marginata</i> cultivada com adubos verdes (<i>Stizolobium aterrimum</i> , <i>Crotalaria spectabilis</i> e <i>Canavalia ensiforme</i>), com ou sem N.	123
Tabela 32	Teores de macro e micronutrientes de folhas da <i>S. marginata</i> cultivada com três adubos verdes (AV), sem (S) ou com (C) nitrogênio (N).	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AZS	Azida Sódica
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
C-18	Reversed-Phase Octadecylsilan (Fase Reversa Octadecilsilano)
d.i.	Internal Diameter (Diâmetro Interno)
DMSO-d₆	Dimetil Sulfóxido Hexadeuterado
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2–difenil-1-picrilhidrazila)
d	Dubleto
dl	Dubleto largo
dd	Duplo dubleto
dq	Duplo quarteto
ESI	Electrospray Ionization (Ionização por Electrospray)
EtOH	Etanol
FIA	Flow Injection Analysis (Análise por Injeção em fluxo ou Análise por Inserção Direta da Amostra)
FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis – Electrospray Ionization – <i>Ion Trap</i> – Massa Spectrometry (Espectrometria de Massas com analisador do tipo ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e Inserção Direta da Amostra)
gCOSY	Gradient Correlate Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
gHSQC	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
HDA-AF	Extrato etanólico 70% da espécie coletada antes do florescimento
HDA-DF	Extrato etanólico 70% da espécie coletada durante o florescimento
HDA-PF	Extrato etanólico 70% da espécie coletada após o florescimento
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry (Espectrômetro de Massas de Alta Resolução)
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photo-Diode Array (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HPLC-RI	High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Índice de Refração)
IT	<i>Ion Trap</i>
m	Multiplete
MeOH	Metanol
m/z	Relação Massa/Carga
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NPD	4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina
NP-PEG	Difenilaminoborato-Polietilenoglicol
o	Overlap (sinais sobrepostos)
ppm	Partes por milhão

R_f	Tempo de retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
ROESY	Rotating Frame Overhause Effect Spectroscopy
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
s	Singleto
s/	Singleto largo
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TQD	Tanden Quadrupolo Detector (Detector Triplo Quadrupolo)
T_{rsubst.}	Tempo de retenção da substância
TT_{método}	Tempo total do método
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	3
2	INTRODUÇÃO	4
3	OBJETIVOS	13
4	EXPERIMENTAL	14
4.1	Instrumentos	14
	CAPÍTULO 1	17
	ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- ULCEROGÊNICA DE <i>Serjania marginata</i> Casar. NATIVA DO CERRADO	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	EXPERIMENTAL	17
2.1	Coleta e processamento do material vegetal	17
2.2	Etapa química	17
2.2.1	Extração	17
2.2.2	Triagem cromatográfica e prospecção fitoquímica	18
2.2.3	Fracionamento do extrato EtOH 70%	19
2.2.4	<i>Clean up</i> das frações	19
2.2.5	Purificação das frações	20
2.2.6	Isolamento e identificação das substâncias químicas	20
2.2.6.1	Saponinas	20
2.2.6.2	Flavonoides	21
2.2.6.3	Taninos	22
2.2.7	Hidrólise ácida	22
2.2.7.1	Fração de saponinas	22
2.2.7.2	Fração de flavonoides	22
2.2.8	Atividade óptica	23
2.2.9	Quantificação de substâncias marcadoras	23
2.3	Ensaio biológicos	24
2.3.1	Animais	24
2.3.2	Estudo de toxicidade	24
2.3.3	Estudo de neurotoxicidade	24
2.3.4	Mutagenicidade (Teste de Ames)	25
2.3.5	Avaliação das úlceras pépticas	26
2.3.5.1	Úlceras gástricas	26
2.3.5.1.1	Induzidas por etanol absoluto	26
2.3.5.1.2	Induzidas por indometacina	26
2.3.5.2	Úlceras duodenais	27
2.3.5.2.1	Induzidas por cisteamina	27
2.3.6	Mecanismo de ação das úlceras gástricas	27
2.3.6.1	Avaliação dos parâmetros do suco gástrico pelo modelo de ligadura do piloro	27
2.3.7	Análise estatística	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1	Etapa química	28
3.1.1	Extração	28
3.1.2	Triagem cromatográfica e prospecção fitoquímica	29
3.1.3	Fracionamento do extrato EtOH 70%	36

3.1.4	Purificação das frações	41
3.1.5	Isolamento e identificação das substâncias químicas	43
3.1.5.1	Saponinas	43
3.1.5.1.1	Saponina A	43
3.1.5.1.2	Saponina C	64
3.1.5.1.3	Saponina B	66
3.1.5.1.4	Saponina D	67
3.1.5.1.5	Saponina E	68
3.1.5.2	Flavonoides	70
3.1.5.2.1	Flavonoides A e B	70
3.1.5.2.2	Flavonoide C	77
3.1.5.2.3	Flavonoide D	78
3.1.5.2.4	Flavonoide E	81
3.1.5.2.5	Flavonoide F	89
3.1.5.2.6	Flavonoide G	91
3.1.5.3	Taninos	92
3.1.5.3.1	Taninos A e B	92
3.1.5.3.2	Tanino C	94
3.1.6	Quantificação de substâncias marcadoras	96
3.1.7	Ensaio biológicos	99
3.1.7.1	Estudo de toxicidade	100
3.1.7.2	Estudo de neurotoxicidade	101
3.1.7.3	Mutagenicidade (teste de Ames)	103
3.1.7.4	Avaliação das úlceras pépticas	106
3.1.7.4.1	Úlceras gástricas	106
3.1.7.4.1.1	Induzidas por etanol absoluto e por indometacina	106
3.1.7.4.2	Úlceras duodenais	108
3.1.7.4.2.1	Induzidas por cisteamina	108
3.1.7.4.3	Mecanismo de ação das úlceras gástricas	110
3.1.7.4.3.1	Avaliação dos parâmetros do suco gástrico pelo modelo de ligadura do piloro	110
	CAPÍTULO 2	112
	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DE <i>Serjania marginata</i> Casar (SAPINDACEAE) NATIVA E CULTIVADA.	112
1	INTRODUÇÃO	112
2	EXPERIMENTAL	112
2.1	Coleta e processamento do material vegetal	112
2.2	Etapa Química	114
2.2.1	Extração	114
2.2.2	Determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais	115
2.2.3	Produção de biomassa e composição de macro e micronutrientes	116
2.3	Ensaio biológicos	117
2.3.1	Atividade antiradicalar	117
2.3.1.1	Espécie nativa coletada em diferentes épocas	117
2.3.1.2	HDA-AF, frações e substâncias isoladas	117
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	118
3.1	Etapa química	118
3.1.1	Extração	118

3.1.2	Determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais	121
3.1.3	Produção e composição de macro e micronutrientes	122
3.2	Ensaio biológicos	125
3.2.1	Atividade antiradicalar	125
3.2.1.1	Espécie nativa coletada em diferentes épocas	125
3.2.1.2	HDA-AF, frações e substâncias isoladas	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

RESUMO

A família Sapindaceae é bastante estudada do ponto de vista farmacológico. A *Serjania marginata* Casar., uma espécie dessa família, é indicada, popularmente, para dores de estômago. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer o perfil químico, isolar e caracterizar os constituintes químicos do extrato EtOH 70% de *S. marginata*, quantificar as substâncias marcadoras da espécie, avaliar a toxicidade aguda, neurotoxicidade, atividade anti-ulcerogênica, antiradicalar e mutagênica do extrato, determinar o teor de fenóis e flavonoides totais e avaliar a espécie no cultivo *ex situ*. Os estudos foram realizados com as folhas de plantas nativas do Cerrado e cultivadas no Horto de Plantas Medicinais, da UFGD, em Dourados-MS. O maior rendimento foi da espécie nativa coletada em fevereiro de 2011 (32,6%). Pela triagem fitoquímica, determinou-se que o extrato é composto por flavonoides, saponinas, taninos, compostos fenólicos e esteróides. Foram isoladas quinze substâncias, das classes dos flavonoides, taninos e saponinas, sendo o ácido oleanólico 3-O- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosídeo e a 7,5"-anidroapigenina 8-C- α -(2,6-dideoxi-5-hidroxi-ribo-hexopiranosil)-4'-O- β -D-glucopiranosídeo, descritos pela primeira vez na literatura. O extrato não apresentou efeitos tóxicos nem neurotóxicos no uso oral agudo e não foi mutagênico. Evidenciou-se também significativa atividade anti-úlceras para o extrato em diversos modelos farmacológicos, avaliados *in vivo*. Os extratos das folhas colhidas em diferentes épocas de cultivo, avaliados através do uso do reagente DPPH, apresentaram alta atividade antiradicalar, quando comparados ao ácido gálico e quercetina, especialmente devido à presença de taninos. As plantas coletadas após o florescimento apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos e, antes do florescimento, maior concentração de flavonoides. A adubação verde foi considerada prática promissora na produção da *S. marginata* e na preservação do solo. Por outro lado, os teores de macro e micronutrientes variaram pouco em função dos adubos verdes e do nitrogênio aplicados ao solo.

Palavras-chave: *Serjania marginata*, Sapindaceae, cipó-uva, atividade antiradicalar, potencial gastroprotetor.

ABSTRACT

Sapindaceae family is extensively studied on a pharmacological point of view. *Serjania marginata* Casar., a specie of this family, is indicated popularly for stomach aches. The objectives of this work were to standardize the chemical profile, to characterize the chemical composition of 70% EtOH extract from *S. marginata*, to quantify the marker substances for the specie, to assess the acute toxicity, neurotoxicity, anti-ulcerogenic, antiradical and mutagenic activities of the extract, to determine the total phenolic and flavonoid contents and to evaluate conditions of ex situ cultivation for the specie. The studies were performed with leaves of native plants from the Cerrado and of plants grown in the Garden of Medicinal Plants from the UFGD, Dourados-MS. The highest contents were achieved by the native accesses collected during February 2011 (32.6%). During the chemical screening, it was determined that the extract was composed by flavonoids, saponins, tannins, phenols and steroids. Fifteen substances were isolated which were classified as flavonoids, tannins and saponins, and the oleanolic acid 3-O- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside and 7,5"-anhydroapigenin 8-C- α -(2,6-dideoxy-5-hydroxy-ribo-hexopyranosyl)-4'-O- β -D-glucopyranoside described for the first time in the literature. The extract here studied did not show any toxic or neurotoxic effect by acute oral dose neither presented any mutagenic potential. Significant anti-ulcer activity of the extract was evidenced when applied in different pharmacological modulations, evaluated *in vivo*. The extracts from leaves harvested in different growing seasons evaluated through the use of the reagent DPPH showed high antiradical activity when compared to the gallic acid and quercetin, mainly due to the presence of tannins. Plants collected after flowering showed higher amounts of phenolic compounds and, before flowering, higher concentration of flavonoids. Cover crop was considered a promising practice in the production of *S. marginata* and in soil preservation. On the other hand, the levels of macro and micronutrients varied slightly depending on the cover crops and nitrogen applied to the soil.

Keywords: *Serjania marginata*, Sapindaceae, cipó-uva, antiradical activity, gastroprotective potential.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil é apontado muitas vezes como a nação que possui a maior biodiversidade do planeta, mas não possui dados oficiais sobre o tamanho do mercado nacional de plantas medicinais (KINUPP & BARROS, 2012). De acordo com os registros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, há cerca de 390 fitoterápicos no mercado brasileiro. A Agência criou, recentemente, uma nova categoria: a dos “fitoterápicos tradicionais”, que foram reconhecidos sem necessidade de pesquisas porque os efeitos medicinais já são consagrados há anos pela população. Desses, poucos foram produzidos a partir de plantas nativas do Brasil (FERREIRA, 2014).

Embora se note crescente demanda no mercado de fitoterápicos, este tem sido atendido, na maioria das vezes, com matéria-prima sem padronização e, ainda, fruto do extrativismo sem critérios. Tecnologias de produção da matéria-prima vegetal e de procedimentos extrativos são de extrema importância, considerando, ainda, a necessidade de atender aos padrões exigidos pela legislação vigente nos campos da química, das indústrias farmacêutica e alimentícia, e para entrar no mercado nacional e internacional (BARA *et al.*, 2006).

Com base na necessidade de orientar pesquisas, a fim de gerar produtos que possam ser agregados no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde divulgou uma lista de plantas medicinais, nativas e exóticas, com potencial para serem usadas contra diabetes, dor, artrites, úlceras, hipertensão, inflamações e outras doenças crônicas. Atualmente, 12 fitoterápicos já são disponibilizados na rede pública de saúde para dores, inflamações, disfunções e outras doenças de baixa gravidade (DIÁRIO DA SAÚDE, 2009; PORTAL DA SAÚDE, 2013). É necessário ampliar o número de plantas dessa relação, tendo em vista

a a amplitude geográfica do território brasileiro e a diversidade de plantas e usos nas diversas regiões do país.

Dentre os biomas, o Cerrado ocupa 22,0% do território brasileiro e apresenta características únicas, como tipo de solo e clima, que afetam diretamente o desenvolvimento das plantas. Existem cerca de 6.500 espécies de plantas nativas no Cerrado, das quais, apenas cerca de 200 já têm algum uso econômico identificado (SANTOS *et al.*, 2010). As variadas posições geográficas, as inóspitas condições climáticas e a intensa competição existente nesse bioma levaram à

evolução de uma admirável diversidade vegetal, acompanhada por uma intrigante diversidade química de metabólitos secundários. Essas moléculas podem representar importantes princípios ativos, úteis para o tratamento e a cura de numerosas doenças. Contudo, o Cerrado figura na relação dos 17 ecossistemas mais degradados do planeta sendo um dos “hot spots” mundiais de biodiversidade e foi incluído dentre os biomas prioritários para a conservação em nível global (DURIGAN *et al.*, 2007; CONSERVATION INTERNATIONAL, 2011).

A cadeia produtiva de plantas medicinais, desde o cultivo até a comercialização, deve ser muito bem estudada em todas as etapas do processo, para que o conjunto garanta eficácia e segurança dos produtos com fins medicinais. É necessário aliar os estudos de cultivo e da composição química da planta às atividades farmacológicas e toxicológicas observadas. A importância de estudos sobre o comportamento fisiológico das plantas medicinais consiste em gerar conhecimentos que possibilitem determinar condições ideais de cultivo. Isso, porque se tem registrado a influência de inúmeros fatores ambientes determinando variações sobre o teor e a composição química e o acúmulo de biomassa em plantas medicinais (VIMOLMANGKANG *et al.*, 2010).

A proposta deste trabalho é a de investigar novas possibilidades de espécies vegetais para o tratamento de doenças crônicas, em que a eficácia e a segurança de uso sejam prioridade. Uma das espécies medicinais que está sendo estudada pelo projeto Biota/FAPESP é a *Serjania marginata* Casar., nativa do Brasil e encontrada em todas regiões do País (GUARIM NETO & SANTANA, 2000; SOMNER *et al.*, 2010). Do ponto de vista agrônomo, a espécie vem sendo estudada em Dourados-MS, onde se observou que a planta se desenvolveu bem, o que demonstra que pode ser cultivada *ex situ* (TABALDI *et al.*, 2012). Daí a necessidade de realizar estudos de produção agrônoma, aliados ao perfil químico da espécie, assim como padronização do extrato.

2 INTRODUÇÃO

A grande diversidade biológica vegetal, aliada aos contrastes sociais, faz do uso de plantas medicinais uma prática comum no Brasil, onde se estima que 82,0% da população utilizem produtos à base de plantas medicinais. No entanto, embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, apenas 8,0% das espécies

foram estudadas para a pesquisa de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (JOLY *et al.*, 2011).

O extrativismo de material silvestre para o aproveitamento na fitoterapia causa contínua garimpagem das espécies de plantas nativas, o que leva à deterioração ecológica. A demanda do mercado obriga a encontrar vias alternativas ao extrativismo, pois a necessidade de satisfazer a indústria produzirá redução drástica das fontes naturais. Por essas razões é que se deve conservar a riqueza genética, domesticar, conhecer as práticas de cultivo, a composição química e atividades biológicas, com fins de oferecer ao consumidor um produto de boa qualidade e padronizado. A conservação de um recurso natural não implica apenas a proteção da sua biodiversidade genética, mas a defesa da biodiversidade cultural que o integra e aproveita (BANDONI & CZEPAK, 2008).

A família Sapindaceae compreende cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. As plantas dessa família têm grande ocorrência nas regiões tropicais, englobando desde as trepadeiras, como a *Serjania marginata* Casar. até árvores altas, como a *Magonia pubescens* St. Hil. O nome de um dos gêneros, *Sapindus*, foi originado do latim *sapo* = sabão; *indicus* = indiano, devido às propriedades saponáceas dos frutos, utilizados na Índia para a lavagem de roupas fabricadas com o linho. No Estado do Mato Grosso do Sul (MS), as Sapindaceae encontram-se amplamente distribuídas, participando, com seus representantes específicos, das duas grandes formações biogeográficas que a caracterizam, o Cerrado e o Pantanal, definindo, nessas, fisionomias particulares, em uma variação desses dois tipos vegetacionais característicos (RADLKOFER, 1900; FERRUCI, 2004; SOUZA & LORENZI, 2012). As plantas são uma rica fonte de substâncias como saponinas glicosiladas, flavonoides, taninos, isoprenóides, polifenóis, triterpenos, diterpenos, lecitinas e hidrogéis e têm sido investigadas quanto às suas propriedades terapêuticas, baseando-se, principalmente, na indicação popular (LIMA *et al.*, 2006; GOMES, 2007; ARRUDA, 2008; GUENKA, 2008; CARDOSO *et al.*, 2013).

O gênero *Serjania* compreende 226 espécies, sendo a maioria lianas. A *Serjania marginata* Casar. (cipó-uva e cipó-timbó), objeto deste estudo, é nativa do Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina. No Brasil, foi registrada sua presença na mata decídua, em campo inundável e na região chaquenha de MS, em 18 fragmentos florestais no noroeste do Estado de São Paulo e na floresta densa do Estado de

Pernambuco (GUARIM NETO & SANTANA, 2000; RODAL & NASCIMENTO, 2002; ARRUDA, 2008; SPRENGEL-LIMA & REZENDE, 2013; MOREIRA *et al.*, 2013).

As plantas de *S. marginata* são trepadeiras escandentes (Figuras 1A e 1B); com caules glabros ou pubescentes, ramos triangulares, com estrias impressas; corpos lenhosos compostos, sendo o central maior. Folhas compostas, biternadas; pecíolo maior que a ráquis, 5 folíolos, às vezes a juga proximal com 3 foliólulos, folíolos de 9 cm de comprimento por 3 cm de largura, folíolos laterais ovados ou oblongos, sésseis ou com peciólulo alado, base decurrente no folíolo terminal, cunheada nos folíolos laterais, base aguda, ápice acuminado, íntegros ou raramente denteados, membranáceos ou coriáceos (ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 1993; GUARIM NETO & SANTANA, 2000).

Inflorescências em tirso solitário ou em panículas congestas, terminais (Figura 1C), cerca de 12 cm de comprimento; eixos pubescentes, pedúnculos de 6,2 - 7,5 cm de comprimento, ráquis de 7,0 - 10,5 cm de comprimento, pedúnculo do cincino de 3 - 5 mm de comprimento, pedicelo floral articulado na base, de 2,5 - 3,2 mm de comprimento. Flores alvas, hermafroditas, cerca de 3,5 - 8,5 mm de comprimento, pediceladas. Duas sépalas externas curtas, as internas maiores, glabras, 3,0 - 4,8 mm. Pétalas obovado-oblongas, base cunheada, 4,5 - 7,0 mm. Escamas de margem vilosa. Nectário glanduloso. Estames de filetes filiformes, com 3,5 - 7,3 mm de comprimento, lanosos na base, anteras glabras. Gineceu de 3,0 - 7,5 mm de comprimento, ovário piramidal pubescente, estilete crasso, glabro, de 3,0 - 4,5 mm de comprimento, tricomas do estigma curtos. Frutos coriáceos (Figura 1D) de 2,0 - 2,7 x 2,8 - 3,5 cm de comprimento; epicarpo castanho-claro, porção seminífera mais escura, endocarpo glabro. Sementes trígono lenticulares, inseridas na base dos lóculos, de 6 - 8 mm de diâmetro. Cotilédones rugosos (ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 1993; GUARIM NETO & SANTANA, 2000).



Figura 1 – Plantas nativas (A) e cultivadas (B) de *S. marginata*. Detalhe de inflorescências (C) e frutos (D). Fonte: Material fotográfico da autora

Diferentes espécies de *Serjania* e alguns dos seus compostos isolados têm atividades analgésica, antibacteriana, antifúngica, moluscicida, anti-inflamatória, antinociceptiva, dentre outra (DI STASI *et al.*, 1988; GOMES, 2007). No entanto, há poucas referências encontradas na bibliografia consultada sobre o uso medicinal da *S. marginata*, dentre elas, o trabalho de Bourdy *et al.* (2004). Os autores fizeram estudo etnofarmacológico dentro de um grupo étnico do Chaco seco Boliviano, o izoceño-guarani, onde foram identificadas 306 espécies, sendo 189 medicinais e, dentre elas, a *S. marginata*, cujas folhas, na forma de suco, foram indicadas em uso interno para dores de estômago.

Périco *et al.* (2013) avaliaram a atividade anti-edematogênica do extrato hidroalcoólico da *S. marginata* e observaram que o extrato possui atividade anti-inflamatória aguda que pode ser mediada por quelar as espécies reativas de oxigênio geradas pela peroxidação lipídica induzida por xilol; além de inibir ou bloquear a liberação de PGE2, comprovando o uso da planta na medicina tradicional para o tratamento da inflamação.

Sobre outras espécies de *Serjania*, as folhas e raízes da *S. erecta* Radlk (cinco-folhas) são indicadas como medicinais. Segundo Guarim Neto (1996), das folhas são preparados chás que auxiliam no tratamento de úlceras. A raiz serve para o controle da hipertensão e a planta tem também potencial ornamental. Gomig *et al.* (2008) avaliaram a atividade anti-inflamatória tópica do extrato hidroalcoólico (0,01–3,0 mg/orelha) e frações diclorometânica (0,03–1,0 mg/orelha), acetato de etila (0,03–1,0 mg/orelha) e hexânica (0,003–1,0 mg/orelha) em edema causado por óleo de cróton em orelhas de ratos e observaram redução do edema dependente da dose (ID_{50} = 0,14 mg/orelha, 0,23 mg/orelha, 0,14 mg/orelha, 0,04 mg/orelha, respectivamente). Concluíram que houve efeito tópico anti-inflamatório da espécie testada.

Em outro estudo, realizado por Arruda *et al.* (2009), os extratos clorofórmico e metanólico, obtidos das folhas de *S. erecta*, apresentaram atividade gastroprotetora em modelo de indução de úlcera por etanol absoluto, mesmo em baixas doses (70,0 mg kg⁻¹) e não apresentaram atividade tóxica no modelo de toxicidade aguda em modelos animais *in vivo*. O extrato metanólico obtido das partes aéreas da mesma espécie neutralizou os efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararacussu* e de suas miotoxinas isoladas (BthTX-I e II) (FERNANDES *et al.*, 2011).

A composição química da *Serjania erecta* foi investigada por Cardoso *et al.* (2013), que isolaram das raízes da planta epicatequina, canferol, canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo e canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1→6)- β -D-glicopiranosídeo e, das folhas, canferol, canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo, vitexina, isovitexina e epicatequina (Figura 2). Os extratos etanólicos das folhas e raízes apresentaram baixa atividade antioxidante; no entanto, inibiram o crescimento dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella setubal*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, além de terem apresentado moderada atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*.

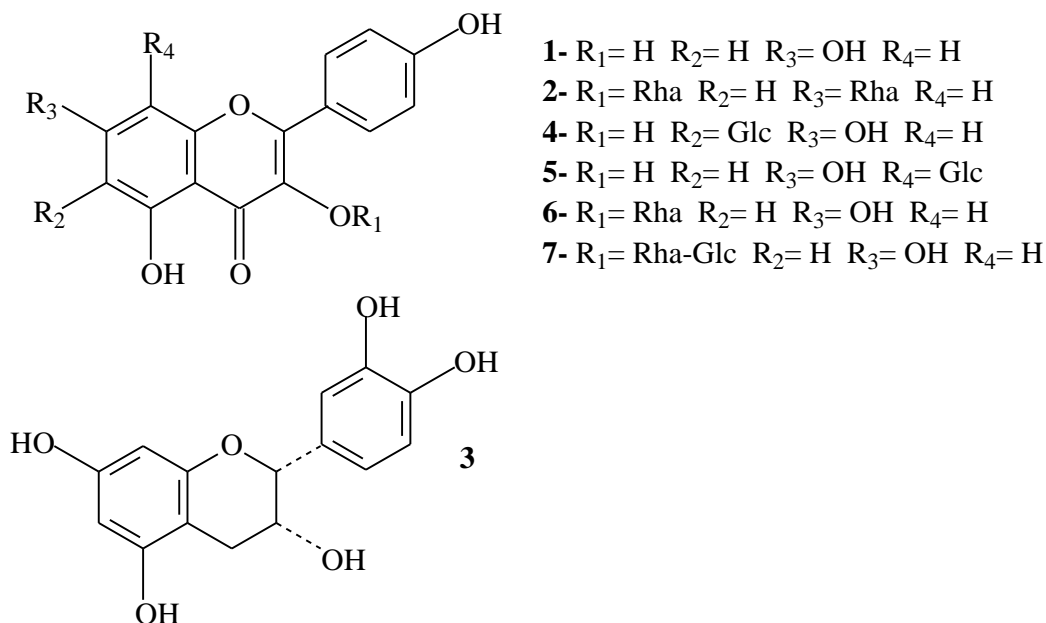


Figura 2 – Flavonoides isolados das raízes e/ou folhas da *S. erecta*. Canferol (1), canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo (2), epicatequina (3), isovitexina (4), vitexina (5), canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (6) e canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (7).

O extrato etanólico obtido da raiz de *S. lethalis*, quando testado, *in vitro*, contra *Leishmania donovani*, apresentou atividade antiprotozoária com IC₅₀ de 5,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MESQUITA *et al.*, 2005). Da planta, foram isoladas saponinas, as quais são popularmente conhecidas por serem tóxicas para peixes (RODRIGUES *et al.*, 2006). Foi determinada atividade antibacteriana, contra *Staphylococcus aureus* (MIC ≤ 100 mg mL^{-1}), para o extrato etanólico dos caules e das folhas (LIMA *et al.*, 2006). Além disso, determinou-se que em 500 mg das partes aéreas de *S. lethalis* há 23,27 mg de taninos e 1,12 mg de flavonoides. Os autores citam que taninos e flavonoides são muito utilizados por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, dentre outras (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Da *Serjania glutinosa* Radlk. (timbó-branco), são usadas as folhas, cujo macerado é indicado como ictiotóxico. Da *S. caracasana* (Jacq.) Willd. (tingui-damata) usa-se o cipó (caule e ramos) na confecção de cestos e cordas rústicas; possui potencial ornamental e apícola. O extrato etanólico apresentou potencial gastroprotetor *in vivo* e atividade antiespasmódica *in vitro* (SILVA *et al.*, 2012). Segundo Pott & Pott (1994), é tóxica para peixes. Também, da *S. ovalifolia* Radlk. (timbó-amarelo) o macerado das folhas é usado como ictiotóxico (GUARIM NETO, 1996; GUARIM NETO *et al.*, 2000).

Foram isoladas, do extrato metanólico das partes aéreas da *S. triquetra*, as sapogeninas 11 α -hidroperoxi-hederagenina, estigmasterol, ácido oleanólico, ácido morólico e hederagenina (CHÁVEZ & DELGADO, 1994) (Figura 3). Dos caules de *S. salzmanniana*, foram isoladas, do extrato metanólico, as saponinas salzmannianosídeo A (3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]gipsogenina), salzmannianosídeo B (3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]hederagenina), pulsatilla D (3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]hederagenina) e 3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]ácido oleanólico (Figura 4). Todas apresentaram potencial moluscicida contra *Biomphalaria alexandrina* e antifúngica, contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (EKABO *et al.*, 1996).

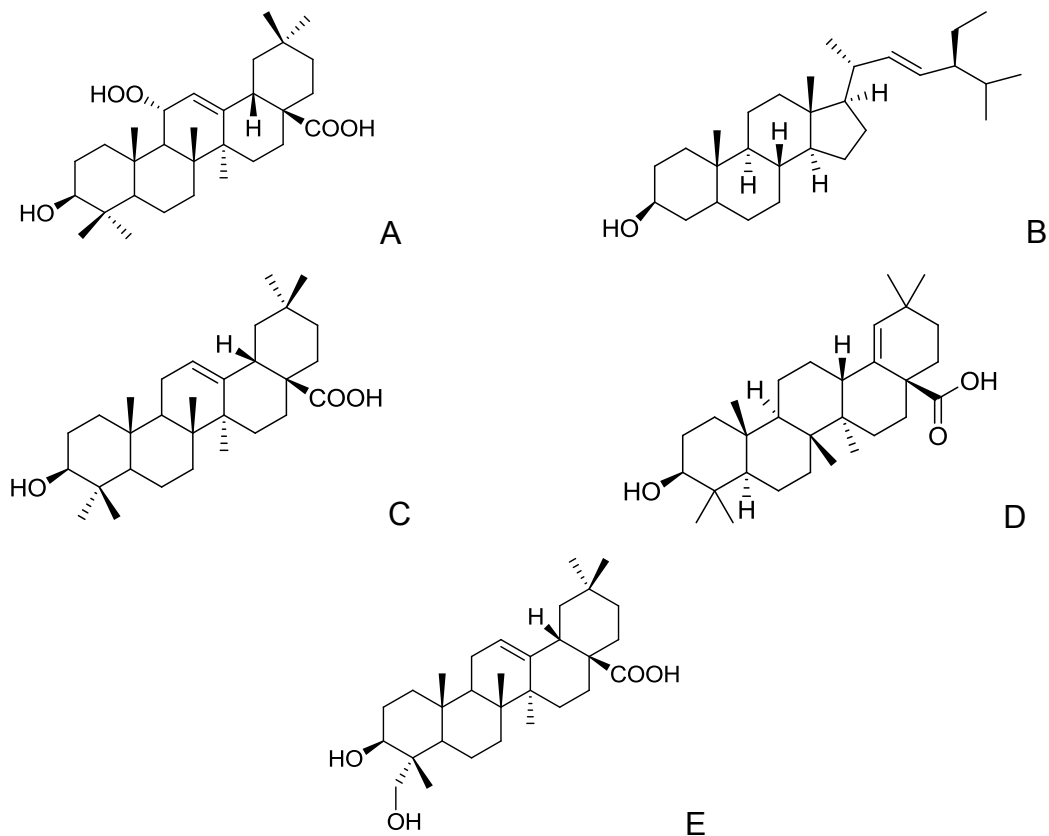


Figura 3 – Sapogeninas isoladas das partes aéreas da *S. triquetra*. 11 α -hidroperoxi-hederagenina (A), estigmasterol (B), ácido oleanólico (C), ácido morólico (D) e hederagenina (E).

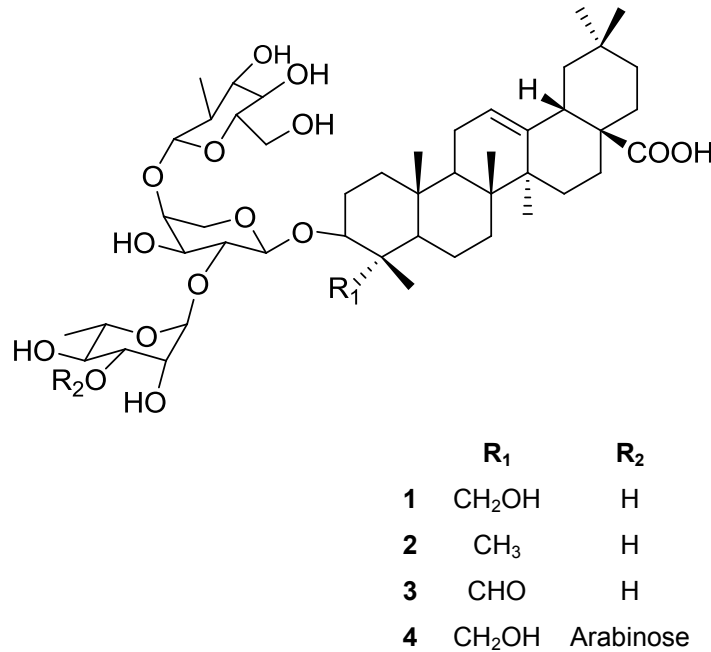


Figura 4 – Saponinas isoladas dos caules de *S. salzmanniana*.

O extrato metanólico das partes aéreas da *S. glabrata* apresentou atividade antioxidante pelo método da medida da proteção contra a oxidação no ensaio da perda de cor do beta caroteno (DAVID *et al.*, 2007). Por outro lado, da *S. yucatanensis*, o extrato etanólico obtido das folhas apresentou atividade tripanocida *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* e significativa atividade tripanocida *in vivo*, reduzindo 75% da parasitemia em ratos infectados (POLANCO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Além da busca por produtos com qualidade, que garantam a segurança e a eficácia das substâncias ativas dessas plantas, é importante a adaptação *ex situ* e para isso, devem ser estudados diferentes tratamentos culturais, que visem à maior produção de biomassa e de metabólitos secundários, além da preservação do ambiente. Dentre os tratamentos culturais, a adubação verde torna-se importante para a região de Cerrado, pois ela promove proteção, melhoria e manutenção da qualidade do solo, além de aumentos consideráveis dos teores de matéria orgânica e nutrientes, beneficiando os agroecossistemas (LEITE *et al.*, 2010).

A *S. marginata* ainda é pouco estudada do ponto de vista agrônomo. Dentre os trabalhos encontrados na bibliografia consultada está o de Tabaldi *et al.* (2012), no qual foram estudados os efeitos dos adubos verdes mucuna, crotalária e feijão-de-porco e a adição ou não de nitrogênio ao solo na produção da planta. Os autores

observaram que mucuna e feijão-de-porco apresentaram a maior acumulação de biomassa fresca e seca da parte aérea no florescimento, comparado com a crotalária. Para altura de plantas, a contribuição dos adubos verdes foi observada para mucuna, enquanto para índice de clorofila, área foliar, massa fresca e seca de folhas e caule, mucuna e feijão-de-porco promoveram incremento. Nas folhas, a mucuna contribuiu significativamente para aumento nos níveis de N, enquanto aumento nos níveis de K foi observado com todos os tratamentos com adubos verdes. Além disso, o pré-cultivo com mucuna e feijão-de-porco promoveu aumento nos níveis de P em folhas. Portanto, mucuna e feijão-de-porco foram os adubos verdes mais promissores para o cultivo da *S. marginata*, melhorando a produção e provavelmente a economia de N.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Estabelecer o perfil químico, isolar e caracterizar os constituintes químicos do extrato EtOH 70% de *Serjania marginata*;
- Avançar nas pesquisas para viabilização de extratos padronizados de *S. marginata*, dentre elas a quantificação de substâncias marcadoras;
- Avaliar a toxicidade aguda, neurotoxicidade, atividade anti-ulcerogênica, antiradicalar e mutagênica do extrato EtOH 70% de *Serjania marginata*;
- Determinar o teor de fenóis e flavonoides totais e avaliar a atividade antiradicalar dos extratos EtOH 70% das espécies nativas, coletadas em três fases do ciclo da planta;
- Comparar os rendimentos dos extratos da *Serjania marginata* nativa do Cerrado com a mesma espécie cultivada no Horto de Plantas Medicinais, da UFGD, em Dourados-MS e
- Determinar a produção de biomassa e a composição de macro e micronutrientes da espécie cultivada no Horto de Plantas Medicinais, da UFGD, em Dourados-MS.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentos

-Espectrômetro de massas LCQ FLEET (ESI-IT-MSⁿ, Thermo Scientific[®]), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). Ionização por *electrospray* (ESI) e interface do tipo *ion-trap* (IT). Software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finigan[®]) foi utilizado para a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

-Espectrômetro de massas UPLC-QTOF HR-ESI (Waters Synapt G2, Manchester, UK). Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo e negativo, sendo a faixa de íons com m/z de 100–2000 Da. Ionização por *electrospray*, 70 V. Software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finigan[®]) foi utilizado para a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

-HPLC Varian[®] 210, detector de arranjo de fotodiodos (PDA), com varredura entre 200-800 nm. Coluna de fase reversa C-18 Phenomenex[®] Gemini (25,0 cm x 4,6 mm x 5,0 μ m) e pré-coluna (2,5 cm x 3,0 mm) de mesma fase. O programa *Star Chromatography Workstation* versão 6.2 foi utilizado para aquisição e processamento dos dados.

-HPLC semi-preparativo, constituído por uma bomba de fluxo máximo 10,0 mL min⁻¹, injetor com loop de 0,1 mL e registrador modelo L250E (Knauer[®]), acoplados à coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 (Phenomenex[®]) (25,0 cm x 10,0 mm) e ao detector por índice de refração modelo Waters R401 (Millipore[®]). Pré-coluna Phenomenex[®], 2,5 cm x 3,0 mm, de mesma fase da coluna.

-HPLC semi-preparativo, controlado pelo programa D-7000 HSM (Merck[®]), constituído por uma bomba de fluxo máximo 10,0 mL min⁻¹, injetor com loop de 0,2 mL, acoplados à coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 (LiChroCART[®]) (25,0

cm x 10,0 mm) e ao detector de UV-Vis modelo Merck Hitachi L-7420. Pré-coluna LiChroCART[®], 4,0 cm x 4,0 mm, de mesma fase da coluna.

-HPLC semi-preparativo, controlado pelo programa EZChrom elite versão 3.1.4.2412, constituído por uma bomba de fluxo máximo 10,0 mL min⁻¹, injetor com loop de 0,2 mL, acoplados à coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 (Phenomenex[®]) (25,0 cm x 10,0 mm) e ao detector de índice de refração modelo LaChrom L-2490. Pré-coluna Phenomenex[®] Gemini, 4,0 cm x 3,0 mm, de mesma fase da coluna.

-Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11,7 ou 14,1 T (Varian[®] Inova) operando em 500 MHz ou 600 MHz para RMN ¹H e 125 ou 150 MHz para RMN ¹³C. Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ou referenciados de acordo com os picos dos solventes utilizados, sendo para o metanol δ ¹H 3,30/¹³C 49,0, para a piridina δ ¹H 8,70, 7,55 e 7,18/¹³C 149,84, 135,50 e 123,48 e para o DMSO δ ¹H 2,49/¹³C 39,5. As amostras foram dissolvidas em DMSO-d₆ (Sigma Aldrich[®]) ou CD₃OD (Sigma Aldrich[®] ou Merck[®]) ou C₅D₅N (Merck[®]).

-Placas de sílica gel 60 (Merck[®]) (20,0 x 20,0 cm) de fase normal e de fase reversa.

-Placas preparativas de sílica gel 60 (Merck[®]) (20,0 x 20,0 cm x 0,25 ou 0,50 mm).

-Coluna de vidro contendo sílica gel Kieselgel 60 (60-200 mesh), eluídas à pressão atmosférica.

-Coluna de vidro contendo Sephadex LH-20, acoplado à bomba peristáltica (Pharmacia[®]), modelo P1 18-1110-91, conectada à coluna de vidro (100 x 3,0 cm d.i.) e a coletor automático de frações (Pharmacia[®]), modelo RedFrac, com capacidade para 95 frações.

-Balanças analíticas Bioprecisa[®] FA2104N, Libror AEG-45SM Shimadzu[®] e Adventurer Pro AV 264 C Ohaus[®].

-Ultra-som – Lavadora ultra-sônica digital (Sanders Medical[®], Soniclean 2PS).

-Centrífuga – CELM[®], COMBATE, rotação 2500 rpm.

-Evaporador rotativo (Heidolph[®], Laborota 4001 – efficient) acoplado a uma bomba a vácuo (Heidolph[®], Rotovac valve control).

-Liofilizador (Savant[®]) com bomba VLP200.

-Estufa Marconi[®].

-Espectrofotômetro (leitor de elisa – Elx800).

-Polarímetro (Perkin Elmer[®]), modelo 241.

CAPÍTULO 1

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA DE *Serjania marginata* Casar. NATIVA DO CERRADO

1 INTRODUÇÃO

O projeto BIOTA/FAPESP (Proc. 2009/52237-9) tem como proposta investigar novas possibilidades de espécies vegetais para o tratamento de doenças crônicas. Baseando-se na indicação popular de que as folhas da *Serjania marginata* são usadas para dores no estômago, optou-se por realizar o estudo fitoquímico e farmacológico dessa planta.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Coleta e processamento do material vegetal

Folhas de *S. marginata* foram coletadas em um fragmento de Cerrado localizado no loteamento S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9", no Assentamento Lagoa Grande, distrito de Itahum, no município de Dourados-MS, a 429 m de altitude. A espécie foi identificada por Arnildo Pott e as exsiccatas depositadas nos Herbários CGMS (Campo Grande-MS) (n° 41054) e BOTU (Botucatu-SP) (n° 27797).

A coleta das folhas foi realizada em fevereiro de 2011, antes do florescimento da planta. As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 37±2°C e trituradas em moinho tipo Wiley com peneira de 10 mesh, fornecendo 3380,0 g de pó.

2.2 Etapa química

2.2.1 Extração

O extrato foi obtido pelo processo de percolação exaustiva (PRISTA *et al.*, 1995). Foram extraídos 500,0 g do pó com 33,0 L de EtOH 70% em 40 dias. Após a extração, o líquido foi rotaevaporado sob pressão reduzida e liofilizado para completa remoção da água. O rendimento foi calculado.

2.2.2 Triagem cromatográfica e prospecção fitoquímica

O extrato EtOH 70% foi submetido à triagem por CCDC (WAGNER & BLADT, 2001), à prospecção fitoquímica, HPLC-PDA e espectrometria de massas, a fim de se determinar a classe de produtos naturais presentes e, conseqüentemente, estabelecer uma estratégia para a separação dos componentes.

Para traçar o perfil por CCDC, 1,0 mg do extrato EtOH 70% liofilizado foi solubilizado em 1,0 mL de EtOH 70% e a solução, utilizada para a realização da triagem. Foram aplicados nas placas cromatográficas o extrato e os padrões rotina e quercetina, para comparação de parâmetro de polaridade. As placas foram eluídas com *n*-butanol:ácido acético:água (4:1:5 v/v/v) e reveladas separadamente com os reagentes Anisaldeído/H₂SO₄, Cloreto Férrico (cloreto férrico 3,0% em etanol), Dragendorff (solução de iodeto de bismuto de potássio), Iodo e NPPEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em MeOH, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol).

Para a prospecção fitoquímica, foram realizados testes em tubos de ensaio para identificação de alcalóides, saponinas, esteróides/triterpenos, flavonoides e taninos (MATOS, 2009).

Para a análise por HPLC-PDA, a amostra foi inicialmente submetida ao *clean up* utilizando-se cartucho de SPE C-18 (50,0 mg). O cartucho foi ativado com 4,0 mL de MeOH e equilibrado com 5,0 mL de MeOH/H₂O (8:2 v/v). A amostra (3,0 mg) foi solubilizada na menor quantidade possível da fase móvel e, posteriormente, submetida à extração em fase sólida, com 5,0 mL da mesma mistura de MeOH/H₂O. A solução obtida foi seca à temperatura ambiente, redissolvida em MeOH/H₂O (8:2 v/v), obtendo-se a concentração de 3,0 mg mL⁻¹ e filtrada em filtro 0,45 µm. A amostra foi então submetida à análise, sendo a vazão de fluxo da bomba de 1,0 mL

min⁻¹, a eluição realizada em sistema binário e gradiente de 25,0 a 75,0% de MeOH:H₂O, acidificada com 0,1% de CH₃COOH, o volume da amostra injetado de 50,0 µL e o tempo de análise de 45 min.

Por fim, realizou-se injeção direta (FIA-ESI-IT-MS, modo positivo) para obtenção dos espectros de massas, sendo que, para os picos majoritários, foram realizados experimentos MSⁿ, a fim de se obter maiores informações sobre as estruturas das substâncias presentes no extrato. A amostra foi submetida ao *clean up* seguindo metodologia descrita no parágrafo anterior.

2.2.3 Fracionamento do extrato EtOH 70%

O fracionamento do extrato EtOH 70% da *S. marginata* foi realizado em duas etapas; na primeira (C1), foram solubilizados 3,5 g do extrato em 13,0 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v), centrifugado e o sobrenadante aplicado à coluna de Sephadex LH-20. A amostra foi eluída com o sistema binário MeOH:H₂O (8:2 v/v) e as frações obtidas, analisadas por CCDC. Na segunda, realizou-se uma extração líquido-líquido, em que 5,0 g do extrato foram submetidos à extração com H₂O:n-butanol (3:7 v/v) e, posteriormente, as frações obtidas foram liofilizadas e os rendimentos calculados. Foram solubilizados 300,0 mg da fração n-butanólica em 3,0 mL de MeOH, a amostra foi aplicada à coluna de Sephadex LH-20 (C2) e a amostra eluída com MeOH. O procedimento foi realizado em quadruplicata, as frações obtidas analisadas por meio de CCDC, reunidas, pesadas e analisadas por RMN ¹H. Na segunda etapa, o estudo detalhado da fração S1(20-21) resultou na caracterização química da substância denominada FEN-F (6,0 mg).

2.2.4 *Clean up* das frações

Cartucho de SPE C-18 (50,0 mg) foi ativado com 4,0 mL de MeOH e equilibrado com 5,0 mL de MeOH/H₂O 8:2 ou 9:1 v/v, dependendo das características químicas de cada fração. A amostra foi solubilizada na menor quantidade possível da fase móvel e, posteriormente, submetida à extração em fase

sólida com 5,0 mL da mesma mistura de MeOH/H₂O. A solução obtida foi seca à temperatura ambiente e redissolvida em MeOH/H₂O (8:2 ou 9:1 v/v), utilizando-se a proporção de 100,0 mg mL⁻¹ e, as soluções obtidas, filtradas em filtro de PTFE 0,22 µm.

2.2.5 Purificação das frações

As frações S1(9-10) (269,0 mg), S1(11) (130,0 mg) e S1(15-16) (182,0 mg), obtidas da C2, foram submetidas ao fracionamento por Cromatografia de Coluna de Sílica Gel 60, sendo as frações S1(9-10) e S1(11) eluídas com um sistema binário de CHCl₃:MeOH (80:20 v/v) e, posteriormente, CHCl₃:MeOH (75:25 v/v) e a fração S1(15-16) com um sistema ternário de CHCl₃: MeOH:H₂O (65:30:5 v/v/v). A fração FS7 (134,0 mg) (C1) foi submetida ao fracionamento por Cromatografia de Permeação em Gel LH-20 sendo a amostra eluída com MeOH. As frações obtidas foram analisadas por meio de CCDC, reunidas e analisadas por espectroscopia de RMN ¹H.

2.2.6 Isolamento e identificação das substâncias químicas

2.2.6.1 Saponinas

A fração S1(11)(5) (7,0 mg), obtida no fracionamento descrito no item 2.2.5 com CHCl₃:MeOH (80:20 v/v), forneceu a substância denominada SAP-E (7,0 mg). As frações S1(9-10)(72:82) (4,6 mg) e S1(9-10)(Limp 75:25) (5,1 mg) foram purificadas por HPLC-RI (C-18, Merck[®]), Acetona:H₂O 6:4 v/v, 2,0 mL min⁻¹) e forneceram a substância denominada de SAP-D (Tr_{subst} = 4,3 min, 2,0 mg, TT_{método} = 9 min). As frações S1(9-10)(60-68) (16,5 mg), S1(11)(42-56) (17,0 mg) e S1(9-10)(43-56) (16,5 mg) foram purificadas por HPLC-RI (C-18, Phenomenex[®]), Acetona:H₂O 6:4 v/v, 2,0 mL min⁻¹); a fração S1(9-10)(60-68) forneceu a substância denominada SAP-A (Tr_{subst} = 10 min, 20,0 mg, TT_{método} = 12 min) e as outras frações forneceram as substâncias denominadas de SAP-B (Tr_{subst} = 7 min, 5,0 mg, TT_{método}

= 12 min) e SAP-C ($T_{r_{subst}} = 12,0$ min, 2,0 mg, $TT_{método} = 14$ min). As estruturas químicas foram propostas por meio de RMN 1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais e espectrometria de massas.

2.2.6.2 Flavonoides

As frações FS7(12-13)(F3-P3) (13,0 mg) e FS7(12-13)(F2-P4) (15,0 mg) foram purificadas por HPLC-RI (C-18, Phenomenex[®], MeOH:H₂O 45:55 v/v, 2,0 mL min⁻¹) e a fração S1(15-16) (6-7) (8,0 mg) por HPLC-RI (C-18, Phenomenex[®], MeOH:H₂O 1:1 v/v, 2,0 mL min⁻¹) e forneceram a substância denominada FEN-A ($T_{r_{subst}} = 16$ min, 10,0 mg, $TT_{método} = 30$ min). As frações FS7(12-13)(F3-P5) (13,0 mg) e FS7(12-13)(F2-P5) (15,0 mg) foram purificadas por HPLC-RI (C-18, Phenomenex[®], MeOH:H₂O 45:55 v/v, 2,0 mL min⁻¹) e forneceram a substância denominada FEN-B ($T_{r_{subst}} = 27$ min, 4,0 mg, $TT_{método} = 30$ min). A fração FS7(12-13)(F2-P2) (5,0 mg) foi purificada em placa preparativa de sílica gel 60 (Merck[®], 0,25 mm), sendo eluída com CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5 v/v/v), fornecendo as substâncias denominadas FEN-C ($R_f = 0,41$, 2,0 mg) e FEN-D ($R_f = 0,25$, 1,0 mg).

Os flavonoides denominados FEN-E e FEN-G foram isolados em uma última etapa do trabalho, na qual se submeteu o extrato (7,0 g) a um novo fracionamento, por coluna de sílica gel 60, utilizando-se CHCl₃:MeOH (85:15 v/v), CHCl₃:MeOH (80:20 v/v) e CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5 v/v/v) como eluentes. A fração F50-56, obtida deste fracionamento, foi recromatografada por sephadex LH-20, sendo a fração F17 denominada de FEN-G (10,0 mg) e, a fração F15, purificada em placa preparativa de sílica gel 60 (Merck[®], 0,25 mm), sendo eluída com CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5 v/v/v), fornecendo o FEN-E (1,0 mg).

As estruturas químicas foram propostas por meio de RMN 1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais e espectrometria de massas.

2.2.6.3 Taninos

As frações FS11 (117,6 mg) e FS13 (55,8 mg), obtidas de C1, foram purificadas por HPLC-RI (C-18, Phenomenex®, MeOH:H₂O 4:6 v/v acidificada com 0,1% de CH₃COOH, 2,0 mL min⁻¹). A fração FS11 forneceu a substância denominada TAN-C (Tr_{subst.} = 7,0 min, 17,0 mg, TT_{método} = 17,0 min) e a FS13, TAN-A (Tr_{subst.} = 11 min, 8,0 mg, TT_{método} = 16 min) e TAN-B (Tr_{subst.} = 14 min, 9,0 mg, TT_{método} = 16 min). As estruturas químicas foram propostas por meio de RMN ¹H e ¹³C, incluindo técnicas bidimensionais e espectrometria de massas.

2.2.7 Hidrólise ácida

2.2.7.1 Fração de saponinas

Uma fração enriquecida de SAP-A (30,0 mg) foi submetida a um refluxo com HCl (1,0%, 5,0 mL) a 80°C por 3 h. A extração da fase orgânica foi realizada com acetato de etila (5,0 mL) por três vezes, sendo, esta fase, utilizada para obtenção da aglicona (7,7 mg). A fase aquosa foi eluída em coluna de amberlite aniônica (IR-45). A amostra (20,0 mg) foi purificada utilizando-se placas preparativas de sílica gel 60 (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 50:25:5 v/v/v), obtendo-se ramnose (0,9 mg, R_f = 0,39), arabinose (2,0 mg, R_f = 0,30) e glicose (1,7 mg, R_f = 0,23), as quais foram identificadas por comparação com padrões destes açúcares.

2.2.7.2 Fração de flavonoides

Para a hidrólise ácida da fração de flavonoides (23,0 mg), realizou-se um refluxo com HCl (1,0%, 2,0 mL) a 80°C por 1 h. A solução obtida foi centrifugada, sendo o precipitado (4,4 mg), a aglicona. O sobrenadante foi eluído em coluna de amberlite aniônica (IR-45) e concentrado. A amostra (11,0 mg) foi purificada por placa preparativa de sílica gel 60 (CHCl₃:MeOH:H₂O, 65:30:5 v/v/v), obtendo-se

ramnose (2,2 mg, $R_f = 0,35$) e glicose (0,9 mg, $R_f = 0,15$), as quais foram identificadas por comparação com padrões destes açúcares.

2.2.8 Atividade óptica

Os açúcares obtidos nas hidrólises ácidas (1,0 mg) foram solubilizados em 1,0 mL de H_2O e as atividades ópticas medidas utilizando-se polarímetro Perkin Elmer, modelo 241 com lâmpada de sódio (589 nm) à temperatura de 20°C.

2.2.9 Quantificação de substâncias marcadoras

Os experimentos foram realizados utilizando-se o Acquity UPLC H-Class e coluna C-18 Acquity UPLC, BEH300, 2,1 x 50,0 mm, 1,7 μm . O solvente foi composto por 0,2 % de ácido fórmico em água (A) e 0,2% de ácido fórmico em MeOH (B), sendo o gradiente de 70,0% B a 25,0% B em 1 min para FEN-B, 20,0% B a 95,0% B em 5 min para SAP-A e 15,0% B a 95,0% B em 5 min para TAN-C. A vazão de fluxo da bomba foi de 200,0 $\mu L \text{ min}^{-1}$, o volume da amostra injetado de 10,0 μL e o tempo de análise de 6 min para FEN-B e SAP-A e 5 min para TAN-C.

O detector de massas foi um Xevo TQD, sendo a aquisição dos dados MRM realizada utilizando-se as transições dos íons 559→395 para FEN-B, 1027→513 para SAP-A e 863→711 para TAN-C, todos no modo negativo. Para FEN-B e TAN-C utilizaram-se a mesma voltagem do capilar (2,8 kV), fluxo de dessolvatação do gás (200,0 $L \text{ h}^{-1}$), temperatura da fonte (150°C) e temperatura de dessolvatação (600°C). Para SAP-A a voltagem do capilar foi de 2,5 kV, 250,0 $L \text{ h}^{-1}$ o fluxo de dessolvatação do gás, 150°C a temperatura da fonte e 550°C a temperatura de dessolvatação.

Foram solubilizados 2,8 mg de FEN-B em 2,0 mL de MeOH, 5,0 mg de SAP-A em 3,0 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v) e 2,0 mg de TAN-C em 1,5 mL de MeOH. As amostra foram diluídas obtendo-se as concentrações de 84,0, 98,0, 112,0, 126,0, 140,0 e 210,0 $\mu g \text{ mL}^{-1}$ para FEN-B, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0 e 100,0 $\mu g \text{ mL}^{-1}$ para SAP-A e 20,0, 40,0, 46,5, 53,0, 60,0 e 100,0 $\mu g \text{ mL}^{-1}$ para TAN-C, para obtenção das linhas de calibração.

Os dados foram processados utilizando-se MassLynx™ com aplicação do TargetLynx™ Application Manager.

2.3 Ensaios biológicos

2.3.1 Animais – Utilizaram-se ratos Wistar machos (180 a 250 g) ou camundongos albinos Swiss machos e fêmeas (25 a 30 g). Os animais foram divididos em grupos (nº máximo de 10 indivíduos), mantidos em gaiolas metabólicas e em sala climatizada sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo de claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi efetuado com ração Presence® e água fornecida *ad libitum* e, quando em jejum, os animais foram privados apenas de ração por um período de no máximo 16 h. Todas as práticas experimentais obedeceram as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e a protocolos experimentais aprovados, previamente, pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP – Botucatu, sob números 359, 360/11 – CEEA.

2.3.2 Estudo de toxicidade - Camundongos machos e fêmeas (n= 7 a 10) receberam, por via oral, $5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$ do extrato de *S. marginata* e o grupo controle, salina ($10,0 \text{ mL.kg}^{-1}$). Os parâmetros indicadores de toxicidade (teste hipocrático) foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min após o tratamento, bem como a ocorrência ou não de morte. O peso corporal dos animais foi avaliado por 14 dias; após este período, os animais foram eutanasiados e a variação do peso de alguns órgãos vitais, investigada (CARLINI, 1972; BRITO, 1994).

2.3.3 Estudo de neurotoxicidade - Barra Giratória (Rota-Rod) (DUNHAM & MIYA, 1957, com modificações) - O aparato da barra giratória (Insight®) consiste em um aparelho contendo uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (rpm), separada em 4 compartimentos, permitindo a avaliação simultânea de vários animais. Os animais foram tratados com salina e com o extrato EtOH 70% de *S. marginata* ($5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$) 60 min antes da avaliação. O diazepam ($2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ via intraperitoneal), controle positivo, foi administrado 30 min antes do

início do experimento na barra. Os animais foram colocados na barra giratória (5 rpm) por no máximo 180 s e foram avaliados dois parâmetros: número de queda de cada animal e o tempo da primeira queda.

2.3.4 Mutagenicidade (Teste de Ames)

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. As cepas foram estocadas em viais criogênicos (2,0 mL), com DMSO e mantidas à -70°C, para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30,0 mL de caldo nutriente (Oxoid nº2), incubada a 37°C, por 12-16 h, em shaker incubador (37°C – 160 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁹ bactérias/mL. Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Utilizou-se a fração microsossomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley, a qual revela se a amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada para se tornar mutagênica.

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron & Ames (1983), cinco diferentes concentrações (2,5, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg/placa) do extrato EtOH 70% da *S. marginata*, dissolvidas em DMSO, foram avaliadas. Foram adicionados às concentrações, 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M ou 0,5 mL de 4,0% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias e, então, incubados a 37°C por 20 a 30 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 2,0 mL de top ágar suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeinizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do top ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. Os agentes mutagênicos padrões utilizados em experimentos sem a mistura S9 foram NPD (10,0 µg/placa) para TA98 e TA97a, AZS (1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina C (MMC - 0,5 µg/placa) para TA102. Utilizou-se o 2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/placa) para TA97a, TA98 e TA100 e 2-aminofluoreno (2-AF - 10 µg/placa), para TA102 nos experimentos de ativação

metabólica. DMSO foi utilizado como controle negativo (75,0 µL/placa). O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal versão 1.0, adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a fórmula:

$$IM = \frac{\text{n}^\circ \text{ de revertentes/placa + extrato de } S. \textit{marginata} \text{ (revertentes induzidas)}}{\text{n}^\circ \text{ de revertentes/placa com o controle negativo}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidas e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

2.3.5 Avaliação das úlceras pépticas

2.3.5.1 Úlceras gástricas

2.3.5.1.1 Induzidas por etanol absoluto (ROBERT *et al.*, 1979 com modificações) – Ratos machos (n = 7), distribuídos em 5 grupos, receberam, por via oral, após jejum de 16 h, o extrato de *S. marginata* (125,0, 250,0 e 500,0 mg kg⁻¹), veículo (salina, 10,0 ml kg⁻¹) ou carbenoxolona (100,0 mg kg⁻¹). Em seguida receberam 1,0 mL de etanol absoluto e, após 60 min, foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados e abertos ao longo da maior curvatura, prensados entre duas placas de vidro para realização da contagem e avaliação das lesões produzidas.

2.3.5.1.2 Induzidas por indometacina (GUIDOBONO *et al.*, 1997 com modificações) – Ratos machos (n = 7), distribuídos em 5 grupos, receberam, por via

oral, após jejum de 16 h, o extrato de *S. marginata* (125,0, 250,0 e 500,0 mg kg⁻¹), veículo (salina, 10,0 ml kg⁻¹) ou lansoprazol (30,0 mg kg⁻¹). Após 30 min, os animais receberam 10,0 mL kg⁻¹ de indometacina e, após 360 min, foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados e abertos ao longo da maior curvatura, prensados entre duas placas de vidro para realização da contagem e avaliação das lesões produzidas.

2.3.5.2 Úlceras duodenais

2.3.5.2.1 Induzidas por cisteamina (SZABO, 1978 com modificações) - Ratos machos (n = 7), distribuídos em 3 grupos, receberam, por via oral, após 2 h de jejum, o extrato EtOH 70% de *S. marginata* (na dose mais efetiva e representativa selecionada em experimentos prévios – 250,0 mg kg⁻¹), veículo (salina, 10,0 mL kg⁻¹) ou lansoprazol (30,0 mg kg⁻¹). Após 30 min, administrou-se, por via oral, duas doses de cloridrato de cisteamina (300,0 mg kg⁻¹), sendo de 4 h o intervalo entre elas. Após 24 h do início do jejum, os animais foram eutanasiados, o duodeno retirado cuidadosamente e cortado longitudinalmente. A área da úlcera duodenal foi contabilizada através de scores, em que 0= ausência de lesão, 1= erosão superficial da mucosa, 2= lesões necrosantes e 3= lesões perfurantes da mucosa.

2.3.6 Mecanismo de ação das úlceras gástricas

2.3.6.1 Avaliação dos parâmetros do suco gástrico pelo modelo de ligadura do piloro - Foi adotado o modelo descrito por Shay *et al.* (1945) com modificações, onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados pelo efeito dos diferentes tratamentos administrados oral e/ou intraduodenalmente, no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico da *S. marginata*. Os animais que receberam o tratamento intraduodenalmente foram anestesiados com Ketamina 0,08 mL/100 g + Xiliasina 0,04 mL/100 g, após 16 h de jejum e sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração das drogas (salina 10,0 mL kg⁻¹, lansoprazol 30,0 mg kg⁻¹, extrato EtOH 70% de *S. marginata* 250,0 mg

kg⁻¹) foi realizada após a amarradura e, decorridas 4 h, os animais foram eutanasiados.

Os animais submetidos ao tratamento oral receberam, inicialmente, os tratamentos citados anteriormente e, após 30 min, foi realizada a ligadura do piloro; decorridas 4 h e 30 min os animais foram eutanasiados. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01 N em bureta digital (modelo EM, Alemanha). A concentração total de ácido foi expressa em mEq/mL/4h e o pH determinado em peagâmetro modelo PA 200 .

2.3.7 Análise estatística - Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes de médias de acordo com cada característica avaliada, todos a 5,0% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Etapa química

3.1.1 Extração

O rendimento do extrato EtOH 70% das folhas da *S. marginata* nativa foi de 32,6%. Esse valor pode ser considerado alto, quando comparado ao de *Serjania erecta* (maceração: extrato clorofórmico 5,6%; extrato metanólico 7,8%; ARRUDA, 2008). Os métodos extrativos e os solventes utilizados nas pesquisas devem ser considerados como uma das causas das diferenças no rendimento. Porém, considerando o rendimento obtido neste trabalho e o objetivo do projeto, a produção de grande quantidade de metabólitos é um importante fator que indica a viabilidade de a planta se tornar um fitoterápico.

3.1.2 Triagem cromatográfica e prospecção fitoquímica

A triagem cromatográfica por CCDC do extrato de *S. marginata* avaliado evidenciou a presença de flavonoides e compostos fenólicos, evidenciadas pelas manchas de coloração amarela e cinza, respectivamente (Figura 5) (WAGNER & BLADT, 2001; KIATKOSKI *et al.*, 2007).

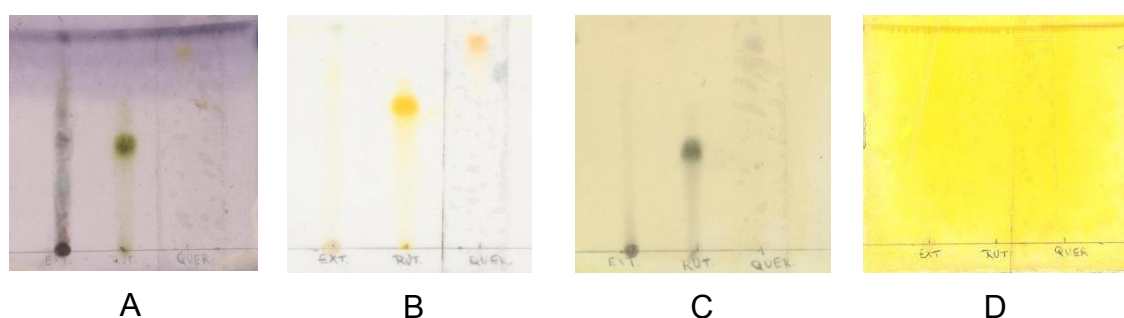


Figura 5 – Triagem cromatográfica por CCDC do extrato EtOH 70% com Anisaldeído/H₂SO₄ (A), NPPEG (B), Cloreto Férrico (C) e Dragendorff (D) (Ext = Extrato EtOH 70%, Rut = Rutina e Quer = Quercetina; Silica gel, Fase móvel: BAW 65:25:15). Fonte: Material fotográfico do autor

Testes em tubos de ensaio demonstraram a presença de flavonoides (coloração de pardo a vermelho), saponinas (formação de espuma persistente), taninos (coloração verde escura) e esteróides livres (coloração verde permanente) (Figura 6) (MATOS, 2009).

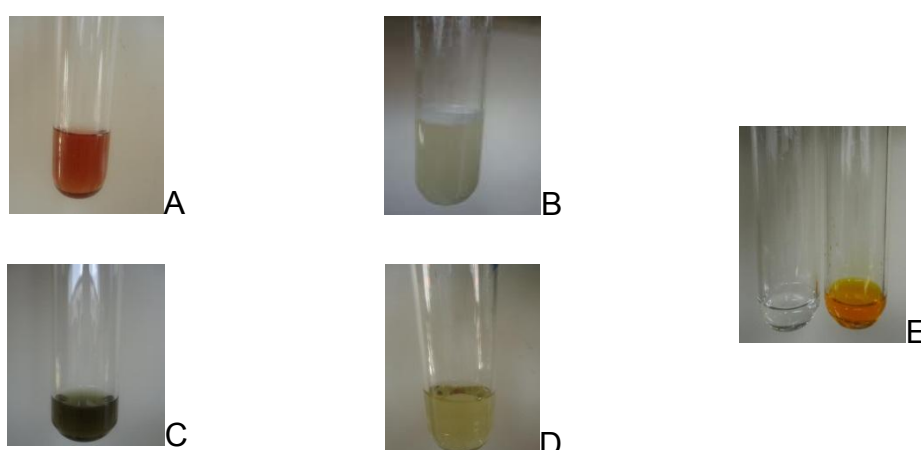


Figura 6 – Testes para determinação de flavonoides (A), saponinas (B), taninos (C), esteróides/triterpenos (D) e alcalóides (E). Fonte: Material fotográfico do autor

A avaliação do perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% por HPLC-PDA (Figura 7) confirmou a complexidade e a diversidade de compostos químicos presentes nesta matriz. Verificou-se a presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos pela presença de espectros com bandas características destas classes.

Os flavonoides (Figura 8A e B) apresentam, no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados em agliconas: a Banda II, com máximo na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e a banda I, com máximo na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (MERKEN & BEECHER, 2000). Os derivados de ácidos fenólicos (Figura 9) apresentam uma única banda de absorção referente ao sistema benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm (STICHER, 2008); Moura *et al.*, (2011) citam derivados de ácidos fenólicos com duas bandas, em 260 e 294 nm, como por exemplo o ácido protocatecuico, que apresenta duas hidroxilas fenólicas.

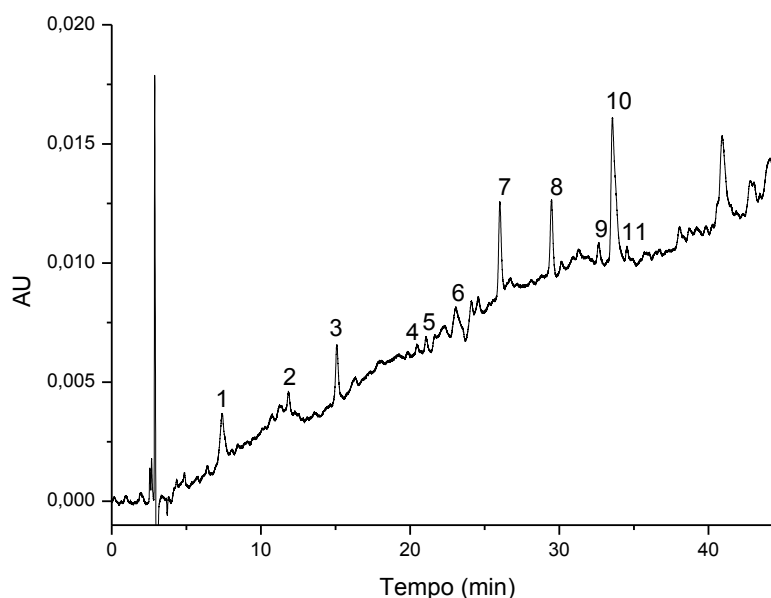
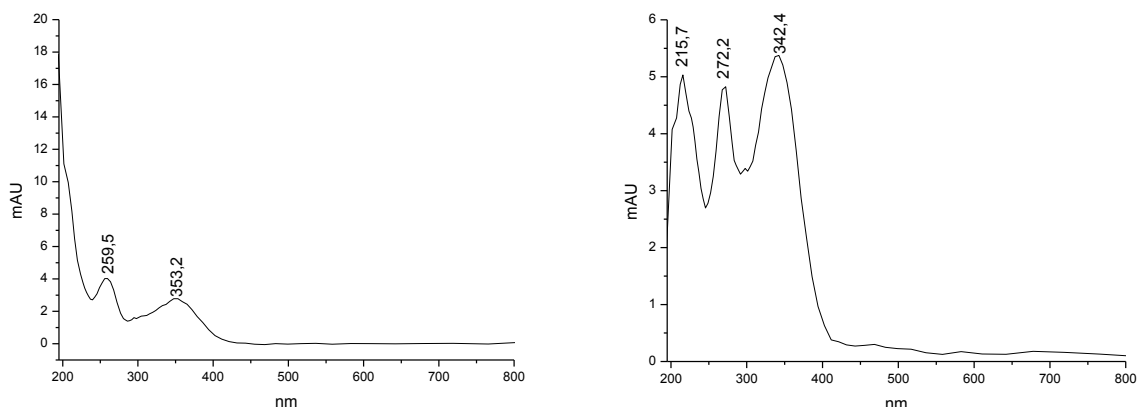


Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% das folhas de *S. marginata* nativa do Cerrado (254 nm).



A

B

Figura 8 – Espectros no UV para os flavonoides destacados no cromatograma da figura 7 (A – Picos 6, 7 e 11, B – Picos 4, 5, 8, 9 e 10).

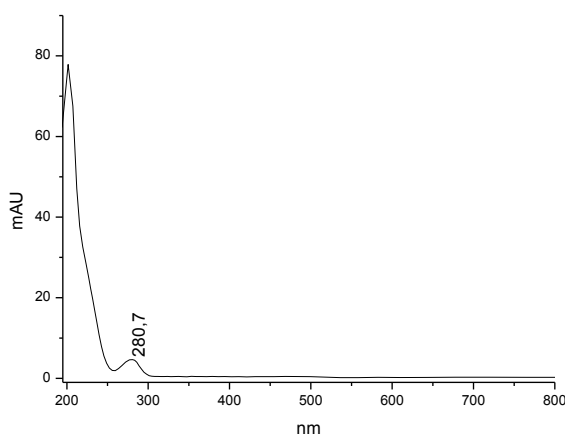


Figura 9 - Espectros no UV para os compostos fenólicos destacados no cromatograma da figura 7 (Picos 1, 2 e 3).

A fim de se ter uma visão mais aprofundada sobre a composição química da espécie, o extrato EtOH 70% de *S. marginata* foi submetido à análises por espectrometria de massas ESI-IT-MSⁿ.

O espectro de massas em *full-scan* do extrato apresenta os íons precursores das moléculas protonadas $[M + H]^+$ (Figura 10). Foi realizado o experimento MS² dos íons mais estáveis, de m/z 1051, 622, 593, 579, 316 e 289.

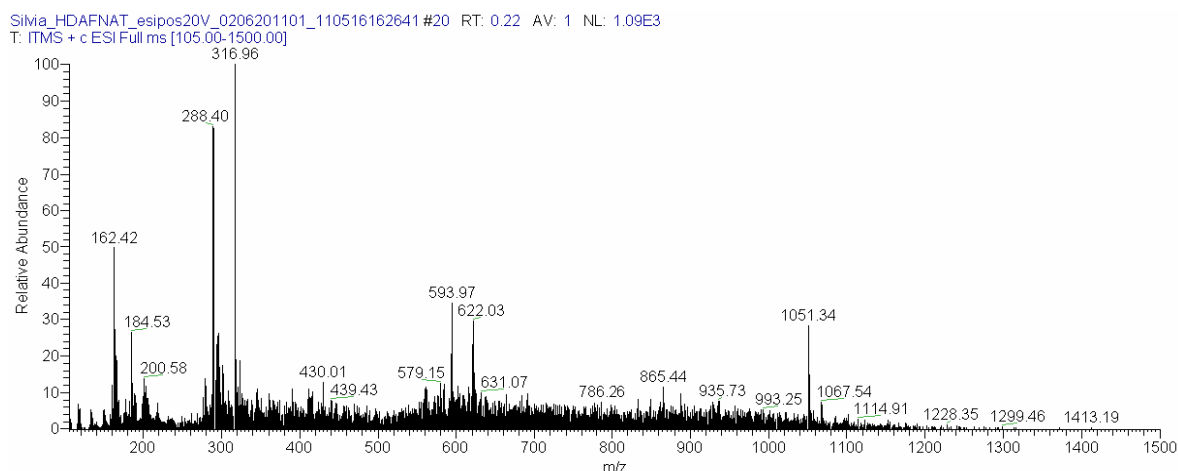


Figura 10 – Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato EtOH 70% de *S. marginata* nativa, modo positivo.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 1051 Da (Figura 11) levou ao íon produto de m/z 919, atribuído à perda de uma pentose $[M-132+H]^+$ e ao íon de m/z 889 $[M-162+H]^+$, atribuído à perda de hexose. O íon de m/z 773 $[M-132-146+H]^+$ evidencia a perda de uma deoxihexose e o íon de m/z 595 pode ser proveniente da aglicona de uma saponina. Com base nesses resultados, pode-se propor a presença de uma molécula contendo uma pentose (Ex.: arabinose) e uma deoxihexose (Ex.: ramnose), além de uma hexose (Ex.: glicose), todas elas comuns em saponinas da família Sapindaceae.

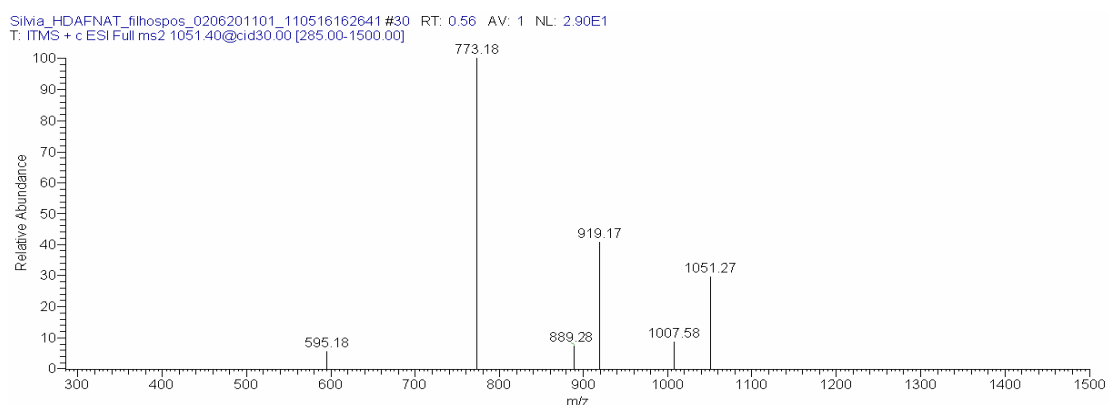


Figura 11 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 1051, modo positivo, energia de colisão de 30%.

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 621 resultou no íon produto de m/z 561 $[M-60+H]^+$ (Figura 12), enquanto que fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 593 resultou no pico base de m/z 533 $[M-60+H]^+$ (Figura 13). Ambos são resultantes da quebra interna de pentoses em ligações C-glicosídicas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Contudo, não foram detectadas outras fragmentações que pudessem auxiliar a propor uma estrutura compatível.

Fragmentação do íon precursor de m/z 579 $[M+H]^+$ resultou nos íons produtos m/z 561 $[M-18+H]^+$, referente à perda de água, m/z 433 $[M-146+H]^+$, perda de deoxihexose e 301 $[M-146-132+H]^+$, referente à perda de uma pentose (Figura 14). Esses resultados são compatíveis com a presença de flavonoides diglicosilados.

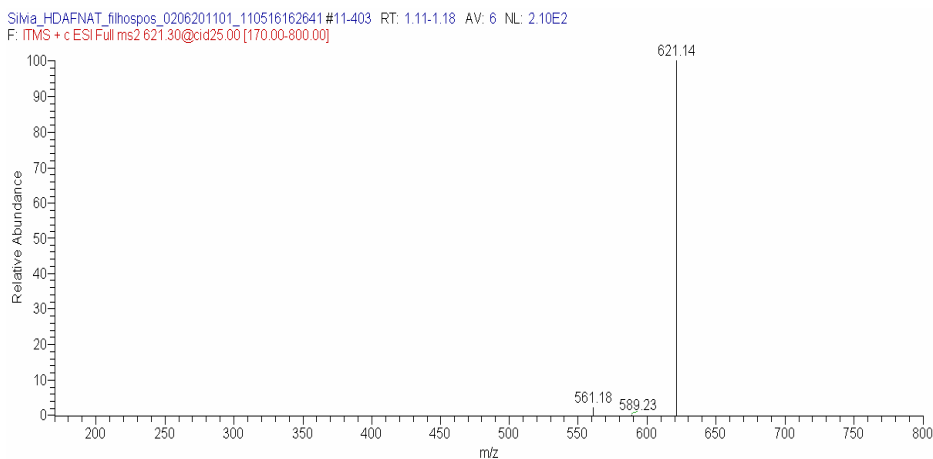


Figura 12 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 621, modo positivo, energia de colisão de 25%.

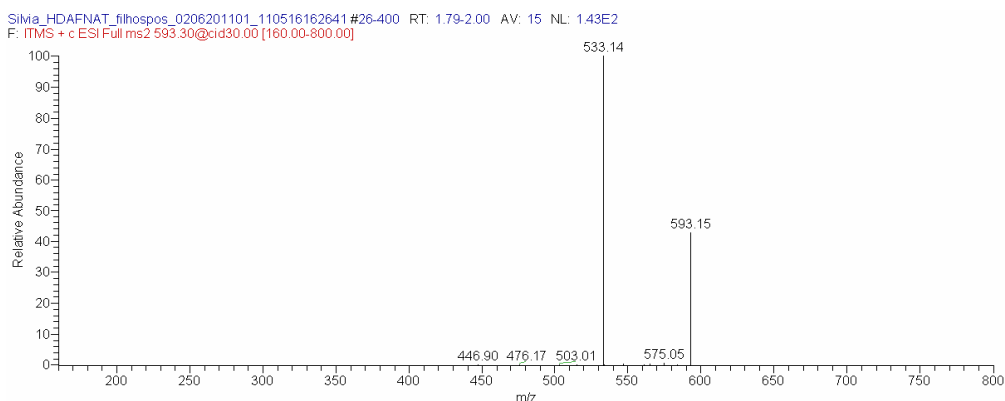


Figura 13 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 593, modo positivo, energia de colisão de 30%.

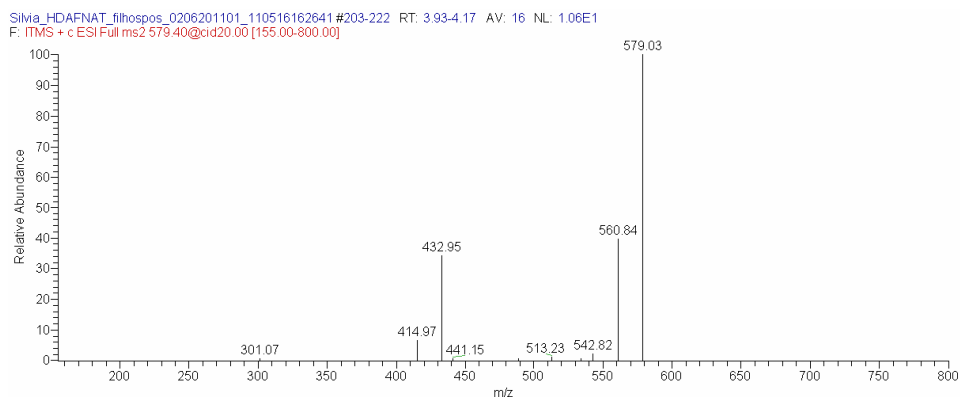


Figura 14 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 579, modo positivo, energia de colisão de 20%.

Fragmentação do íon precursor de m/z 316 $[M+H]^+$, forneceu os íons produtos de m/z 298 $[M-18+H]^+$, referente à perda de água e m/z 106 $[M-210+H]^+$, perdas as quais ainda não foram definidas (Figura 15). Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 289 (Figura 16) gerou os íons produtos de m/z 271 $[M-18+H]^+$, perda de água, m/z 106 $[M-183+H]^+$ e m/z 88 $[M-201+H]^+$, as quais ainda não foram definidas. Contudo, não foram detectadas outras fragmentações que pudessem auxiliar a propor uma estrutura compatível.

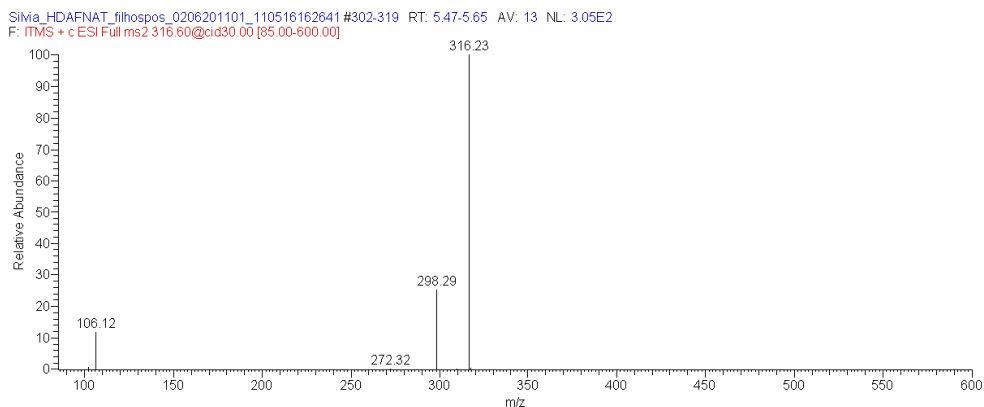


Figura 15 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 316, modo positivo, energia de colisão de 30%.

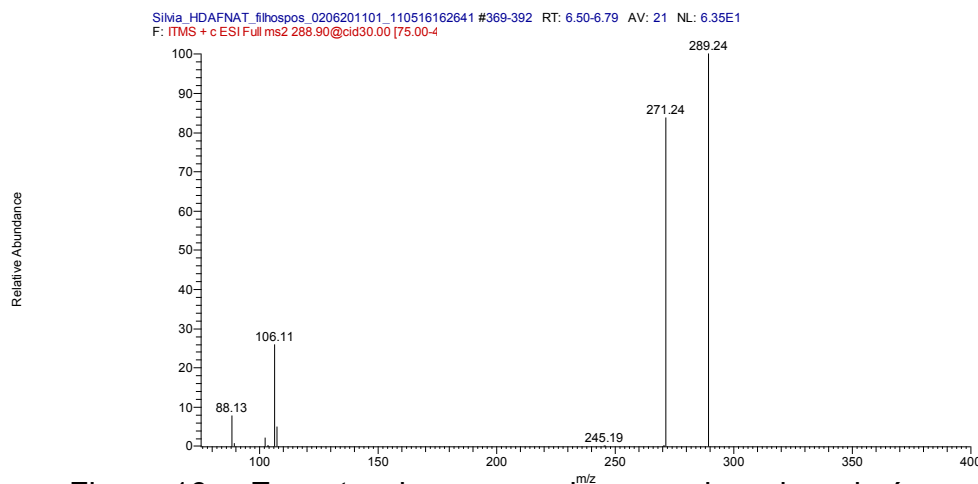


Figura 16 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 289, modo positivo, energia de colisão de 30%.

Os dados encontrados nas análises preliminares corroboram com os citados na literatura em que cita-se que a família Sapindaceae é uma rica fonte de saponinas glicosiladas, flavonoides, taninos, isoprenóides, polifenóis, triterpenos, diterpenos, lecitinas e hidrogéis (GOMES, 2007; ARRUDA, 2008; GUENKA, 2008).

As classes de compostos identificadas na triagem cromatográfica têm diversas propriedades farmacológicas relatadas na literatura. Compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, apresentam propriedades analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, sendo estas, relacionadas a doenças como o câncer e problemas cardiovasculares (AMAROWICZ & PEGG, 2008; IOR *et al.*, 2011). Além disso, os flavonoides possuem propriedades antiviral, antialérgica, antiplaquetária, anti-estrogênica, antiproliferativa, anti-ulcerogênica, antisecretora, antidiarreica, dentre outras (MOTA *et al.*, 2009). Por outro lado, as saponinas são citadas por apresentarem propriedades antifúngicas, moluscidas, antibacterianas, hemolíticas, anti-inflamatórias, antiparasíticas, antitumorais, citotóxicas, antivirais, inseticidas, dentre outras (SPARG *et al.*, 2004; TSUZUKI *et al.*, 2007; DOWD *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2012).

Além das propriedades farmacológicas, os metabólitos secundários desempenham importantes funções ecológicas nos vegetais, sendo que seus grupos quimicamente distintos agem de formas diferentes na defesa vegetal. Da classe dos flavonoides, as flavonas agem na proteção das células contra o excesso

de radiação UV-B (280-320 nm), pois se acumulam na camada epidérmica das folhas e caules e absorvem intensamente a luz na região UV-B, enquanto permitem a passagem contínua dos comprimentos de luz visível (fotossinteticamente ativos). Além disso, foi demonstrado que o aumento da exposição das plantas à luz UV-B resulta na maior síntese de flavonas e flavonóis. Os flavonoides também apresentam atividade de regulação do desenvolvimento vegetal, como moduladores do transporte polar da auxina (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Por outro lado, os taninos são toxinas que reduzem significativamente o crescimento e a sobrevivência de muitos herbívoros, quando adicionados às suas dietas. Da mesma forma, os taninos agem como repelentes alimentares a uma grande variedade de animais. A sua toxicidade é atribuída à capacidade de formar complexos com proteínas de modo não-específico no trato digestivo dos herbívoros, com impacto negativo na nutrição deles. Os taninos podem inativar enzimas digestivas e criar complexos de taninos e proteínas vegetais difíceis de serem digeridos; também servem como defesa ao ataque de micro-organismos, auxiliando na prevenção da decomposição por fungos e bactérias. Por outro lado, os humanos preferem certo nível de adstringência nos alimentos que contêm taninos. Os taninos do vinho tinto impedem a formação de endotelina-1, uma molécula sinalizadora com atividade constritora dos vasos sanguíneos. Daí os benefícios para a saúde, reduzindo o risco de doenças cardíacas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Considerando, portanto, que os constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% de *S. marginata* possuem uma ampla variedade de atividades biológicas comprovadas cientificamente, tornando-se importante objeto de estudo do ponto de vista farmacológico e que esses constituintes têm tamanhos diferentes, o extrato foi submetido ao fracionamento por cromatografia de permeação em gel.

3.1.3 Fracionamento do extrato EtOH 70%

As frações obtidas no primeiro fracionamento (2.2.3) foram analisadas por CCDC, agrupadas em 14 grupos (Figura 17), de acordo com os Rfs das manchas observadas e pesadas, para cálculo do rendimento (Tabela 1).

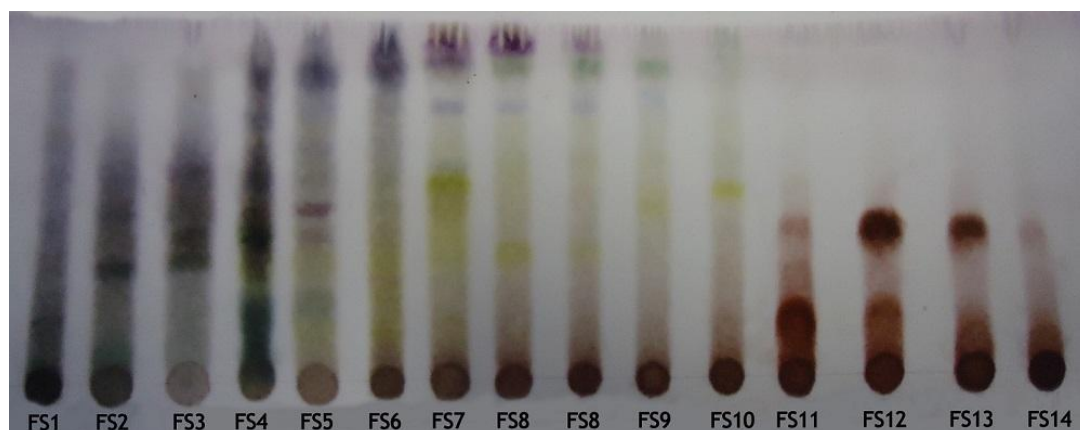


Figura 17 – CCD das frações obtidas no primeiro fracionamento do extrato EtOH 70% de *S. Marginata*.

Tabela 1 – Agrupamento das frações obtidas no primeiro fracionamento do extrato EtOH 70% de *S. marginata* e as respectivas massas.

Grupos (Frações)	Massas (mg)
FS1 (1-21)	154,0
FS2 (22-25)	225,0
FS3 (26-30)	323,2
FS4 (31-37)	250,8
FS5 (38-40)	37,6
FS6 (41-56)	163,9
FS7 (57-74)	162,5
FS8 (75-93)	88,9
FS9 (94-107)	51,0
FS10 (108-204)	183,4
FS11 (205-225)	117,6
FS12 (226-245)	93,7
FS13 (246-260)	55,8
FS14 (261-278)	51,4

No segundo fracionamento (2.2.3), os rendimentos das frações foram de 1,19 g (23,8%) para a fração aquosa (FAQ) e 3,68 g (73,7%) para a fração n-butanólica (FNB), concluindo que grande parte dos compostos foram arrastados para a FNB, porém, fez-se necessário verificar a eficiência da extração visando a seletividade dos compostos de interesse. Para isso, os perfis cromatográficos das frações obtidas, aquosa e n-butanólica, foram traçados e os cromatogramas e os respectivos espectros no UV analisados.

De acordo com a Figura 18, foi possível verificar que houve uma alta seletividade no processo de extração e uma boa separação dos compostos pelo método cromatográfico utilizado. Quando os cromatogramas da FNB (Figura 18) e do extrato (Figura 19) foram comparados, observou-se que todos os picos monitorados no cromatograma do extrato foram evidenciados no da FNB (Picos 4, 8, 11 e 12, Figura 18); por outro lado, observou-se que além da presença de picos bastante resolvidos, houve diversidade de picos na FNB. Identificaram-se derivados de ácidos fenólicos e flavonoides no extrato e nas frações analisadas pela presença de espectros com bandas características destas classes (Figuras 20, 21 e 22) (MERKEN & BEECHER, 2000; STICHER, 2008).

Ao contrário do que foi observado na FNB, constatou-se pequena migração dos compostos para a FAQ (Figura 23), sendo, portanto, esta fração descartada e a FNB selecionada para dar sequência ao isolamento das substâncias presentes na espécie em estudo. A FNB foi, portanto, fracionada, as frações obtidas analisadas por CCDC, agrupadas em 14 grupos, de acordo com os Rfs das manchas observadas e pesadas, para cálculo do rendimento (Tabela 2).

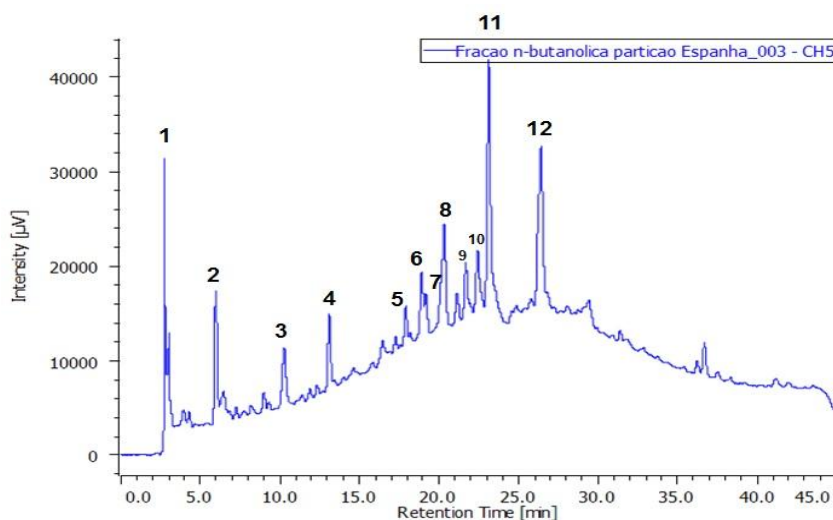


Figura 18 - Perfil cromatográfico da fração n-butanólica (254 nm, 1-12 = Picos monitorados).

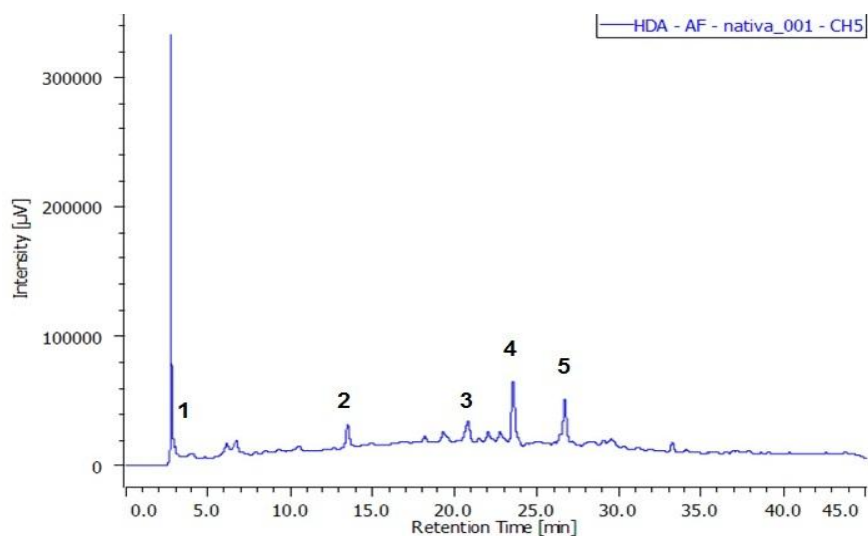


Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% de *S. marginata* nativa do Cerrado (254 nm, 1-5 = picos monitorados).

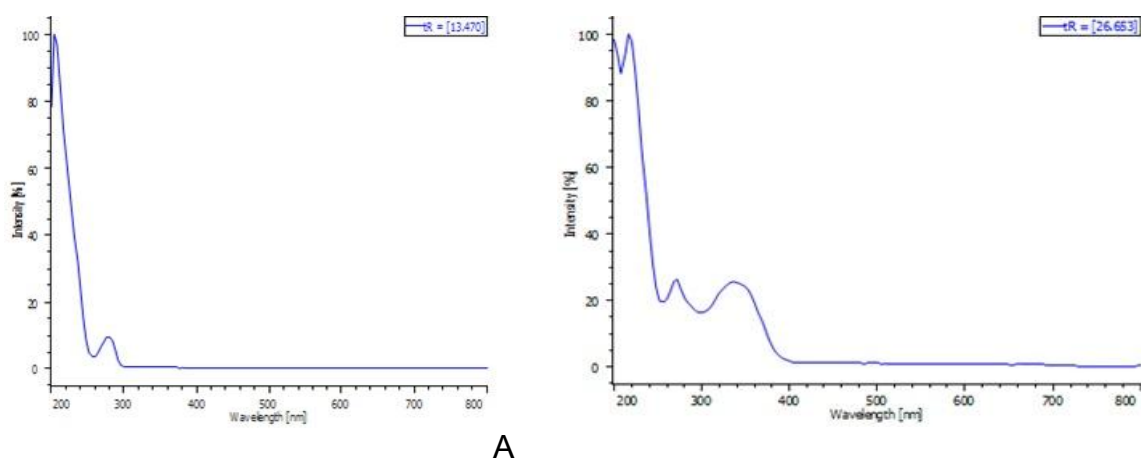


Figura 20 – Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B), destacados no cromatograma da figura 19 (A – Picos 1 e 2, B – Picos 3, 4 e 5).

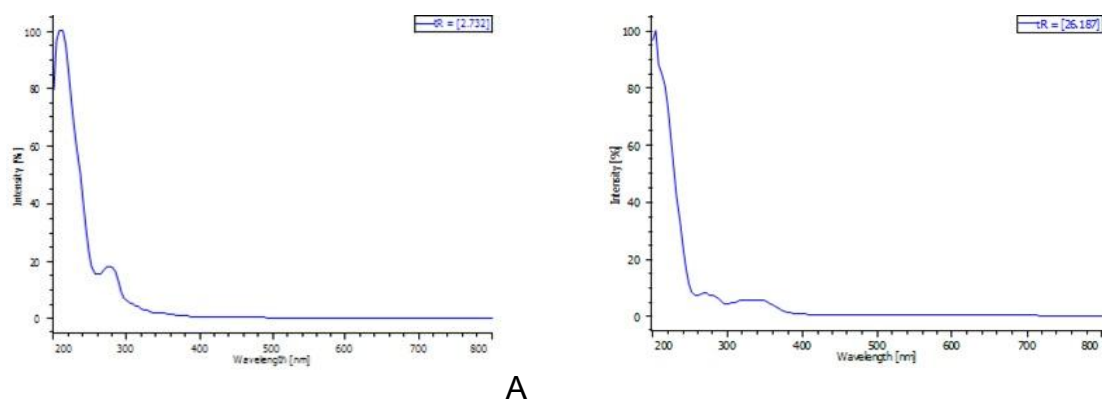


Figura 21 – Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B), destacados no cromatograma da figura 23 (A – Pico 1; B – Pico 2).

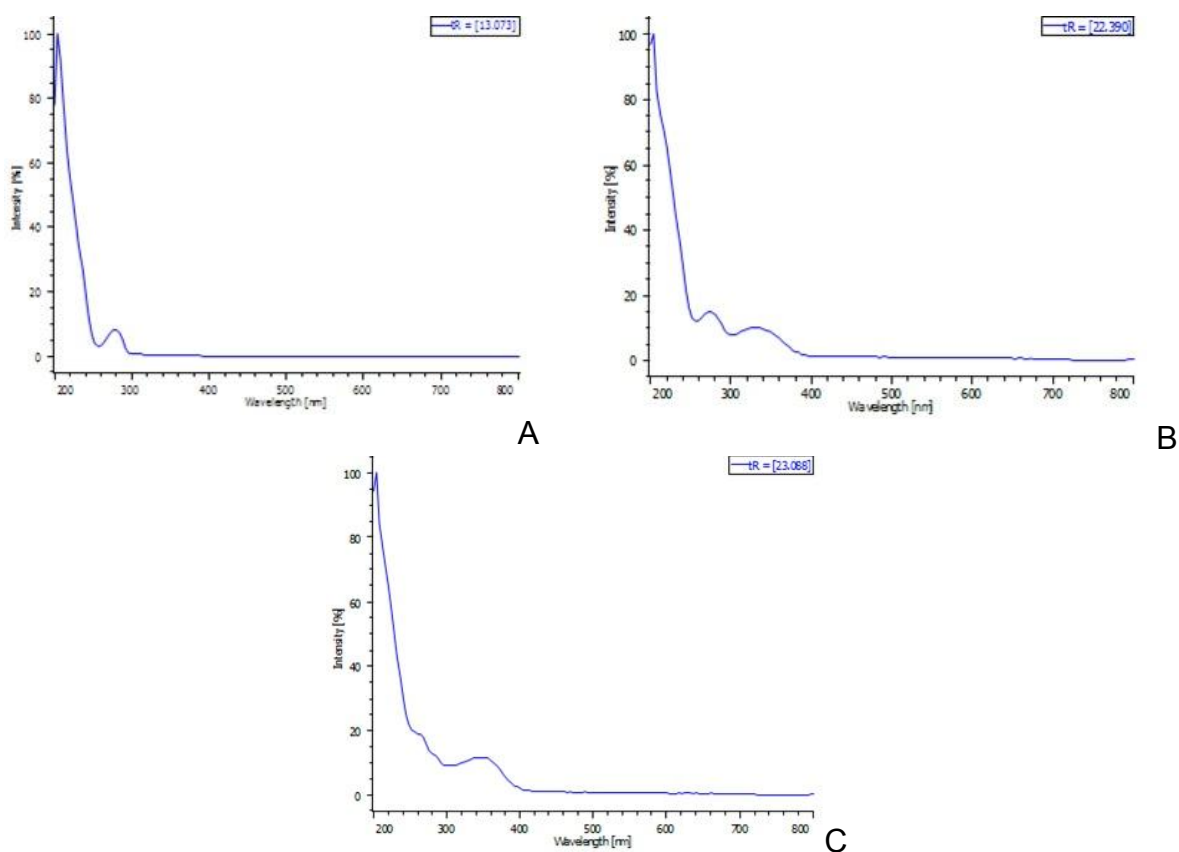


Figura 22 – Espectros no UV para derivados de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B e C), destacados no cromatograma da figura 18 (A – Picos 1, 3 e 4, B – Picos 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12; C – Pico 11).

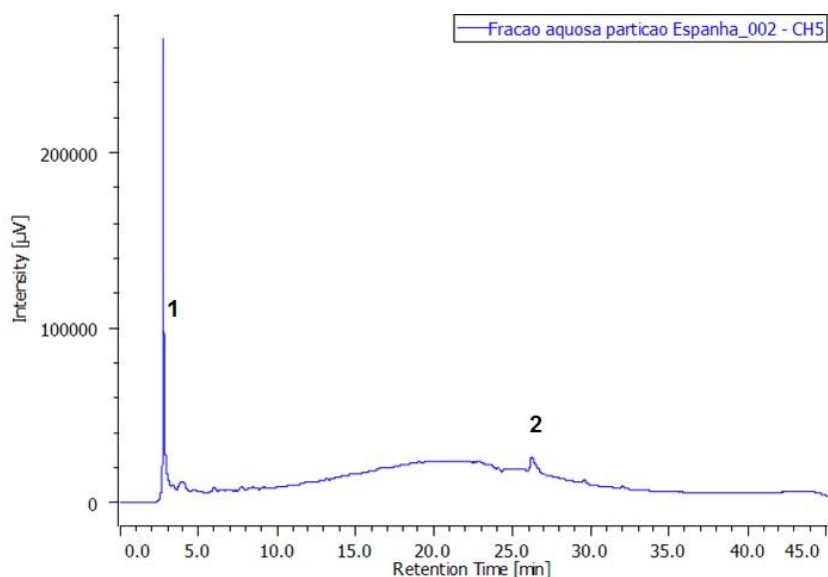


Figura 23 - Perfil cromatográfico da fração aquosa (254 nm, 1-2 = Picos monitorados).

Tabela 2 – Agrupamento das frações obtidas no segundo fracionamento do extrato EtOH 70% de *S. marginata* e as respectivas massas.

Grupos (Frações)	Massas (mg)
S1(1-8)	79,6
S1(9-10)	223,6
S1(11)	196,8
S1(12-14)	177,6
S1(15-16)	81,2
S1(17-19)	108,8
S1(20-21)	72,4
S1(22-23)	37,2
S1(24-26)	37,6
S1(27-28)	19,6
S1(29-32)	61,2
S1(33-36)	39,2
S1(37-43)	38,0
S1(44-50)	26,8

3.1.4 Purificação das frações

Todas as frações obtidas foram analisadas quanto ao peso (Tabelas 3, 4, 5 e 6), perfil cromatográfico e de acordo com os sinais evidenciados nos espectros de RMN ^1H . As frações S1(9-10) (223,6 mg), S1(11) (196,8 mg), S1(15-16) (81,2 mg) e FS7 (162,5 mg) foram selecionadas e submetidas a um segundo fracionamento para posterior isolamento das substâncias químicas.

Tabela 3 – Fracionamento de S1(9-10) e as respectivas massas.

Frações	Massas (mg)
S1(9-10) (1-3)	0,9
S1(9-10) (4)	7,2
S1(9-10) (5)	8,2
S1(9-10) (6)	2,8
S1(9-10) (7)	4,0
S1(9-10) (8-10)	5,3
S1(9-10) (11-14)	5,3
S1(9-10) (15-16)	3,2
S1(9-10) (17-22)	8,3
S1(9-10) (23)	1,3
S1(9-10) (24-34)	9,8
S1(9-10) (35-41)	6,9
S1(9-10) (42)	0,7
S1(9-10) (43-56)	16,9
S1(9-10) (57-59)	4,9
S1(9-10) (60-68)	12,6
S1(9-10) (69-71)	1,6
S1(9-10) (72-82)	4,6
S1(9-10) (Limpeza 75:25)	5,1

Tabela 4 – Fracionamento de S1(11) e as respectivas massas.

Frações	Massas (mg)
S1(11) (1-3)	3,0
S1(11) (4)	3,2
S1(11) (5)	7,0
S1(11) (6)	2,7
S1(11) (7)	0,7
S1(11) (8-9)	8,4
S1(11) (10-16)	3,0
S1(11) (17)	0,5
S1(11) (18-24)	5,1
S1(11) (25-31)	5,4
S1(11) (32-41)	11,5
S1(11) (42-56)	17,0

Tabela 5 – Fracionamento de S1(15-16) e as respectivas massas.

Frações	Massas (mg)
S1(15-16) (1-3)	9,9
S1(15-16) (4)	1,0
S1(15-16) (5)	3,9
S1(15-16) (6-7)	7,2
S1(15-16) (8-9)	4,1
S1(15-16) (10-19)	20,9
S1(15-16) (20-32)	32,5

Tabela 6 – Fracionamento de FS7 e as respectivas massas.

Frações	Massas (mg)
FS7(1-6)	15,0
FS7(7-8)	14,4
FS7(9-10)	39,1
FS7(11)	12,2
FS7(12-13)	30,8
FS7(14-16)	10,0
FS7(17-22)	37,5

3.1.5 Isolamento e identificação das substâncias químicas

3.1.5.1 Saponinas

3.1.5.1.1 Saponina A

A saponina A (SAP-A) é um sólido branco amorfo cuja fórmula molecular é $C_{52}H_{84}O_{20}$, a qual está de acordo com o íon molecular $[M+H+Na]^+$ em m/z 1051,5508 (massa calculada – $1051,5454 \pm 0,0024$) evidenciado no experimento de HRESIMS (Figura 24).

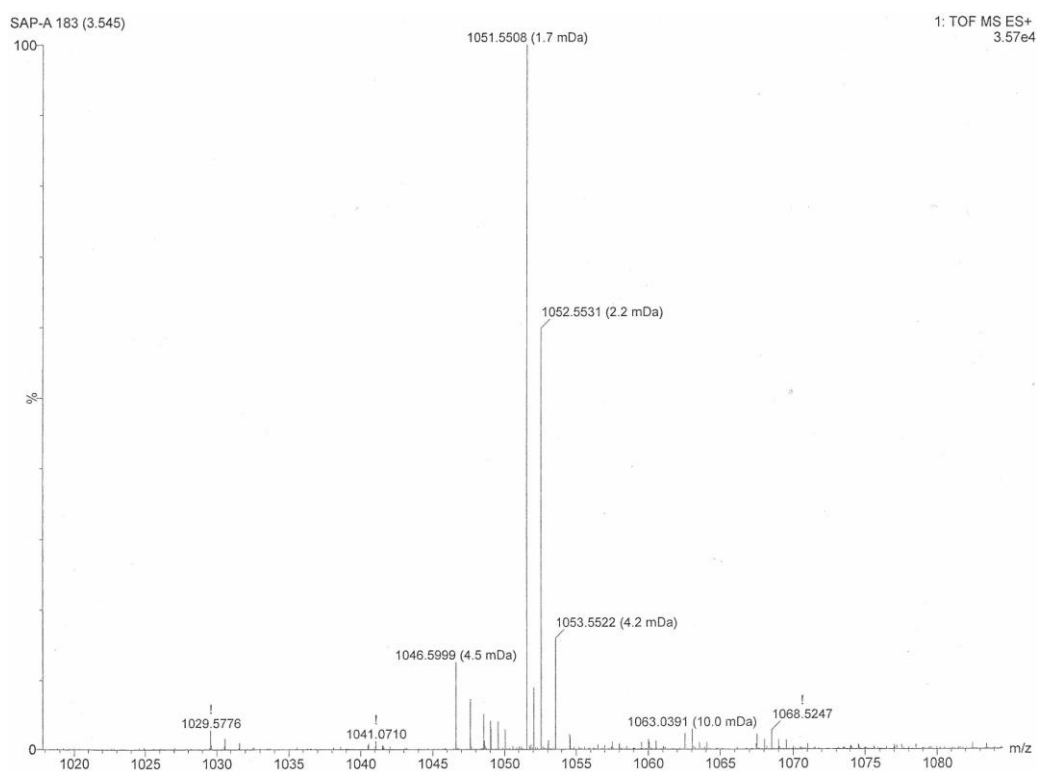


Figura 24 – Espectro de massas da SAP-A.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 25, Tabela 7) evidenciou sinais em δ 6,26 (s), δ 5,30 (d, 7,0 Hz), δ 5,12 (d, 8,0 Hz) e δ 4,74 (d, 6,5 Hz), referentes a hidrogênios anoméricos. Os carbonos anoméricos correspondentes foram observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 26, Tabela 7) em δ 101,4, δ 107,4, δ 106,6 e δ 105,0. Evidenciou-se também a presença de sete singletos entre δ 0,83 e 1,31, característicos de hidrogênios metílicos de um triterpeno. O conjunto desses dados sugere a presença de uma saponina com quatro unidades de açúcares.

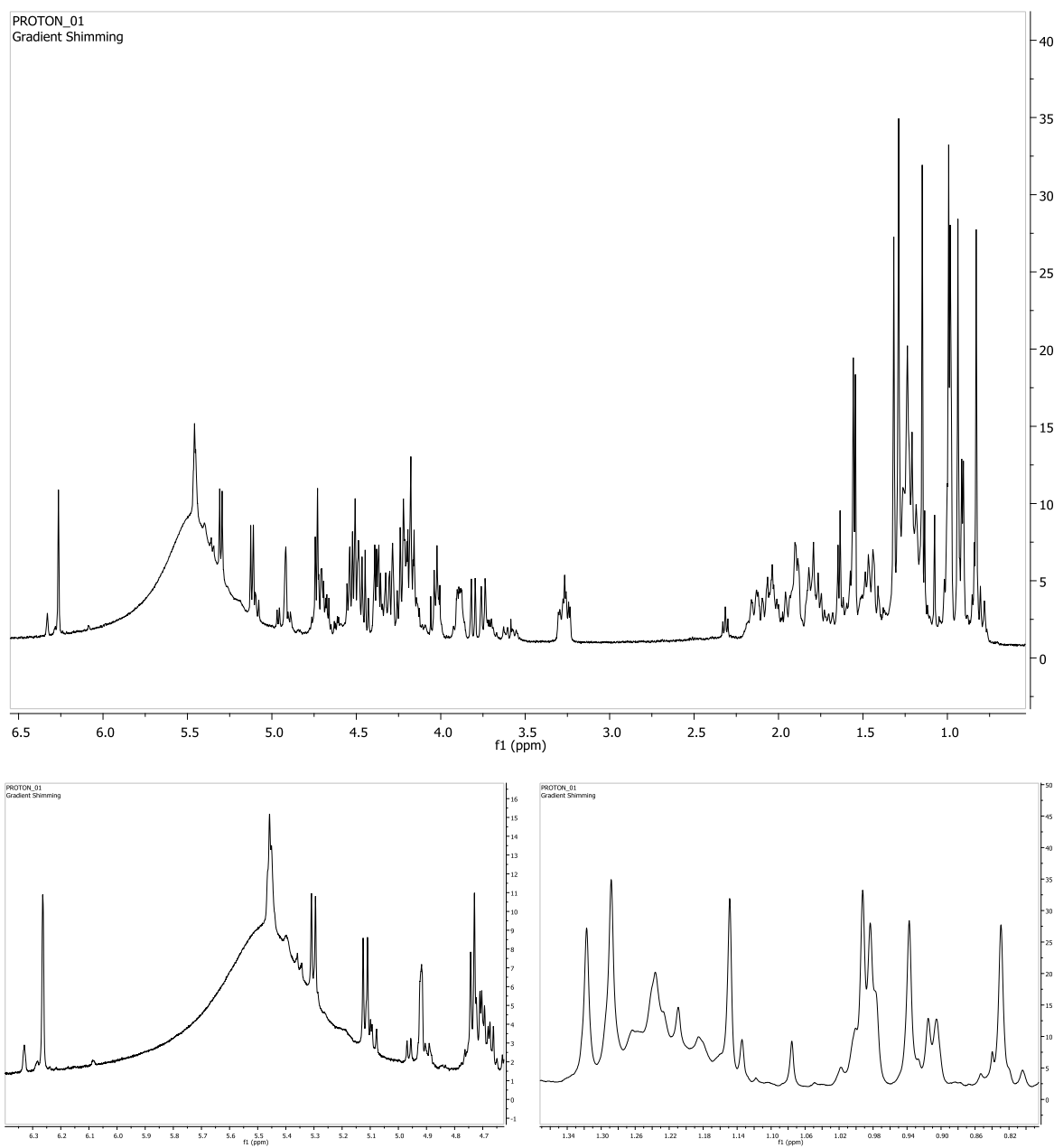


Figura 25 – Espectro de RMN ^1H da SAP-A (3,5 T, Piridina- d_5).

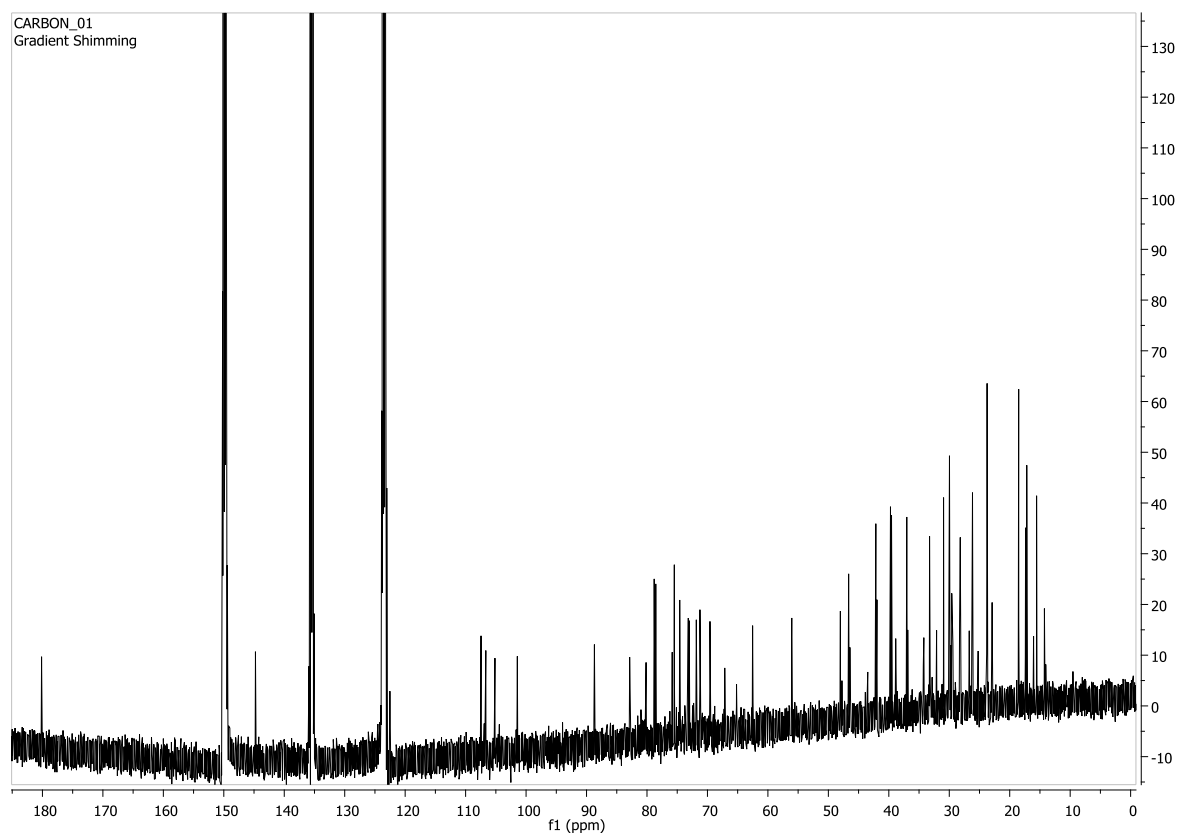


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C da SAP-A (14,1 T, Piridina- d_5).

Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C da substância denominada SAP-A (14,1 e 3,5 T, Piridina-d₅, ppm).

Posição Aglicona	RMN ¹³ C δ/ppm	RMN ¹ H δ/ppm (J/Hz)	Posição Açúcares	RMN ¹³ C δ/ppm	RMN ¹ H δ/ppm (J/Hz)
1ax	38,9	0,91 (o)	Arabinose		
1eq		1,45 (o)	1	105,1	4,74 (d, 6,5)
2ax	26,7	1,80 (o)	2	75,8	4,51 (dd, 6,5 e 8,0)
2eq		2,06 (o)	3	74,7	4,19 (o)
3	88,7	3,25 (dd, 12,0 e 4,5)	4	80,1	4,21 (s/l)
4	39,5	--	5ax	65,2	4,38 (o)
5	56,0	0,79 (dl, 12,0)	5eq		3,74 (dl, 10,5)
6ax	18,5	1,49 (o)	Ramnose		
6eq		1,27 (o)	1	101,4	6,26 (s/l)
7ax	33,2	1,46 (o)	2	71,8	4,92 (s/l)
7eq		1,26 (o)	3	82,9	4,72 (dd, 9,5 e 3,0)
8	39,7	--	4	73,0	4,45 (ddd, 9,5, 9,5 e 2,5)
9	48,0	1,64 (t, 9,0)	5	69,5	4,67 (dq, 9,5 e 6,0)
10	37,0	--	6	18,5	1,55 (d, 6,0)
11	23,6	1,89 (dd, 9,0 e 3,0)	Glicose		
12	122,5	5,46 (t, 3,0)	1	106,7	5,12 (d, 8,0)
13	144,8	--	2	75,5	4,02 (dd, 8,0 e 9,0)
14	42,1	--	3	78,5	4,17 (dd, 9,0 e 9,0)
15ax	28,3	2,16 (ddl, 13,0 e 13,0)	4	71,2	4,24 (dd, 9,0 e 9,5)
15eq		1,17 (o)	5	78,8	3,89 (ddd, 9,5, 5,0 e 2,5)
16ax	23,6	2,10 (ddl, 13,0 e 12,0)	6a	62,5	4,50 (dl, 12,5)
16eq		1,94 (dl, 12,0)	6b		4,38 (dd, 12,0 e 5,0)
17	46,6	--	Arabinose		
18	42,0	3,29 (dd, 14,0 e 4,0)	1	107,4	5,30 (d, 7,0)
19ax	46,4	1,79 (dd, 14,0 e 14,0)	2	73,2	4,53 (dd, 7,0 e 8,5)
19eq		1,27 (o)	3	74,6	4,17 (dd, 8,5 e 3,5)
20	30,9	--	4	69,5	4,28 (s/l)
21ax	34,2	1,43 (o)	5ax	67,1	4,32 (dd, 12,0 e 2,5)
21eq		1,17 (o)	5eq		3,81 (dl, 12,0)
22ax	33,2	2,03 (o)			
22eq		1,80 (o)			
23	28,2	1,32 (s)			
24	17,2	1,15 (s)			
25	15,5	0,83 (s)			
26	17,4	0,99 (s)			
27	26,2	1,29 (s)			
28	180,1	--			
29	33,2	0,94 (s)			
30	23,7	0,99 (s)			

(o) overlap – sinais sobrepostos

Análise conjunta dos espectros de *g*HSQC (Figura 27), *g*HMBC (Figura 28), *g*COSY (Figura 29) e TOCSY 2D (Figura 30) e revisão bibliográfica das substâncias isoladas de *Serjania*, sugeriu que essa molécula possui como aglicona um triterpeno (ácido oleanólico) (Tabela 7) (EKABO *et al.*, 1996; FAN *et al.*, 2010).

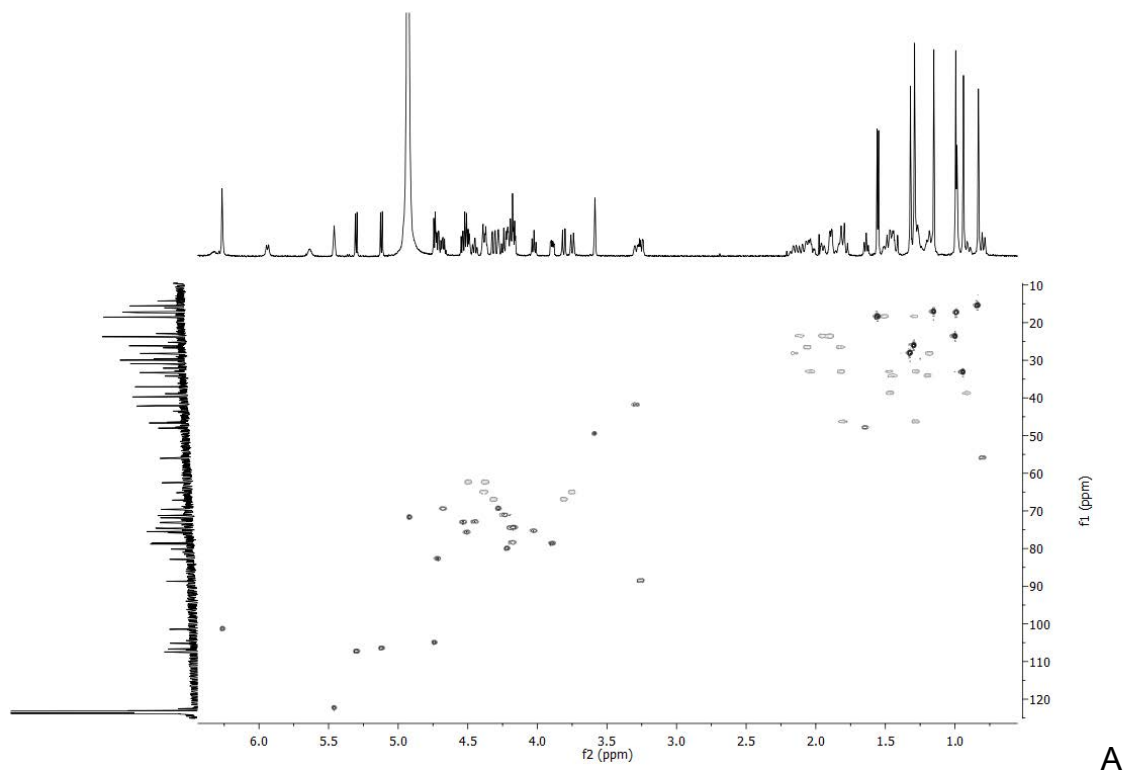


Figura 27 - Espectro de *g*HSQC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-*d*₅) (Continuação).

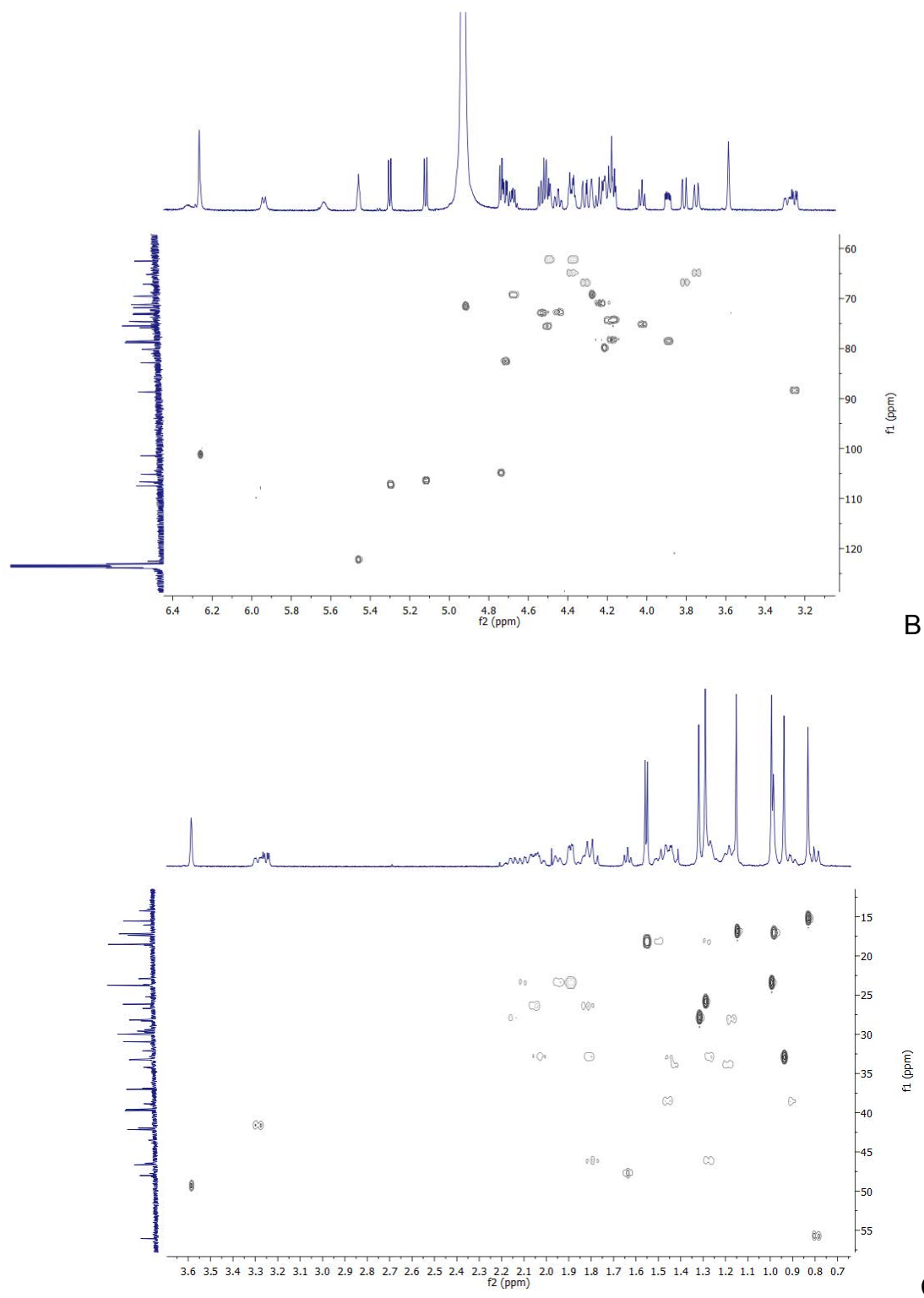


Figura 27 - Figura 27 - Espectro de gHSQC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-*d*₅).

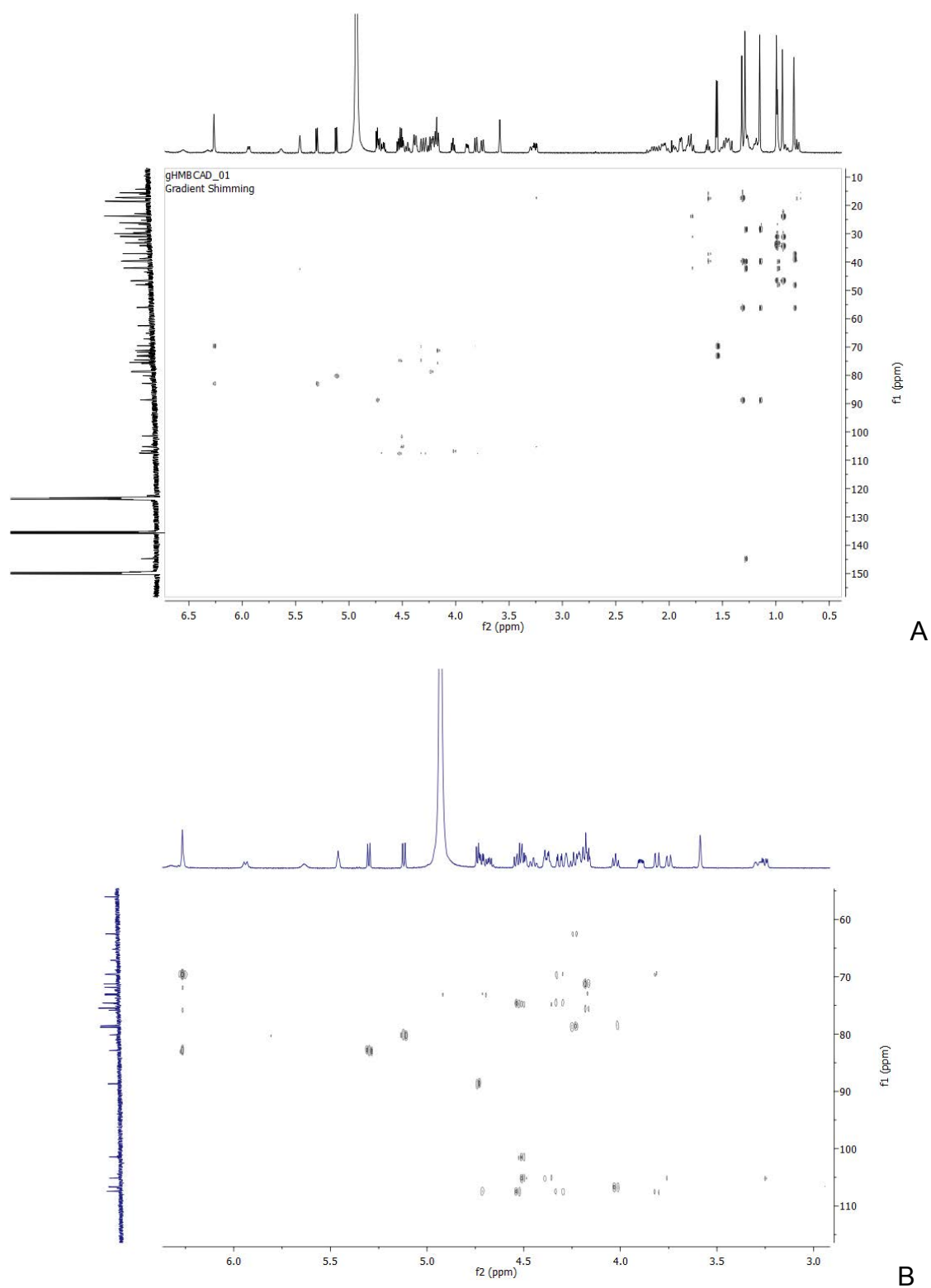
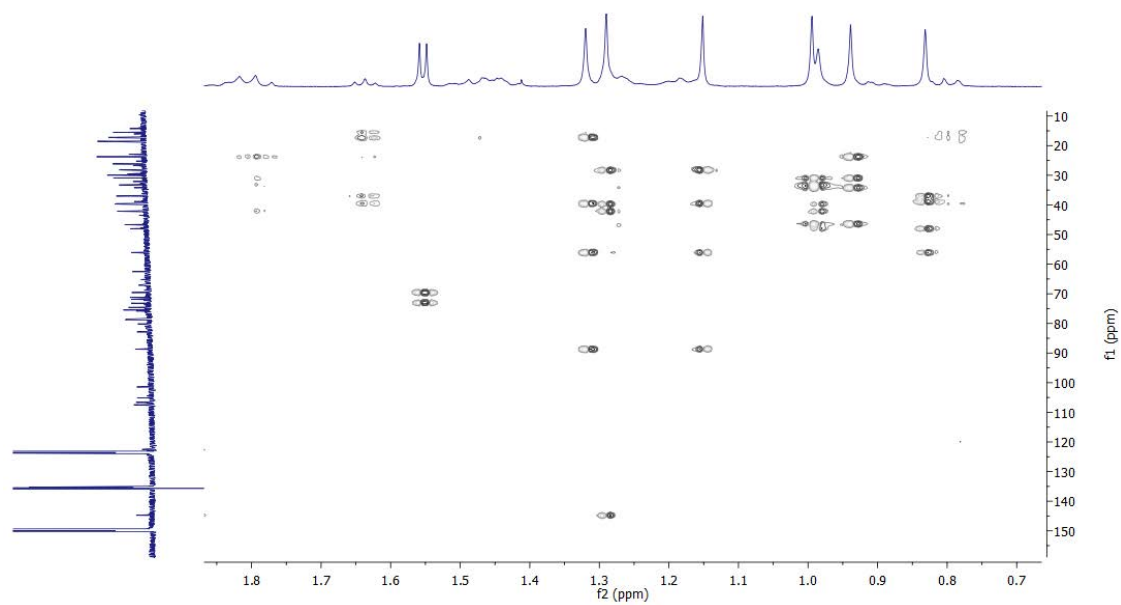
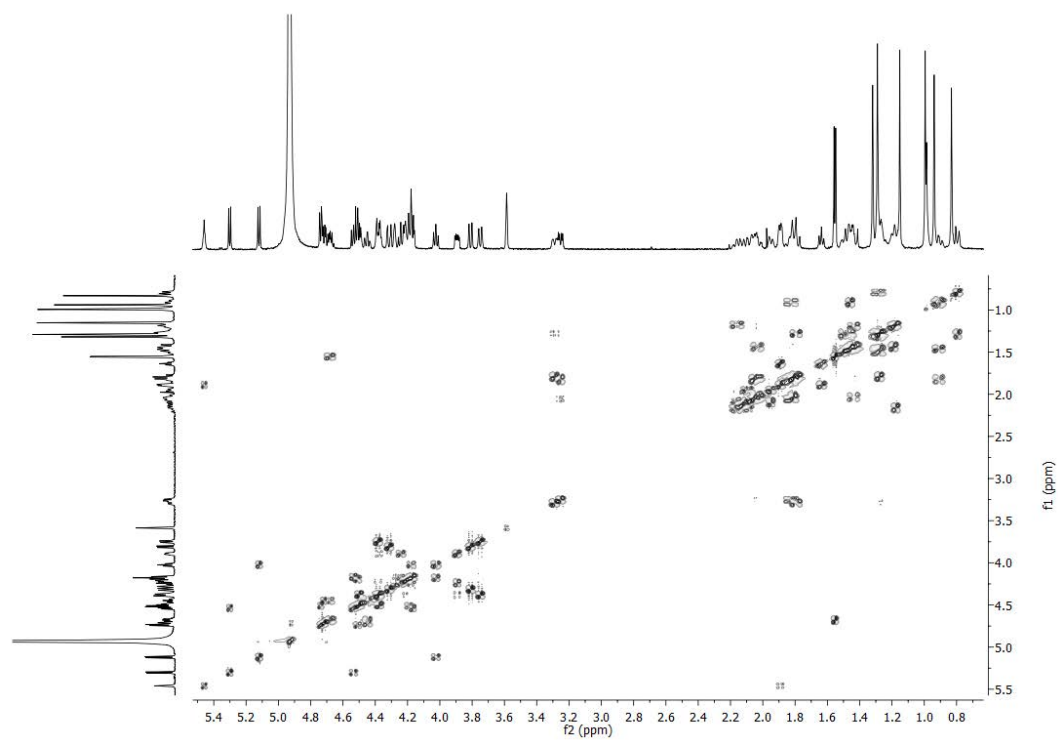


Figura 28 - Espectro de gHMBC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina- d_5) (Continuação).



C

Figura 28 - Espectro de gHMBC da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina- d_5).



A

Figura 29 - Espectro de gCOSY da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina- d_5) (Continuação).

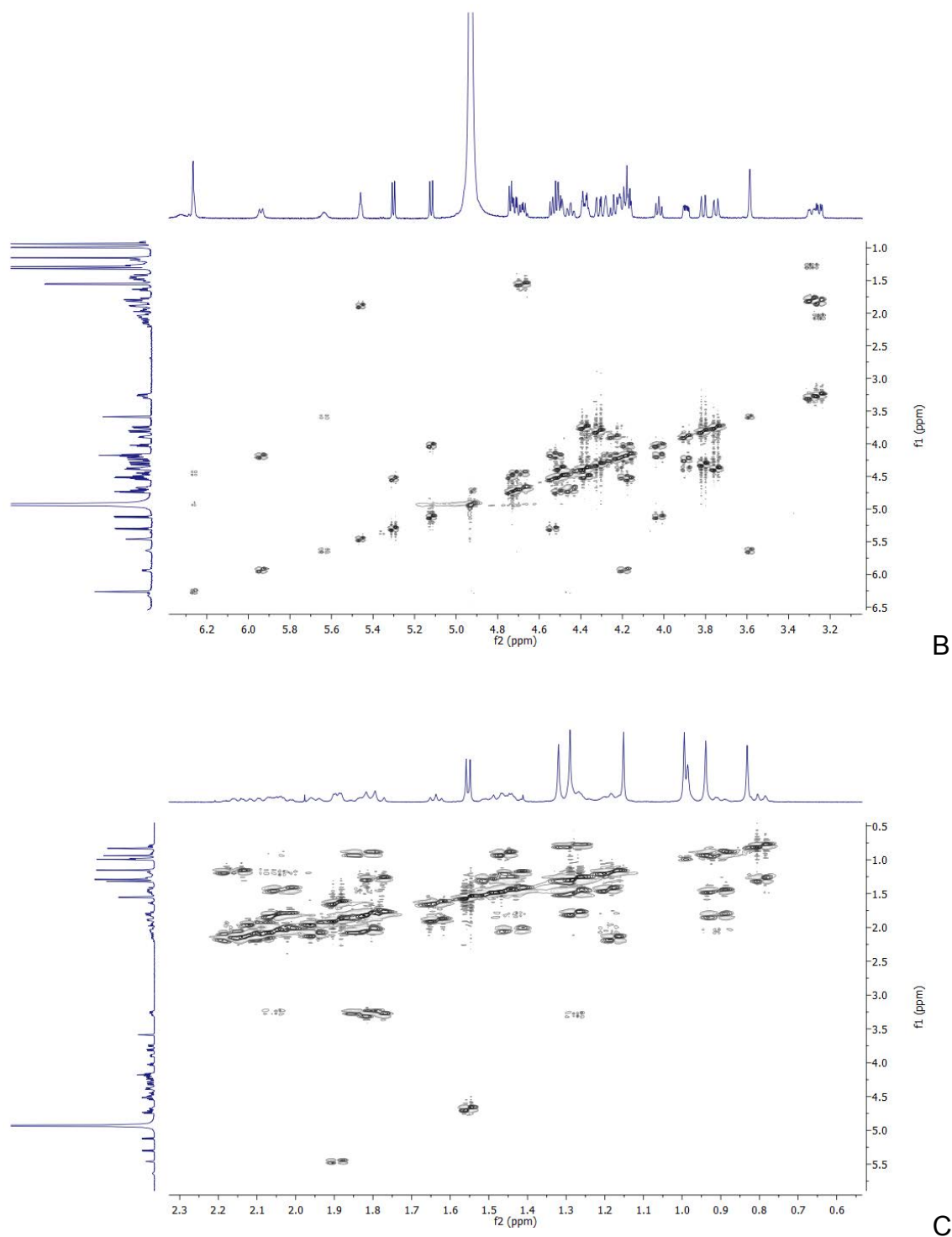
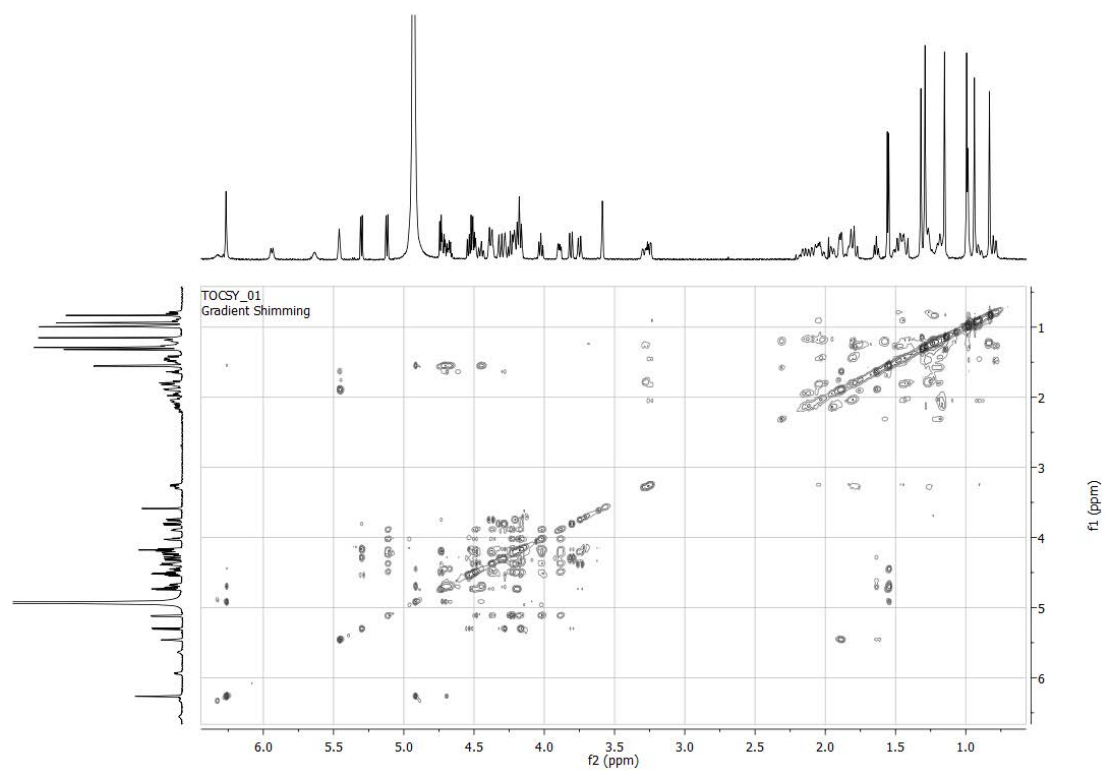
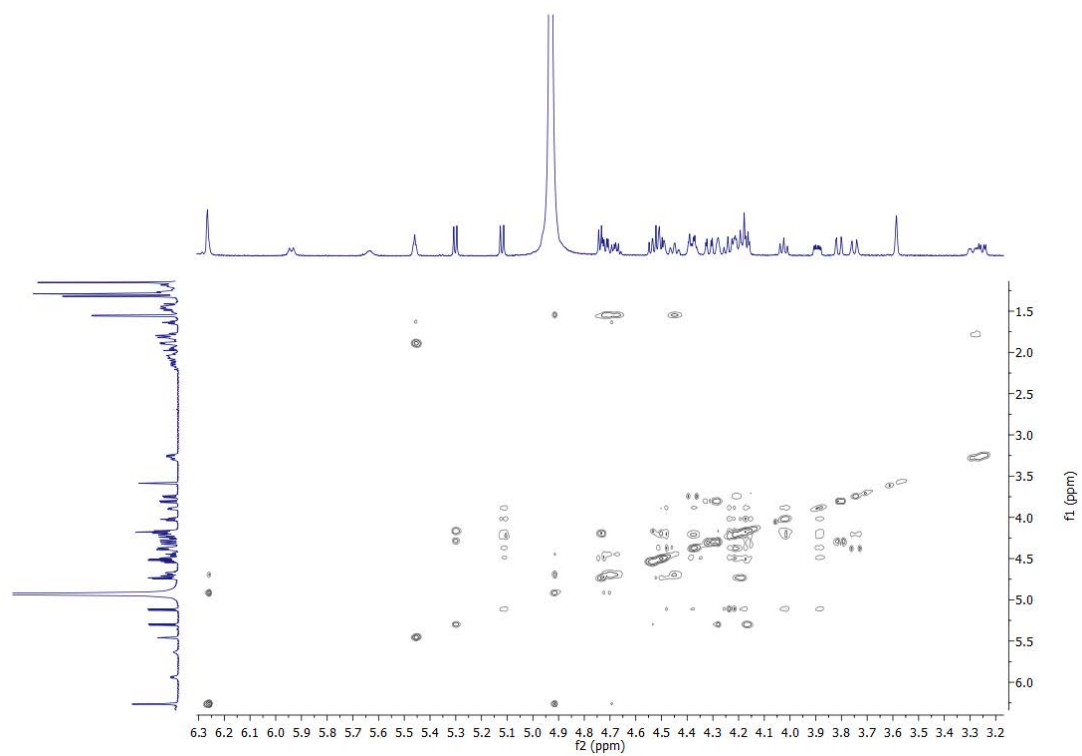


Figura 29 - Espectro de g COSY da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina- d_5).



A



B

Figura 30 - Espectro de TOCSY 2D da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina-*d*₅) (Continuação).

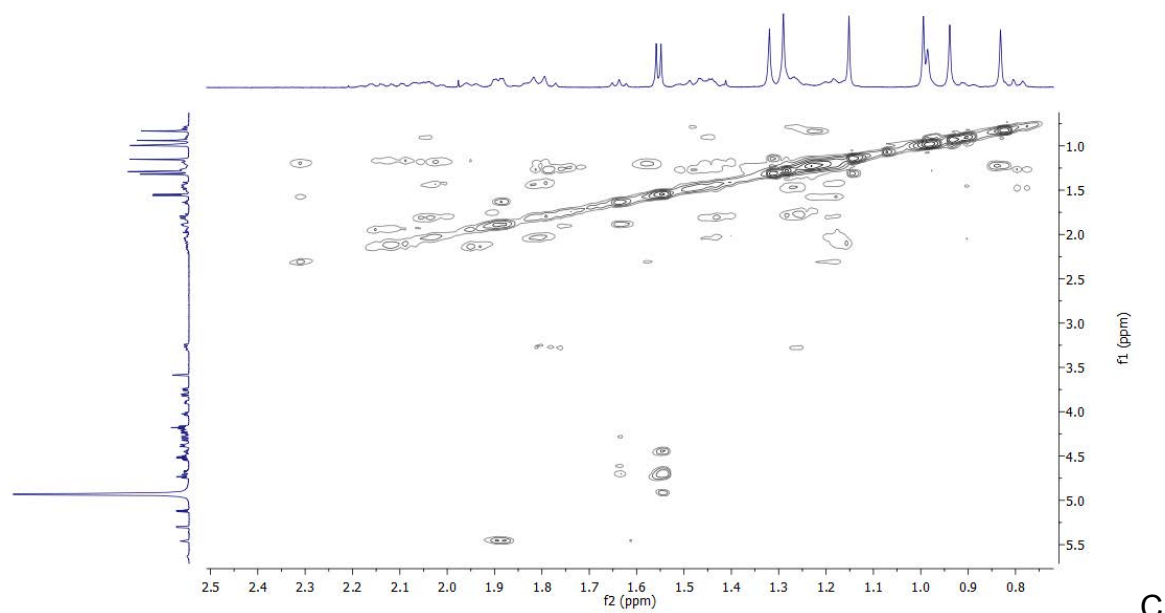


Figura 30 - Espectro de TOCSY 2D da SAP-A (A) e suas respectivas ampliações (B e C) (14,1 T, Piridina- d_5).

Os sinais mais desblindados observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 26) correspondem à presença de um carbono oxigenado (δ 88,7) de uma dupla ligação (δ 122,4 e δ 144,7) e de um grupo ácido (δ 180,1). A desblindagem do H-18 (d , δ 3,29) sugere que o grupo ácido encontra-se na posição 28.

A posição da insaturação foi proposta com base na correlação HSQC entre o C-12 (δ 122,4) e seu respectivo hidrogênio (δ 5,46), o qual, por sua vez, apresenta correlação HMBC com o C-14 (δ 42,3). Além disso, observou-se a correlação HMBC entre o C-13 (δ 144,7) com o H-11 (δ 1,88) e com o H-27 (δ 1,28). A posição do carbono oxigenado (C-3) foi proposta pela correlação HMBC observada entre o H-3 (δ 3,25) com os carbonos metílicos C-23 (δ 28,2) e C-24 (δ 17,2) (Figura 31).

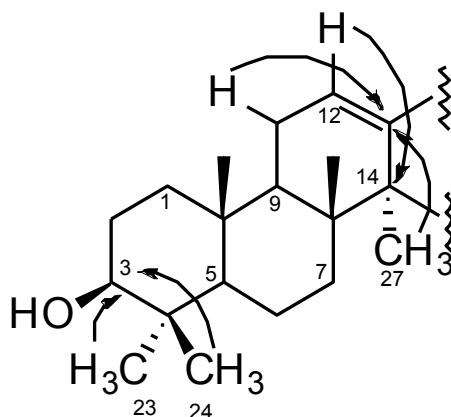


Figura 31 – Correlações HMBC que permitiram localizar o carbono oxigenado e a insaturação na cadeia do ácido oleanólico.

O espectro ROESY-2D (Figura 32) confirmou que a disposição espacial dos anéis é coerente com a de um triterpeno oleânico: Foi possível observar os efeitos NOE dos substituintes em configuração β : entre os hidrogênios metílicos H-25 (δ 0,83) com o H-2_{ax} (δ 1,80), com o H-6_{ax} (δ 1,27), com o H-11_{ax} (δ 1,88) e com os hidrogênios metílicos H-26 (δ 0,98); entre o H-2_{ax} (δ 1,80) com os hidrogênios metílicos H-24 (δ 1,15) e com o H-6_{ax} (δ 1,27); entre os hidrogênios metílicos H-26 (δ 0,98) com o H-11_{ax} (δ 1,88) e com o H-18_{eq} (δ 3,29) e entre o H-12_{ax} (δ 5,46) com o H-18_{eq} (δ 3,29). Observaram-se também as correlações dos substituintes que estão em configuração α : entre o H-5_{ax} (δ 0,79) com a metila H-23 (δ 1,31), com o H-3_{ax} (δ 3,25) e com o H-9_{ax} (δ 1,63); entre o H-1_{ax} (δ 0,89) com o H-9_{ax} (δ 1,63) e entre a metila H-27 (δ 1,28) com o H-16_{ax} (δ 2,09).

O espectro ROESY-2D exibiu também efeito NOE entre o H-18_{ax} (δ 3,29) com a metila H-26 (δ 0,98) e a metila H-30 (δ 0,99), sendo que esta última apresentou efeito NOE com o H-22_{ax} (δ 2,03) Esses dados sugerem a fusão *cis* dos anéis D e E, bem como a configuração β da metila C-30. Além disso, a metila H-29 (δ 0,94) apresentou correlação com o H-19_{ax} (δ 1,79) e com o H-21_{ax} (δ 1,43), evidenciando que possui configuração α . Por fim, a correlação entre o H-3_{ax} (δ 3,25) e H-5_{ax} (δ 0,79) evidenciou que o OH-3 está em posição equatorial.

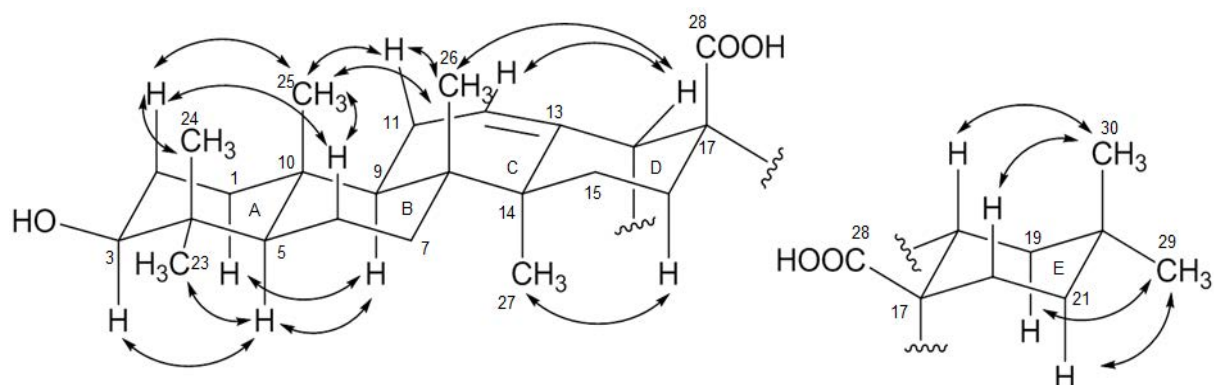
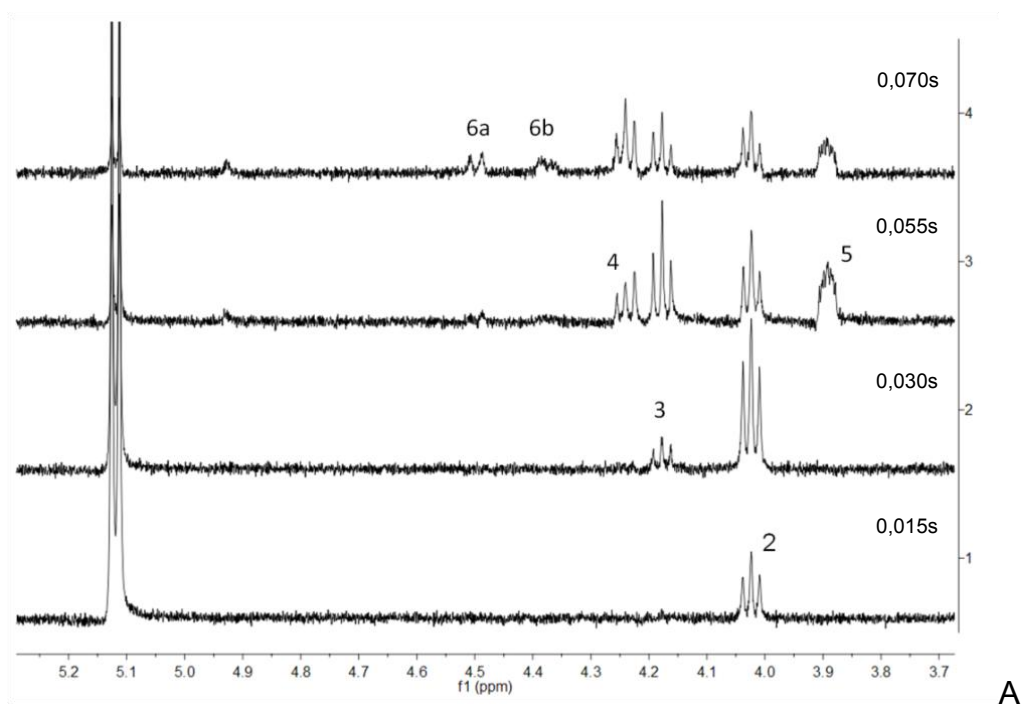
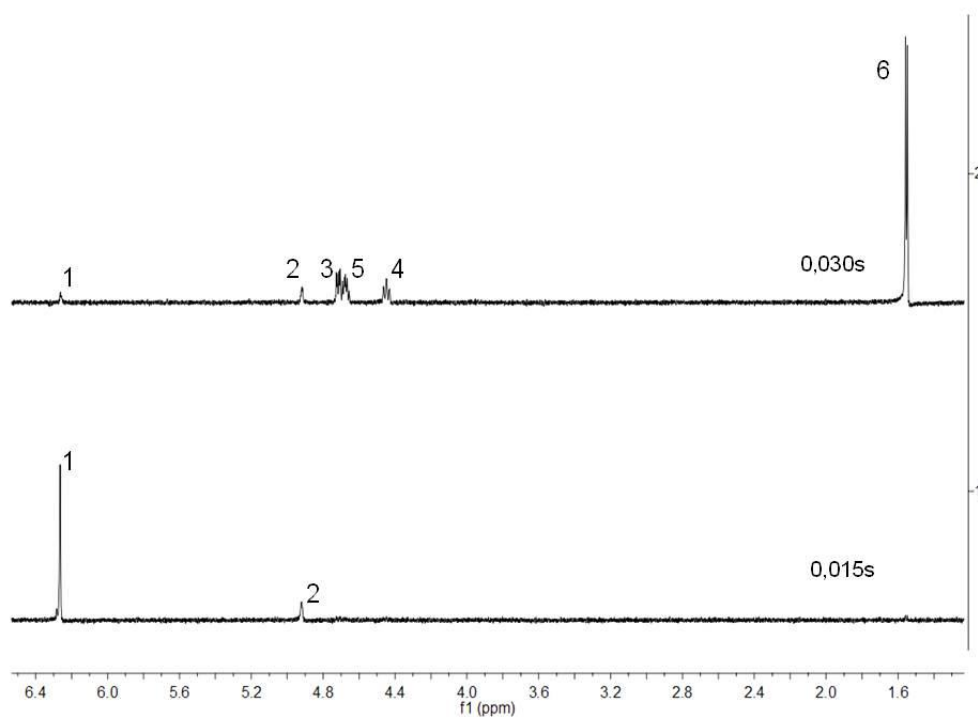


Figura 32 – Correlações mais significativas observadas no espectro de ROESY-2D da aglicona da SAP-A.

Para a elucidação das cadeias glicosídicas, utilizaram-se principalmente os experimentos TOCSY-1D (Figura 33, a-d) e ROESY-1D (Figura 34, a-d) (Tabela 7), que permitiram identificar unidades de β -glicose, α -ramnose e α -arabinose (MACÍAS *et al.*, 2007; GHEYSEN *et al.*, 2008).

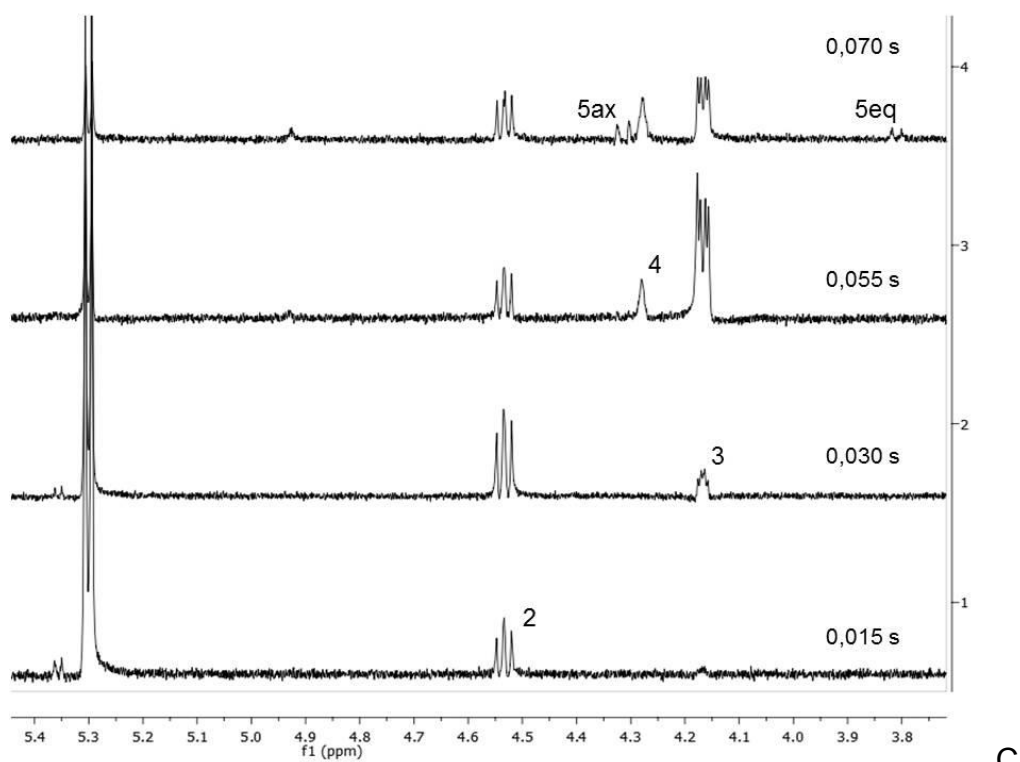


A

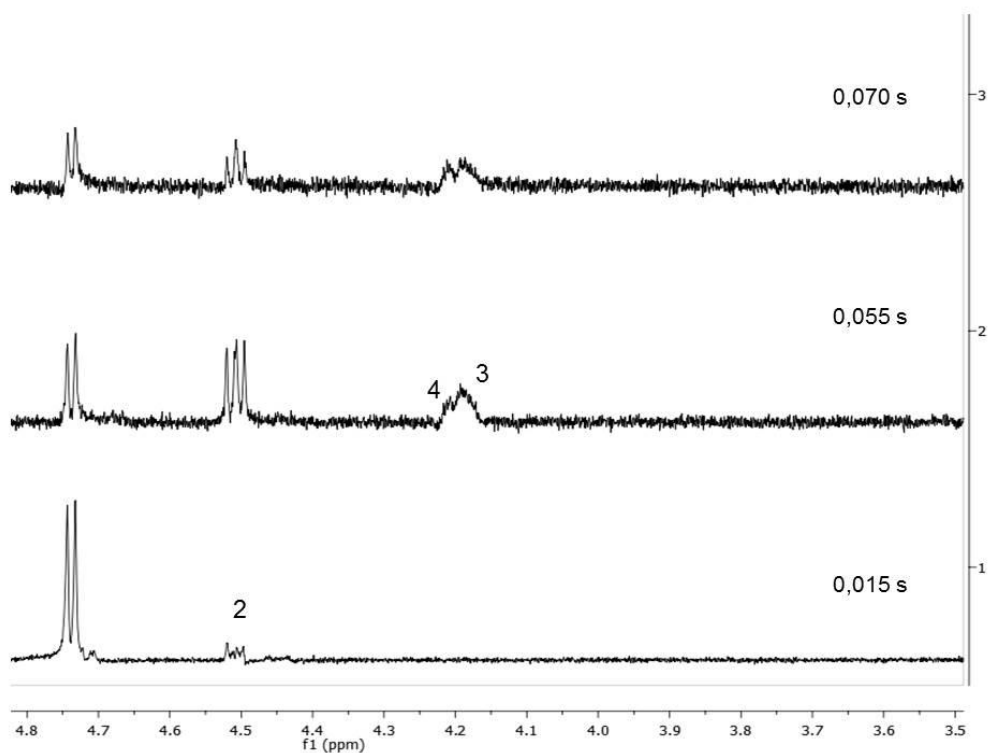


B

Figura 33 – Espectros TOCSY-1D. A) β -glicose (irradiação em $\delta 5,12$); B) α -ramnose (irradiação em $\delta 6,26$ e $\delta 1,55$); C) α -arabinose (irradiação em $\delta 5,30$) e D) α -arabinose (irradiação em $\delta 4,74$) (Continuação).



C



D

Figura 33 – Espectros TOCSY-1D. A) β -glicose (irradiação em δ 5,12); B) α -ramnose (irradiação em δ 6,26 e δ 1,55); C) α -arabinose (irradiação em δ 5,30) e D) α -arabinose (irradiação em δ 4,74).

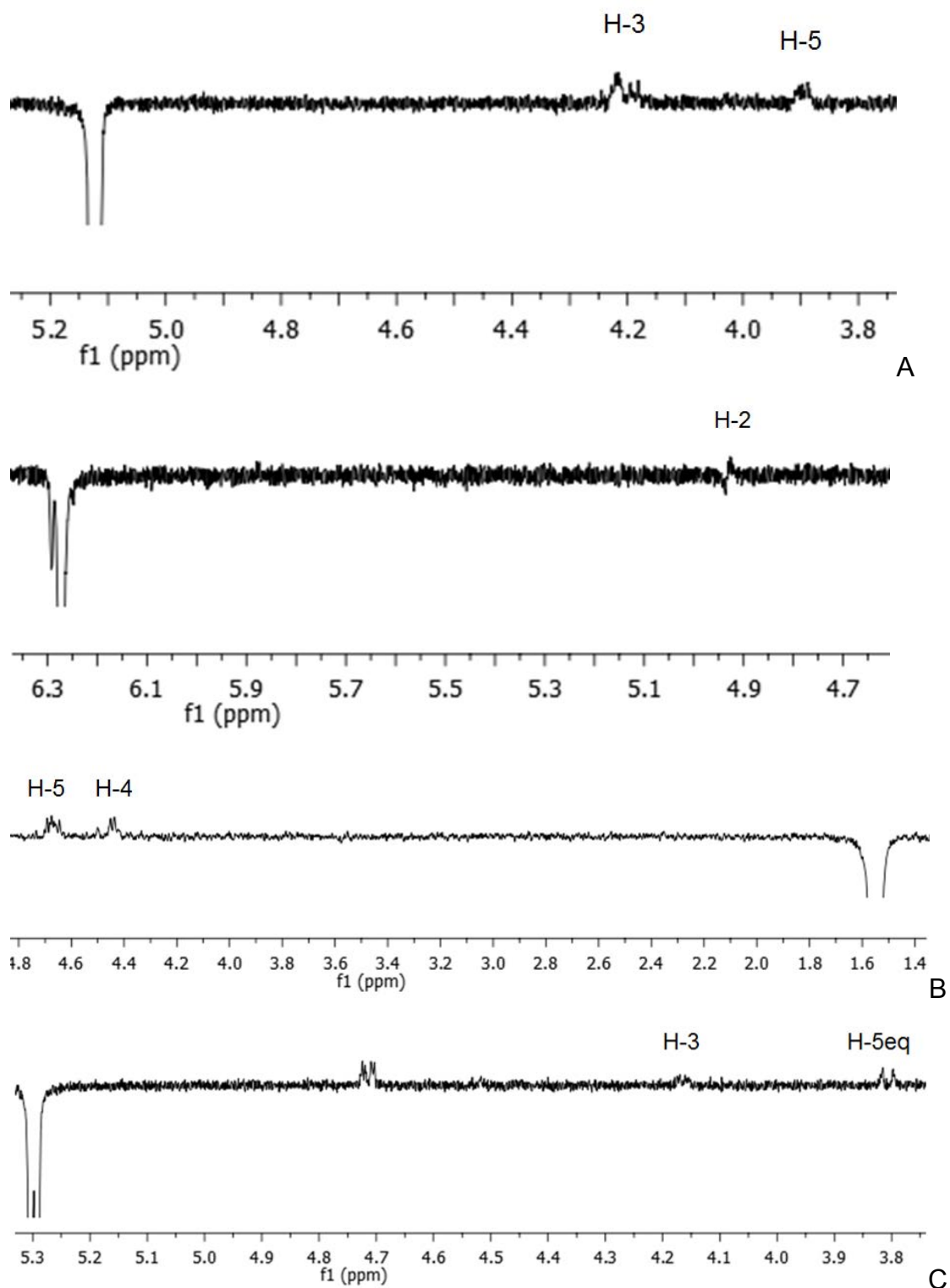


Figura 34 – Espectros ROESY-1D. A) β -glicose (irradiação em $\delta 5,12$); B) α -ramnose (irradiação em $\delta 6,26$ e $\delta 1,55$); C) α -arabinose (irradiação em $\delta 5,30$) e D) α -arabinose (irradiação em $\delta 4,74$) (Continuação).

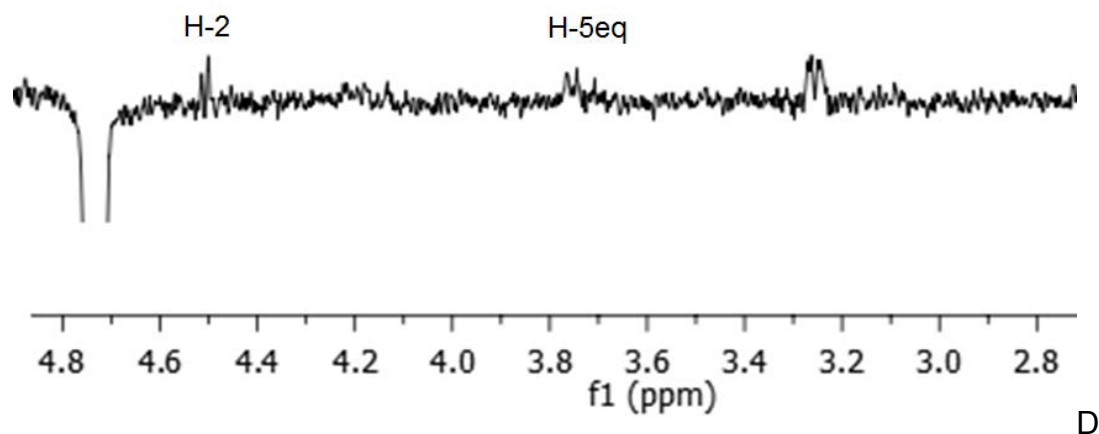


Figura 34 – Espectros ROESY-1D. A) β -glicose (irradiação em δ 5,12); B) α -ramnose (irradiação em δ 6,26 e δ 1,55); C) α -arabinose (irradiação em δ 5,30) e D) α -arabinose (irradiação em δ 4,74).

A próxima etapa consistiu em avaliar a união entre os açúcares, bem como a ligação dos mesmos na aglicona.

Os espectros ROESY 1D e 2D evidenciaram os efeitos NOE entre os hidrogênios anoméricos e os hidrogênios situados nos pontos de conexão (Figura 35, Tabela 7). Além disso, o espectro *g*HMBC indicou claramente a correlação entre os hidrogênios anoméricos e os átomos de carbono das unidades vizinhas a três ligações (Figura 35; Tabela 7).

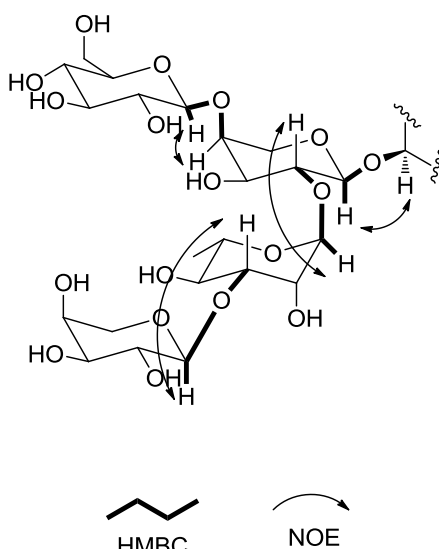


Figura 35 – Correlações evidenciadas nos espectros de *g*HMBC e ROESY-2D da parte glicosídica da SAP-A e da união com a aglicona.

Hidrólise da SAP-A com posterior isolamento de cada um dos açúcares presentes, mediante CCD preparativa e a medida da atividade óptica de cada um deles, evidenciaram que os monossacarídeos da SAP-A são L-arabinose, D-glicose e L-ramnose.

O conjunto desses dados sugere que a SAP-A é o ácido oleanólico 3-O- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosídeo (Figura 36).

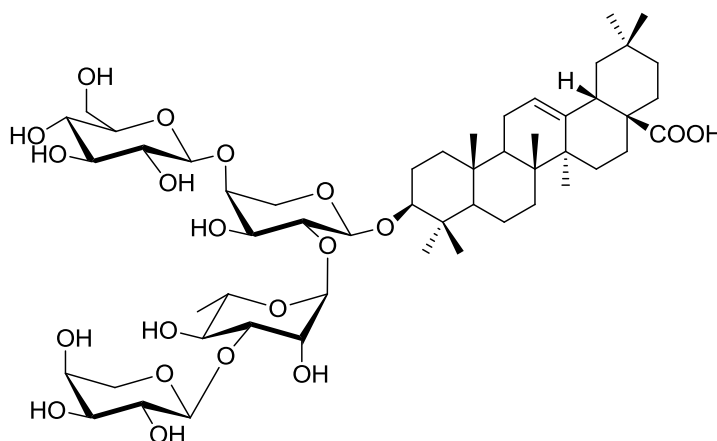


Figura 36 – Estrutura proposta para a SAP-A.

A literatura reporta que esta substância foi previamente isolada do rizoma de *Anemone raddeana* (Ranunculaceae) (FAN *et al.*, 2010). Embora a maioria dos dados espectroscópicos descritos esteja de acordo com os observados para a SAP-A, os dados correspondentes à unidade da arabinose terminal apresentam diferenças significativas (Tabela 8).

No nosso caso, os dados correspondentes à unidade sacarídica são coerentes com os dados descritos para a hederagenina 3-O- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil, previamente isolada de *Serjania salzmanniana* (Sapindaceae) (EKABO *et al.*, 1996).

A literatura reporta ainda o isolamento do ácido oleanólico 3-O- β -D-ribopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil de *Clematis argentea* (Ranunculaceae) (HAI *et al.*, 2012), o qual apresenta resultados coincidentes com os descritos por Fan *et al.* (2010), concluindo

que a estrutura proposta pelos autores possui, ao invés de uma arabinose terminal, uma unidade de ribose.

Tabela 8 – Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos com os descritos por Fan *et al.* (2010), da unidade de arabinose terminal da substância denominada SAP-A (14,1 e 3,5 T, Piridina- d_5 , ppm).

Arabinose Terminal	RMN ^1H - δ/ppm (J/Hz)		RMN ^{13}C (δ/ppm)	
	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura
1	5,30(<i>d</i> , 7,0)	5,99 (<i>d</i> , 3,6)	107,4	104,8
2	4,53(<i>dd</i> , 7,0 e 8,5)	4,31-4,35 (<i>m</i>)	73,1	72,8
3	4,16(<i>dd</i> , 8,5 e 3,5)	4,14-4,18 (<i>m</i>)	74,6	70,4
4	4,27(<i>sl</i>)	4,48-4,52 (<i>m</i>)	69,5	68,7
5 _{ax}	4,31(<i>dd</i> , 12,0 e 2,5)	4,14-4,18 (<i>m</i>)	67,1	65,3
5 _{eq}	3,81(<i>dl</i> , 12,0)	4,35-4,37 (<i>m</i>)		

A Tabela 9 resume o conjunto dessas informações e permite concluir que o ácido oleanólico 3-O- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosídeo está sendo descrito pela primeira vez e foi denominado serjaniosídeo D.

Tabela 9 – Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹H e RMN ¹³C descritos por Ekabo *et al.* (1996), Fan *et al.* (2010), Hai *et al.* (2012) e da SAP-A referentes à unidade sacarídica terminal.

Posição	Arabinose SAP-A		Arabinose (EKABO <i>et al.</i> , 1996)		Arabinose (FAN <i>et al.</i> , 2010)		Ribose (HAI <i>et al.</i> , 2012)	
	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H
1	107,4	5,30 (<i>d</i> , 7,0)	106,8	5,31 (<i>d</i> , 7,2)	104,8	5,99 (<i>d</i> , 3,6)	104,7	5,96 (<i>d</i> , 4,2)
2	73,2	4,53 (<i>dd</i> , 7,0 e 8,5)	72,6	4,54 (<i>m</i>)	72,8	4,48-4,52 (<i>m</i>)	72,9	4,32 (<i>m</i>)
3	74,6	4,17 (<i>dd</i> , 8,5 e 3,5)	74,0	4,11 (<i>m</i>)	70,4	4,35-4,37 (<i>m</i>)	68,8	4,50 (<i>m</i>)
4	69,5	4,28 (<i>sl</i>)	69,0	4,17-4,25 (<i>m</i>)	68,7	4,31-4,35 (<i>m</i>)	70,4	4,17 (<i>m</i>)
5ax		4,32 (<i>dd</i> , 12,0 e 2,5)		4,34-4,38 (<i>m</i>)		4,14-4,18 (<i>m</i>)		4,17 (<i>m</i>)
	67,1		65,4		65,3		65,3	
5eq		3,81 (<i>dl</i> , 12,0)		3,58 (<i>d</i> , 12,9)		4,35-4,37 (<i>m</i>)		4,35 (<i>m</i>)

3.1.5.1.2 Saponina C

A saponina C (SAP-C), sólido branco amorfo, apresentou sinais similares aos da SAP-A, porém, análise do espectro de RMN ^1H evidenciou apenas três sinais característicos de hidrogênios anoméricos, δ 4,76 (*d*), δ 6,18 (*s*) e δ 5,13 (*d*), não sendo observado o sinal em δ 5,30 (*d*), referente ao hidrogênio anomérico da arabinose terminal. Com isso, sugeriu-se a hipótese de uma saponina triterpênica do tipo oleânica (ácido oleanólico) com três unidades de açúcares e, comparando-se os dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C (Tabelas 10 e 11) com os citados por Ekabo *et al.* (1996), concluiu-se que a estrutura da substância denominada de SAP-C é 3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-[α -L--ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]ácido oleânico (Figura 37).

Esta saponina já foi isolada de plantas da família Sapindaceae, dos caules de *Thiuoia coriacea* Britton (SCHENKEL *et al.*, 1991) e de *Serjania salzmänniana* (EKABO *et al.*, 1996).

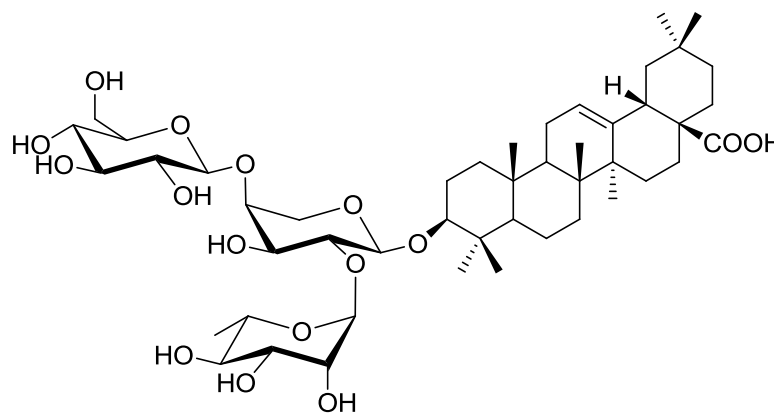


Figura 37 – Estrutura proposta para a SAP-C

Tabela 10 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da parte glicosídica das substâncias denominadas SAP-A, B, C e D (3,5 T, Piridina- d_5 , ppm).

Posição	SAP-A	SAP-B	SAP-C	SAP-D
Arabinose				
1	105,0	104,9	105,0	104,6
2	75,8	76,3	76,3	75,5
3	74,7	74,1	74,1	75,4
4	80,1	79,7	79,7	80,7
5	65,2	64,6	64,6	65,9
Ramnose				
1	101,4	101,8	101,8	101,3
2	71,8	72,3	72,5	71,9
3	82,8	72,5	72,3	82,9
4	73,0	74,0	74,1	73,1
5	69,5	69,8	69,8	69,5
6	18,4	18,5	18,5	18,5
Glicose				
1	106,6	106,4	106,4	106,9
2	75,4	75,5	75,5	75,5
3	78,5	78,5	78,6	78,5
4	71,2	71,2	71,2	71,2
5	78,8	78,8	78,8	78,8
6	62,5	62,5	62,5	62,5
Arabinose				
1	107,4			107,6
2	73,1			73,0
3	74,6			74,5
4	69,5			69,5
5	67,1			67,1

Tabela 11 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da aglicona das substâncias denominadas SAP-A, B, C e D (3,5 T, Piridina- d_5 , ppm).

Posição	SAP-A	SAP-B	SAP-C	SAP-D
1	38,8	39,0	38,8	39,0
2	26,7	26,3	26,6	26,4
3	88,7	81,0	88,7	81,2
4	39,5	43,5	39,5	43,6
5	56,0	47,8	55,9	47,7
6	18,5	18,1	18,7	18,2
7	33,2	32,8	33,1	33,2
8	39,7	39,7	39,7	39,7
9	48,0	48,1	48,0	48,2
10	37,0	36,9	37,0	36,9
11	23,6	23,7	23,7	23,8
12	122,5	122,6	122,5	nv
13	144,7	144,8	144,8	nv
14	42,1	42,1	42,1	42,1
15	28,3	28,3	28,3	28,3
16	23,6	23,7	23,7	23,8
17	46,6	46,6	46,7	46,7
18	41,9	41,9	42,0	42,0
19	46,4	46,4	46,5	46,4
20	30,9	30,9	31,0	30,9
21	34,2	34,2	34,2	34,2
22	33,2	33,2	33,3	33,2
23	28,2	63,8	28,0	63,9
24	17,2	14,0	17,0	14,2
25	15,5	18,6	15,5	18,5
26	17,3	17,4	17,4	17,5
27	26,1	26,1	26,2	26,2
28	180,1	180,1	180,2	nv
29	33,2	33,2	33,3	33,2
30	23,7	23,8	23,8	23,8

nv – não visível no espectro

3.1.5.1.3 Saponina B

A saponina B (SAP-B), sólido branco amorfo, apresentou sinais semelhantes aos da SAP-C, no espectro de RMN ^1H , quanto à parte glicosídica, sugerindo a hipótese da presença de três unidades de açúcares. Por outro lado, na região das metilas, observaram-se apenas seis singletos. Análise do espectro de RMN ^{13}C confirmou a ausência do sinal em $\delta 28,2$, referente à metila 23 e evidenciou a

presença do sinal em $\delta 67,1$, referente a um carbono oxigenado. Esta desblindagem observada sugeriu a hipótese de uma saponina triterpênica do tipo oleânica (hederagenina) e a comparação dos dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C (Tabelas 10 e 11) com os citados por Ekabo *et al.* (1996) e Hai *et al.* (2012), ajudaram a concluir que a SAP-B é a Pulsatilla D, cuja estrutura é 3-O-([\beta-D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosil]hederagenina (Figura 38).

Esta saponina já foi isolada por Kang (1989), das raízes de *Pulsatilla koreana*, por Mineo *et al.* (1978), das raízes de *Pulsatilla cernua* e por Ekabo *et al.* (1996), dos caules de *Serjania salzmanniana* (EKABO *et al.*, 1996).

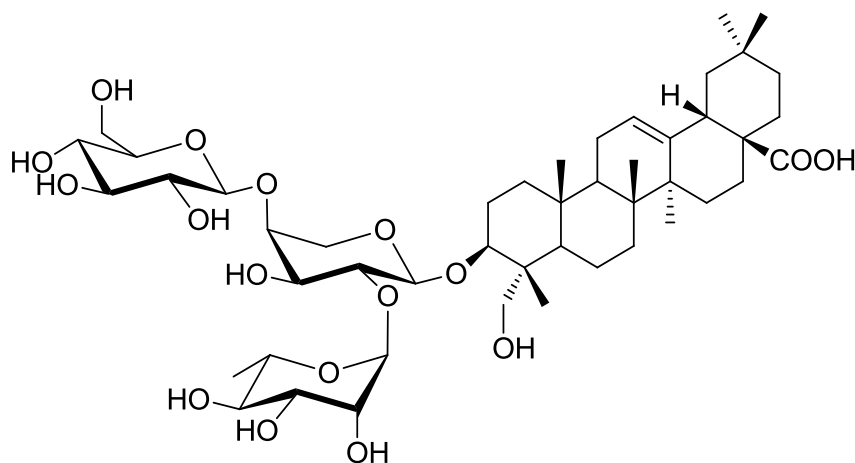


Figura 38 – Estrutura proposta para a SAP-B.

3.1.5.1.4 Saponina D

A saponina D (SAP-D), sólido branco amorfo, evidenciou, no espectro de RMN ^1H , a presença de quatro sinais característicos de hidrogênios anoméricos, $\delta 6,33$ (s), $\delta 5,29$ (d), $\delta 5,09$ (d) e $\delta 4,75$ (d), os quais foram semelhantes aos observados no espectro de RMN ^1H da SAP-A, sugerindo a hipótese de uma saponina triterpênica com as mesmas quatro unidades glicosídicas. Na região das metilas, observou-se a presença de seis singletos, semelhante ao evidenciado no espectro obtido da SAP-B, sugerindo a hipótese da presença da hederagenina. A

confirmação se deu pela presença do sinal em $\delta 67,1$, observado no espectro de RMN ^{13}C . A SAP-D foi, portanto, sugerida como sendo uma saponina triterpênica do tipo oleânica (hederagenina) com quatro unidades de açúcares e a comparação dos dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C (Tabelas 10 e 11) com os citados por Ekabo *et al.* (1996) e Hai *et al.* (2012) ajudou a concluir que a SAP-D é o salzmannianosídeo B cuja estrutura é 3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-[α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil]hederagenina (Figura 39).

Esta saponina já foi isolada dos caules de *Serjania salzmanniana* (Sapindaceae) (EKABO *et al.*, 1996).

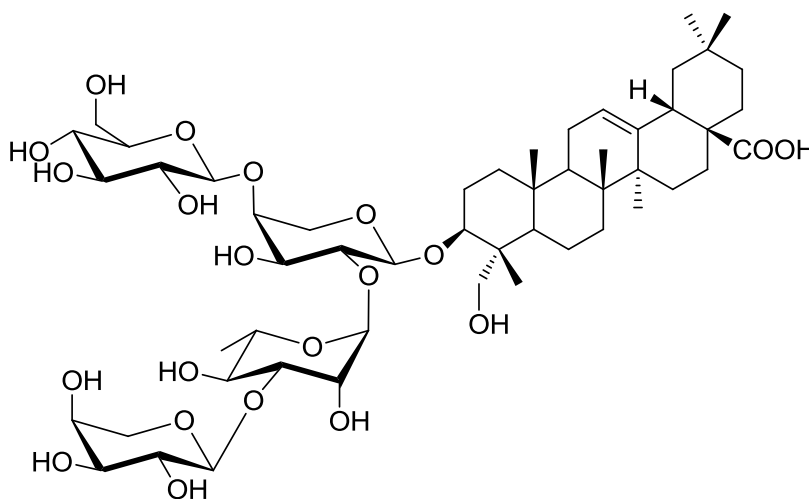


Figura 39 – Estrutura proposta para a SAP-D.

3.1.5.1.5 Saponina E

A saponina E (SAP-E), sólido branco amorfo, evidenciou no espectro de RMN ^1H sinais característicos de uma saponina. Foram observados sinais de açúcares entre $\delta 5,2$ e $\delta 3,8$ e, diferentemente das saponinas descritas anteriormente, os sinais observados entre $\delta 0,64$ e $\delta 0,98$, são característicos das metilas de uma aglicona esteroidal.

A multiplicidade e os deslocamentos químicos dos sinais obtidos nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (Tabela 12) ajudaram a determinar a natureza do açúcar como sendo uma glicose. O sinal em $\delta 5,05$ (*d*), correspondente ao

hidrogênio anomérico do monossacarídeo, cujo carbono anomérico (δ 102,7) forma parte de um éter com o C-3 da aglicona, apresentou uma constante de acoplamento de 7,5 Hz, indicando que o grupo hidroxila possui configuração β .

O número e a multiplicidade dos sinais correspondentes às metilas permitiram propor para a aglicona da SAP-E a estrutura do sitosterol (RUBISTEIN *et al*, 1976). Com esta proposta e com uma unidade de glicose, os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos foram comparados com os descritos por MONTRUCCHIO *et al.* (2005) e determinou-se que a estrutura da SAP-E é 3-O- β -glicopiranosilsterol (Figura 40).

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da parte glicosídica da substância denominada SAP-E (11,7 e 2,9 T, Piridina- d_5 , ppm).

Posição	RMN ^1H - δ /ppm (J/Hz)	RMN ^{13}C - δ /ppm
1	5,05 (<i>d</i> , 7,5)	102,7
2	4,05 (<i>dd</i> , 7,5)	75,4
3	4,28 (<i>o</i>)	78,2
4	4,28 (<i>o</i>)	71,8
5	3,97 (<i>m</i>)	78,7
6a	4,56 (<i>dd</i> , 11,5)	62,9
6b	4,41 (<i>dd</i> , 11,5)	62,9

(o) overlap – sinais sobrepostos.

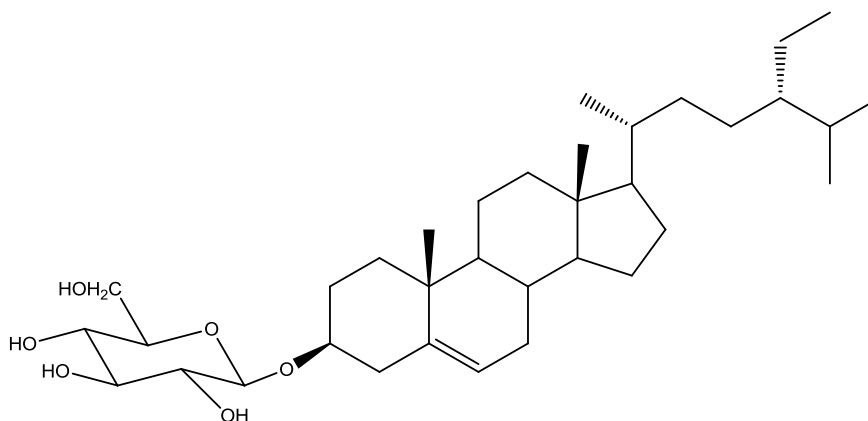


Figura 40 – Estrutura proposta para a SAP-E.

3.1.5.2 Flavonoides

3.1.5.2.1 Flavonoides A e B

Os flavonoides A e B (FEN-A e FEN-B) são sólidos amarelos amorfos que apresentam a mesma fórmula molecular ($C_{27}H_{28}O_{13}$), as quais foram determinadas por HRESIMS (FEN-A, m/z 560,1507 $[M-H]^-$, massa calculada - $559,1452 \pm 0,0007$; FEN-B, m/z 559,1459 $[M-H]^-$; massa calculada $559,1452 \pm 0,0013$) (Figuras 41 e 42, respectivamente).

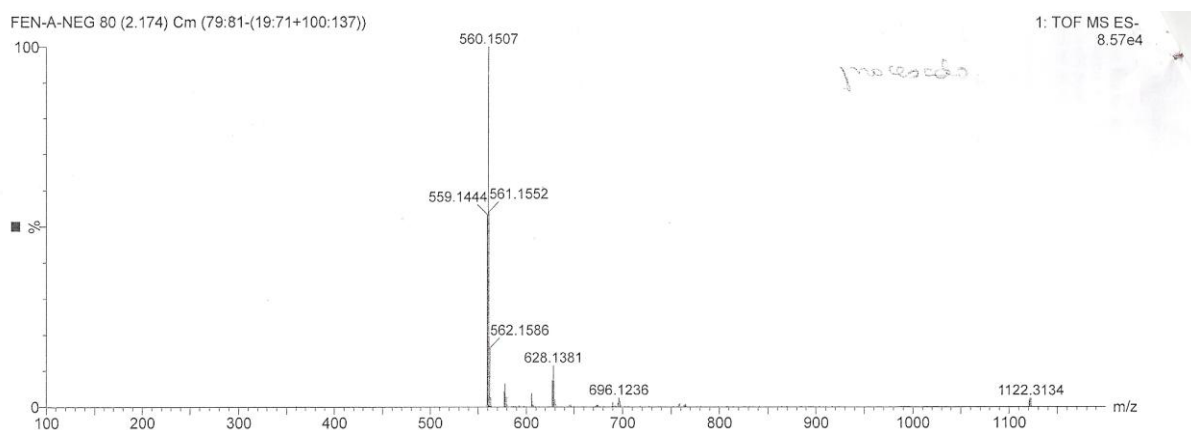


Figura 41 - Espectro de massas do FEN-A, modo negativo.

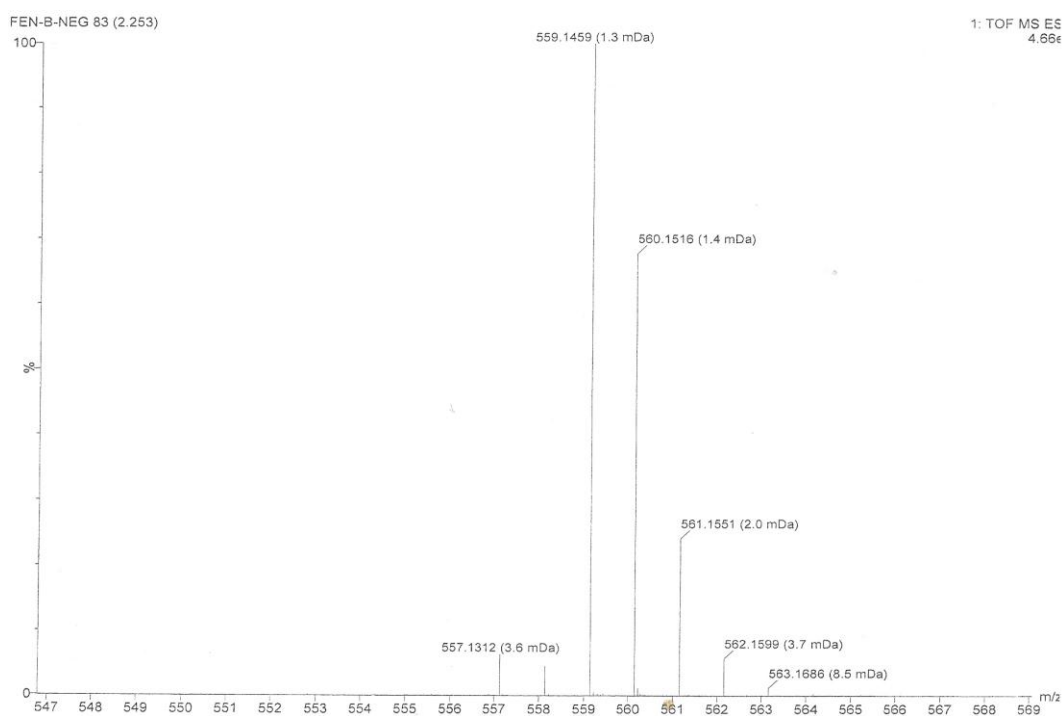


Figura 42 - Espectro de massas do FEN-B, modo negativo.

Os espectros de RMN ^1H (Figura 43) destes isômeros evidenciaram sinais semelhantes, porém com alguns deslocamentos químicos diferentes. Os sinais são típicos de uma flavona glicosilada e os dubletos com $J = 9,0$ Hz, observados em $\delta 7,89$ (FEN A) ou $\delta 7,95$ (FEN B) (2H, H-2'/H-6') e em $\delta 6,92$ (FEN A) ou $\delta 6,95$ (FEN B) (2H, H-3'/H-5'), evidenciaram que o anel B é 4'-monosubstituído.

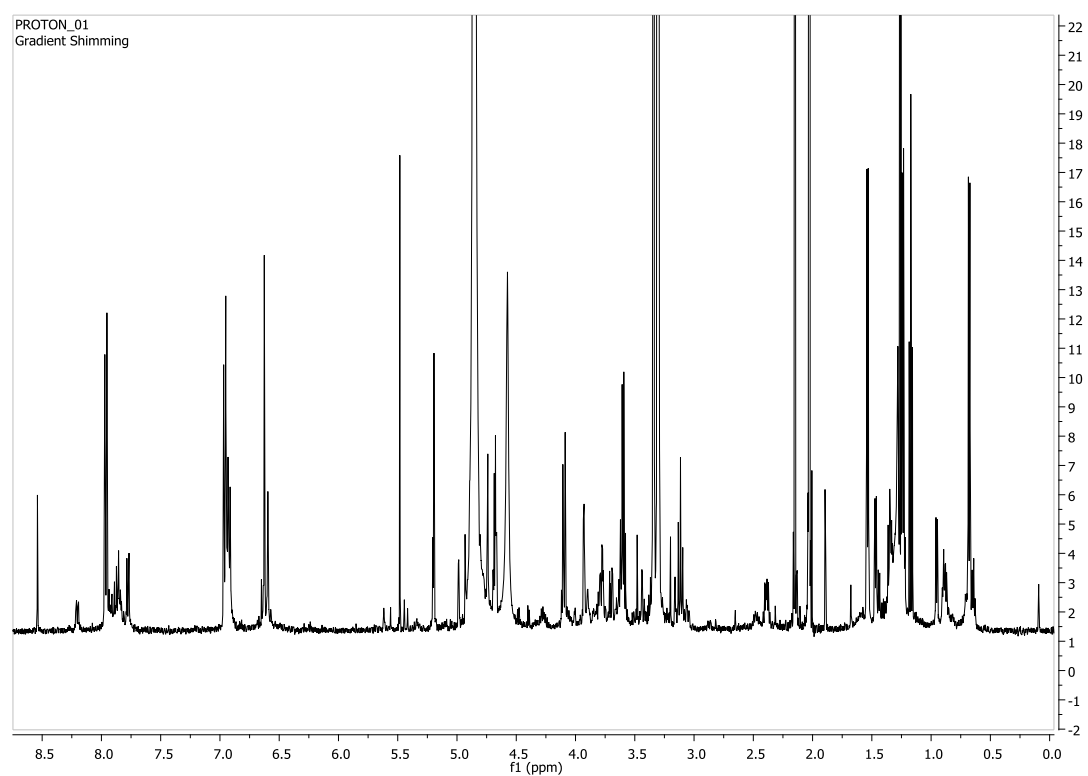
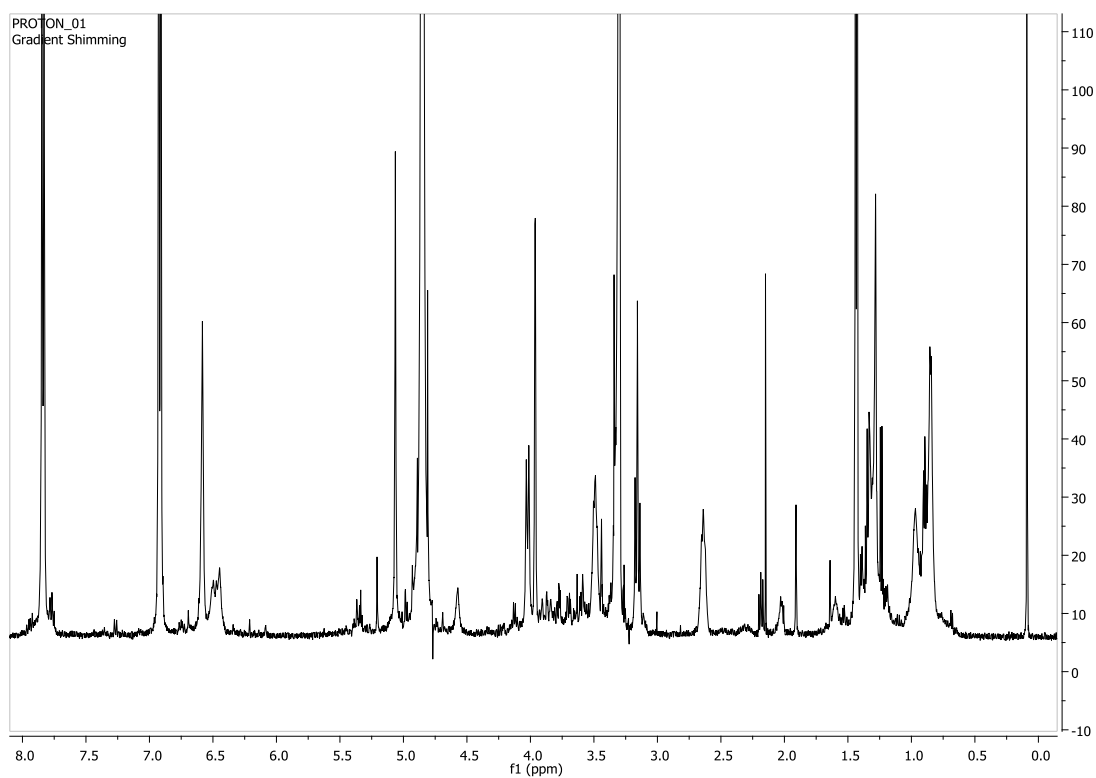


Figura 43 – Espectro de RMN ^1H das substâncias FEN-A (A) e FEN-B (B) (2,9 T, CD_3OD).

Os espectros obtidos para o FEN-A apresentaram sinais não bem definidos, alargados, devido, provavelmente, à presença de rotâmeros, por isso iniciou-se o estudo com o FEN-B. Os espectros realizados para FEN-B com MeOH- d_4 (Tabela 13) apresentaram uma peculiaridade. Observou-se que após a amostra ficar em solução por algumas horas, o sinal em $\delta 5,21$, que aparecia como um dubleto se simplificou a um singlete e, o dubleto em $\delta 5,04$, desapareceu. Isso pode ter ocorrido, provavelmente, pela deuterização de alguma posição.

Evidenciou-se no espectro de RMN ^1H do FEN-B (Tabela 13) dubletos em $\delta 0,68$ (3H, $J = 6,0$ Hz) e $\delta 1,53$ (3H, $J = 6,0$ Hz), sugerindo que os açúcares se tratam de dois 6-deoxi-açúcares. O estudo detalhado dos espectros de $g\text{COSY}$, TOCSY , $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ confirmou a presença de uma unidade de ramnose (HATANO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2007). Os outros sinais são coerentes com um 3-oxo-açúcar, já que se observou um sistema de spin [CH₃-CHOR-CHOH-], unido a um carbono quaternário, correspondente aos carbonos C-6, C-5 e C-4 de um 6-deoxi-açúcar. Mediante correlação observada no $g\text{HMBC}$, determinou-se que C-3 é uma carbonila cetônica ($\delta 206,5$). Além disso, os dubletos correspondentes aos H-1 ($\delta 5,21$) e H-2 ($\delta 5,04$) acoplados com $J = 10,0$ Hz e as correlações observadas no $g\text{HMBC}$ do H-1 com a carbonila e com o H-5, confirmam que o açúcar se trata de um 3-oxo-6-deoxoderivado (Figura 44). Por outro lado, os valores das constantes de acoplamento e os efeitos NOE observados evidenciam que H-1 e H-5 estão em configuração α e H-2, H-4 e H-6 em configuração β , estando de acordo com a presença de uma unidade de 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose.

Tabela 13 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada de FEN-B (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

Posição	δ_c	δ_H ($J = \text{Hz}$)
Aglicona		
2	166,1	--
3	103,9	6,61 (s)
4	183,7	--
5	nv	--
6	100,5	6,22 (s)
7	166,3	--
8	104,2	--
9	157,9	--
10	104,9	--
1'	123,5	--
2',6'	129,7	7,95 (d, 9,0)
3',5'	117,1	6,95 (d, 9,0)
4'	163,0	--
6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose		
1''	75,7	5,21 (d, 10,0)
2''	77,8	5,04 (d, 10,0)
3''	206,6	--
4''	80,3	4,09 (d, 9,5)
5''	80,5	3,59 (qd, 9,5 e 6,0)
6''	19,7	1,53 (d, 6,0)
Ramnose		
1'''	100,7	4,74 (s)
2'''	71,7	3,92 (dd, 3,5 e 1,5)
3'''	71,8	3,34 (dd, 9,5 e 3,5)
4'''	73,1	3,11 (dd, 9,5 e 9,5)
5'''	70,4	2,40 (qd, 9,5 e 6,0)
6'''	17,7	0,68 (d, 6,0)

*nv – não visível no espectro

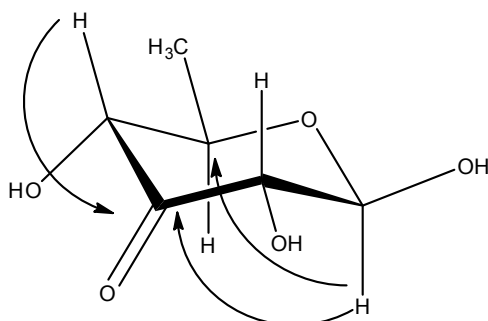


Figura 44 - Correlações evidenciadas no espectro de gHMBC da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose do FEN-B.

O valor do deslocamento químico do carbono anomérico ($\delta 75,7$) da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose é coerente com a ligação C-glicosídica com a apigenina. Os efeitos NOE observados entre os hidrogênios H-4 e H-6 deste açúcar com os hidrogênios H-2' e H-6' do anel B da flavona, confirmaram a união deste açúcar ao C-8 da apigenina. Por outro lado, a união da ramnose ao C-2'' da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose se deu através da correlação observada no experimento de gHMBC do C-2'' com o H-1 ($\delta 4,74$) da ramnose.

Hidrólise do FEN-B com posterior isolamento da ramnose e medida da atividade óptica evidenciaram que o isômero presente nesta substância é o L, portanto, a estrutura do FEN-B foi proposta como sendo a apigenina 8-C- β -[6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-ribo-hexopiranos-3-ulosídeo] (tetrastigma B) (Figura 45). Os dados obtidos foram comparados com os descritos por Zhao *et al.* (2007), os quais isolaram substância similar derivada da luteolina e por Mei-Na *et al.* (2013), os quais isolaram a mesma substância da *Tetrastigma obtectum* (Vitaceae) e confirmou-se a proposta.

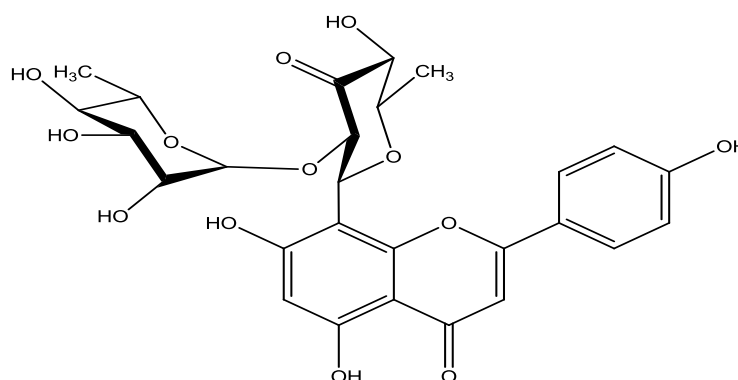


Figura 45 – Estrutura proposta para o FEN-B.

Em relação ao isômero, FEN-A (Tabela 14), seu espectro de RMN ^1H evidenciou, como diferenças mais significativas, a desblindagem dos sinais entre $\delta 6,22$ a $\delta 6,61$ e os deslocamentos químicos da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose, que se apresentaram mais blindados. Desta maneira, propôs-se que o FEN-A é o isômero 6-C-derivado (Figura 46). Esta substância está descrita para *Cassia occidentalis* por Hatano *et al.* (1999) e se denomina Cassiaoccidentalina A e os dados

espectroscópicos obtidos em DMSO são concordantes com os descritos pelos autores.

Tabela 14 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulose da substância denominada FEN-A (11,7 e 2,9 T, 50°C; CD_3OD e $\text{DMSO} - d_6$, ppm).

Posição	RMN ^1H - δ /ppm	RMN ^{13}C -	RMN ^1H - δ /ppm	RMN ^{13}C -
	(J/Hz)	δ /ppm	(J/Hz)	δ /ppm
	CD_3OD		$\text{DMSO} - d_6$	
1	5,06 (s)	75,4	4,86 (d, 10,0)	73,0
2	nv	77,4	5,28	75,4
3	--	nv	--	nv
4	4,03 (d, 9,5)	79,7	3,90 (d, 9,5)	77,6
5	3,50 (dq, 9,5; 6,0)	80,4	--	77,7
6	1,43 (d, 6,0)	19,2	1,31 (d, 6,0)	18,6

nv – não visível no espectro

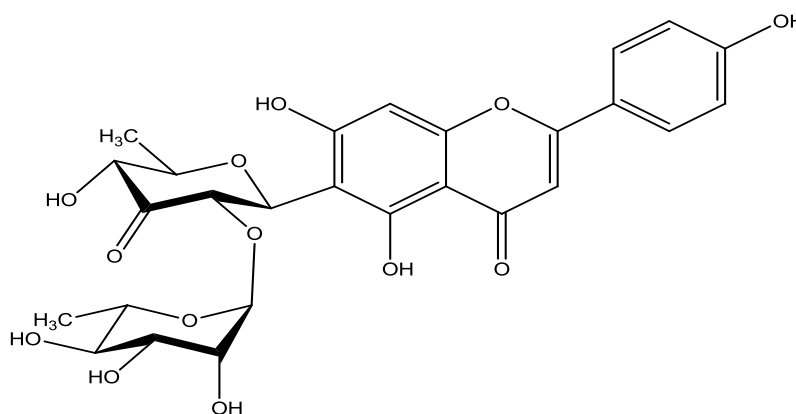


Figura 46 – Estrutura proposta para o FEN-A.

Liu & Tsuda (1996) descrevem que os oxo-açúcares apresentam uma certa instabilidade, em especial em meios básicos. Isso se explica pelos equilíbrios ceto-enólicos que podem dar lugar à isomerização do grupo carbonila ou se se encontram dissolvidos em um solvente deuterado, como nesse caso, com capacidade de transferir deutérios, se produz a deuterização das posições α à carbonila (Figura 47).

Quando a carbonila está situada em C-3, os antecedentes descrevem o equilíbrio ceto-enólico até o C-2, o que explicaria a rápida deuterização dessa posição e, conseqüentemente, o desaparecimento desta posição no espectro de

RMN ^1H e a simplificação do sinal de H-1 que de dubleto passa a ser visto como um singlete.

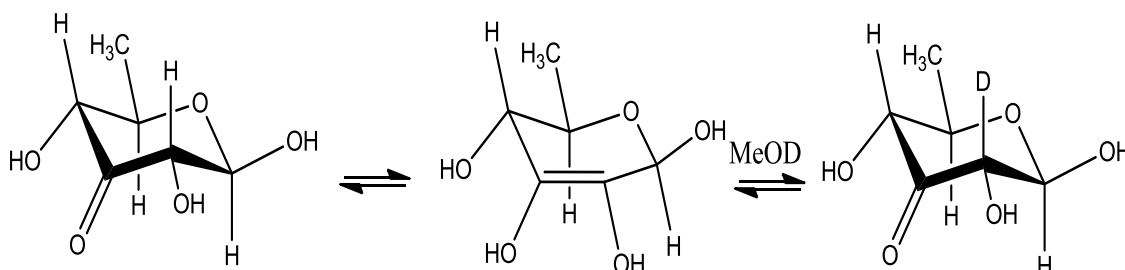


Figura 47 – Equilíbrio ceto-enólico e deuterização dos oxo-açúcares.

A ausência deste efeito confirma este fato quando se obtêm os espectros em um solvente polar aprótico, como o $\text{DMSO-}d_6$.

3.1.5.2.2 Flavonoide C

O flavonoide C (FEN-C) é um sólido amarelo amorfo cuja análise do espectro de RMN ^1H evidenciou sinais semelhantes aos observados para FEN A e B, sugerindo a presença de uma flavona. Observaram-se dois dubletos com $J = 9,0$ Hz em $\delta 7,84$ (2H) e $\delta 6,84$ (2H), característicos do anel B de um flavonoide 4'-monosubstituído. Além disso, na região de 3,0 a 5,0 ppm, evidenciaram-se sinais de açúcares, sendo os sinais em $\delta 4,92$ (*d*, $J = 7,5$ Hz) e $\delta 5,51$ (*dd*, $J = 12,5$ e $2,5$ Hz) referentes aos hidrogênios anoméricos. Os carbonos anoméricos correspondentes foram observados no espectro de RMN ^{13}C em $\delta 103,4$ e $\delta 66,8$, respectivamente. O conjunto desses dados sugeriu a presença de um flavonoide com duas unidades de açúcares.

Os açúcares foram caracterizados utilizando-se, principalmente, os experimentos de *g*COSY e RMN ^1H . Os dados obtidos (Tabela 15) corroboram com a presença de uma unidade de β -glicose e de uma β -bovinose (ZHU *et al.*, 2009). As correlações entre o hidrogênio H-1'' ($\delta 5,51$) e os carbonos C-7 ($\delta 165,0$) e C-6 ($\delta 114,0$) e entre o H-1''' ($\delta 4,92$) e o C-7 ($\delta 165,0$), observadas no experimento de

*g*HMBC, determinaram a união dos açúcares ao flavonoide. Além disso, o deslocamento químico do carbono anomérico da unidade de β -boivinose (66,8 ppm) e a presença de dois singletos em δ 6,63 e δ 7,02, referentes aos H-3 e H-8 do anel A, determinou a ligação C-glicosídica com o C-6 da apigenina.

Os dados obtidos foram comparados com os descritos por Zhu *et al.* (2009) e confirmou-se que a estrutura do flavonoide C é apigenina 6-C- β -boivinopiranosil-7-O- β -glicopiranosídeo (Figura 48).

Tabela 15 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada FEN-C (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

Posição	δ_c	δ_H (J = Hz)
Aglicona		
2	167,3	--
3	103,7	6,63 (s)
4	184,4	--
5	158,4	--
6	114,0	--
7	165,0	--
8	96,2	7,02 (s)
9	nv	--
10	106,2	--
1'	120,0	--
2',6'	129,7	7,84 (d, 9,0)
3',5'	118,5	6,84 (d, 9,0)
4'	nv	--
Boivinose		
1''	66,8	5,51 (dd, 12,5 e 3,0)
2 _{ax} ''	31,3	3,05 (ddd, 14,0, 12,5 e 3,0)
2 _{eq} ''	31,3	1,43 (dl, 14,0)
3''	67,1	4,02 (o),
4''	71,1	3,35 (dl, 3,5)
5''	71,6	4,09 (dl, 6,5)
6''	17,5	1,21 (d, 6,5)
Glicose		
1'''	103,4	4,92 (d, 7,5)
2'''	72,3	3,60 (dd, 7,5 e 9,0)
3'''	77,0	3,51 (dd, 9,0 e 9,5)
4'''	69,4	3,40 (dd, 9,5 e 8,5)
5'''	75,0	3,60(o)
6a'''	62,7	4,01 (dd, 12,0 e 6,5)
6b'''	62,7	3,73 (dd, 12,0 e 6,5)

(o)overlap – sinais sobrepostos/nv – não visível no espectro

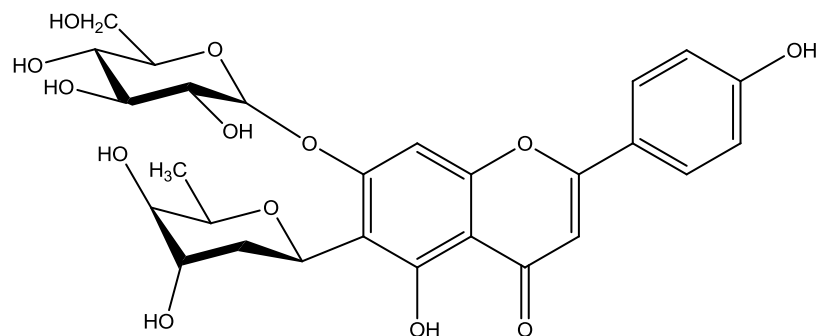


Figura 48 – Estrutura proposta para o FEN-C.

3.1.5.2.3 Flavonoide D

O flavonoide D (FEN-D) é um sólido amarelo amorfo cujo espectro de RMN ^1H evidenciou sinais semelhantes aos flavonoides descritos anteriormente. Os sinais são típicos de uma flavona, derivada da apigenina, já que se evidenciaram dubletos com $J = 9,0$ Hz em $\delta 7,78$ e $\delta 6,87$ (anel B 4'-monosubstituído) e singletos a $\delta 6,44$ e $\delta 6,28$.

O espectro de RMN ^1H evidenciou também sinais de 3,0 a 5,0 ppm característicos de açúcares. Os hidrogênios anoméricos foram observados em $\delta 5,20$ (s) e $\delta 4,92$ (dl, 9,0 Hz), sendo os carbonos anoméricos correspondentes observados no espectro de RMN ^{13}C em $\delta 102,1$ e $\delta 74,2$, respectivamente. O conjunto destes dados sugeriu a presença de um flavonoide (apigenina) com duas unidades de açúcares.

Os açúcares foram caracterizados utilizando-se, principalmente, os experimentos de gCOSY e RMN ^1H . Os dados obtidos (Tabela 16) corroboram com a presença de uma unidade de β -xilose e de uma α -ramnose (PACIFICO *et al.*, 2010). As correlações observadas no experimento de ROESY-1D entre o hidrogênio H-1''' ($\delta 5,20$) e H-2'' ($\delta 4,57$) e H-3'' ($\delta 3,49$), determinaram a união entre as unidades de açúcares. Por outro lado, não foram observadas correlações que determinassem a união da xilose ao C-6 da flavona, porém, a proposta foi baseada em dados descritos por Pacifico *et al.* (2010). Os autores descrevem substância

semelhante isolada do extrato metanólico de *Petrorrhagia velutina* (Cariofilaceae), sendo a diferença a presença de uma hidroxila na posição 5 do anel B da flavona.

Tabela 16 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada FEN-D (14,1 e 3,5 T, CD_3OD , ppm).

Posição	RMN ^{13}C - δ/ppm	RMN ^1H - δ/ppm (J/Hz)
Aglicona		
2	165,2	--
3	102,1	6,44 (s)
6	nv	--
8	nv	6,28 (s)
2'/6'	128,7	7,78 (d, 9,0)
3'/5'	117,5	6,87 (d, 9,0)
4'	164,7	--
Xilose		
1''	74,2	--
2''	77,5	4,57 (m)
3''	82,0	3,49 (dd, 9,0 e 9,0)
4''	71,8	3,64 (qd, 9,0 e 4,0)
5''	71,1	3,91 (m)
Ramnose		
1'''	102,1	5,20 (s)
2'''	72,3	3,86 (dd, 3,0 e 2,0)
3'''	71,9	3,60 (dd, 9,5 e 3,0)
4'''	74,4	3,08 (dd, 9,5 e 9,5)
5'''	70,7	2,74 (m)
6'''	17,7	0,71 (sl)

*nv – não visível no espectro

Análise do espectro de massas evidenciou um sinal de m/z a 547,1461 (massa calculada – $547,1452 \pm 0,0016$) (Figura 49) referente ao íon $[\text{M}-\text{H}]^-$. Os dados obtidos foram comparados com os descritos por Mabry *et al.* (1971) e Pacifico *et al.* (2010) e confirmou-se que a estrutura do flavonoide D é 2'-O- α -L-raminopiranosil-6-C- β -D-xilopiranosilapigenina (Figura 50).

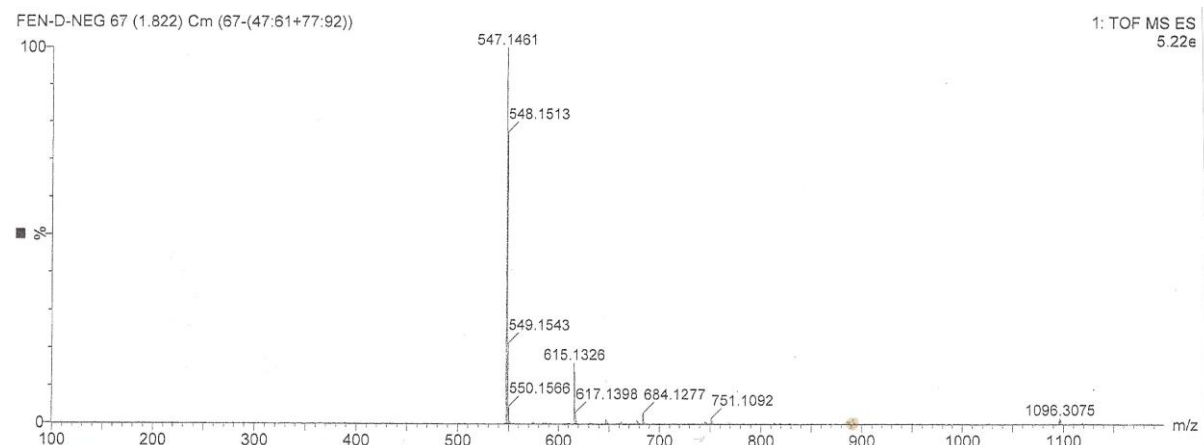


Figura 49 – Espectro de massas do FEN-D, modo negativo.

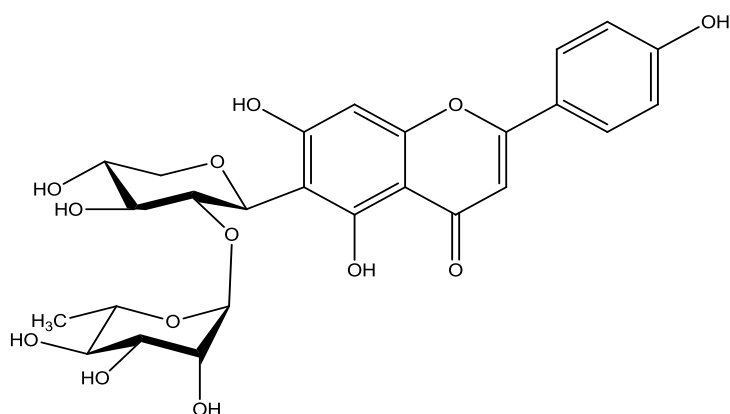


Figura 50 – Estrutura proposta para o FEN-D.

3.1.5.2.4 Flavonoide E

A substância minoritária, flavonoide E (FEN-E), de coloração amarela e fórmula molecular $C_{27}H_{28}O_{13}$ (HRESIMS, m/z 561,1610 $[M+H]^+$; massa calculada 561,1608; Figura 51), apresentou, nos espectros de RMN 1H (Figura 52) e RMN ^{13}C (Figura 53), sinais característicos de uma apigenina C-glicosilada, semelhante às outras flavonas descritas até o momento. Além disso, foram evidenciados, no espectro de RMN de 1H , sinais em δ 5,39 (*dd*, 5,0 e 1,5 Hz) e δ 5,04 (*dl*, 7,5 Hz), referentes aos hidrogênios anoméricos, os quais se correlacionam no *g*HSQC com os sinais em δ 64,5 e δ 101,7 do RMN ^{13}C , o que indicou um C- e O-glicosídeo, respectivamente.

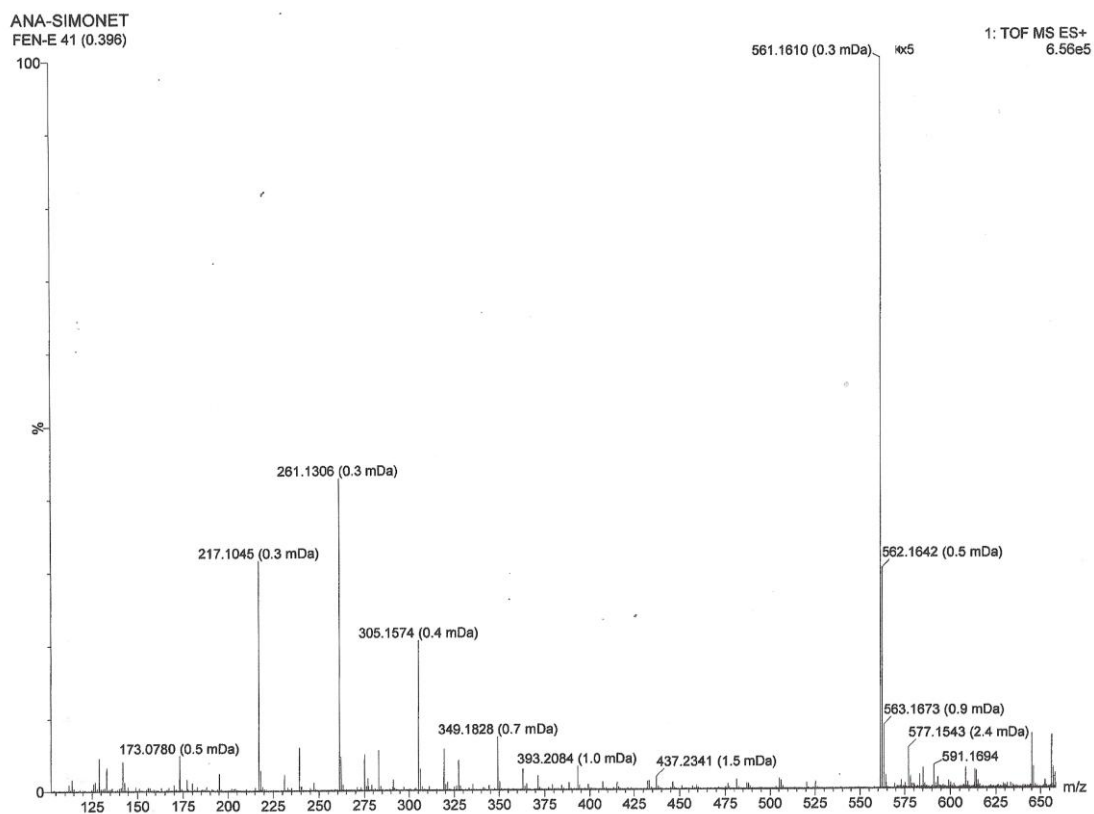


Figura 51 - Espectro de massas do FEN-E, modo positivo.

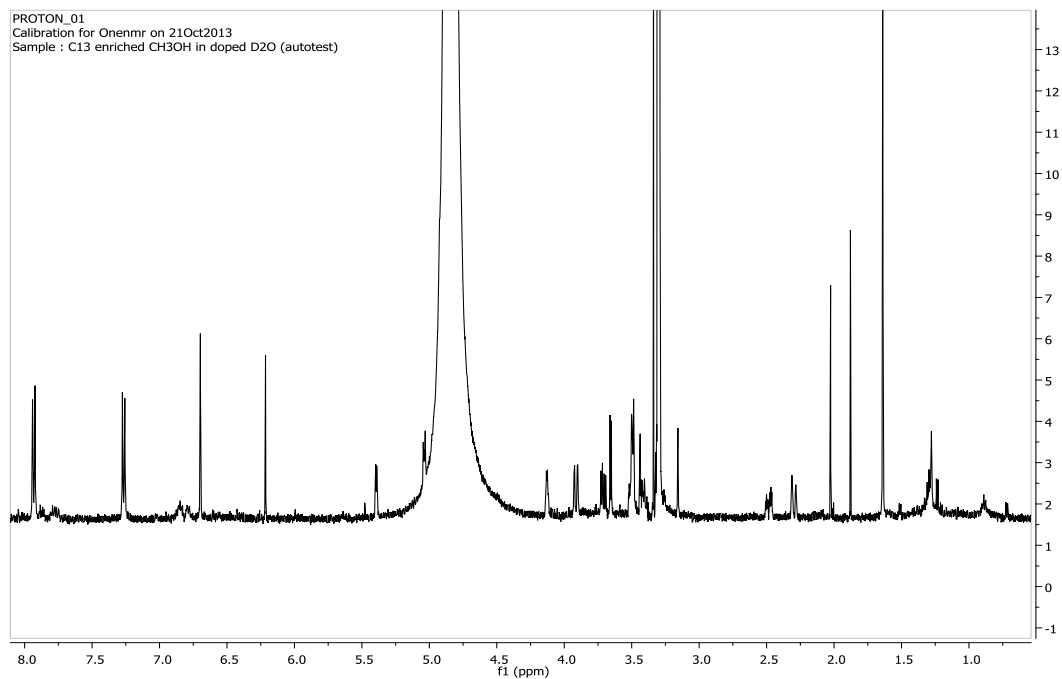


Figura 52 - Espectro de RMN ^1H do FEN-E (3,5 T, MeOD).

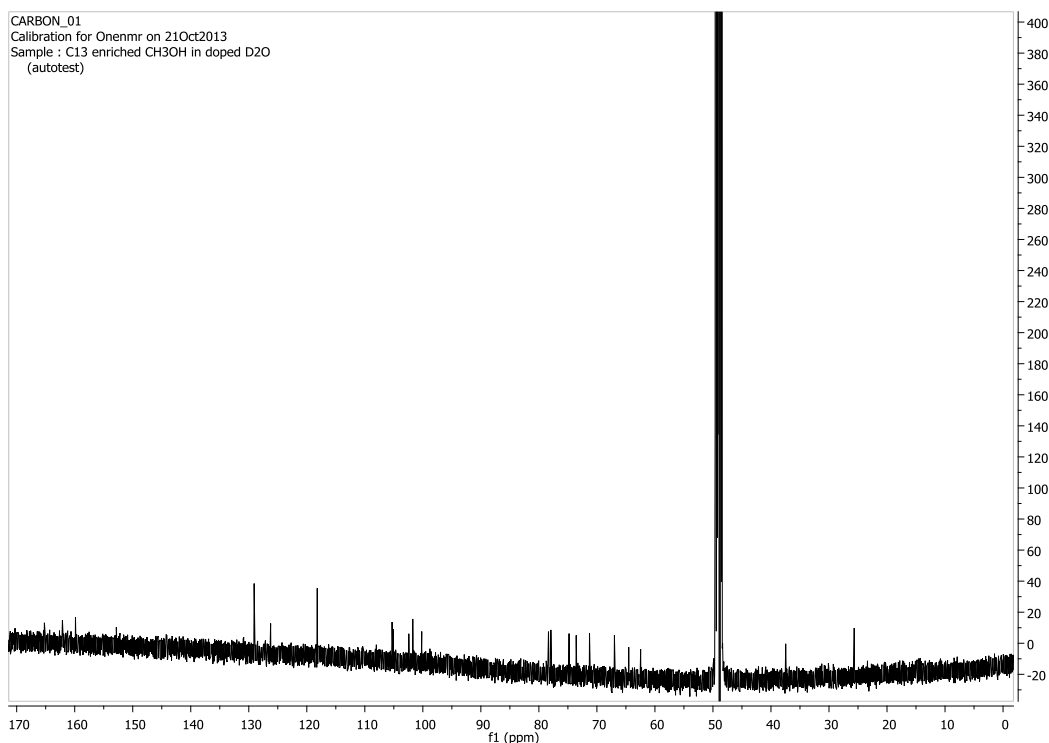


Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C do FEN-E (14,1 T, MeOD).

O estudo detalhado dos espectros de *g*COSY, TOCSY e *g*HSQC indicaram que o sinal em $\delta 5,04$ corresponde ao hidrogênio anomérico de uma hexose. Os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes (XU *et al.*, 2013) e a correlação observada no TOCSY, do hidrogênio anomérico com cada um dos sinais da hexose, sugeriram a presença de uma glicose, sendo a constante de acoplamento de H-1 característica de uma configuração β .

O dubleto de intensidade 2H em $\delta 7,27$ ($J = 9,0$ Hz), correspondente aos hidrogênios H-3'/5' do anel B, apresentou-se desblindado em relação aos derivados de apigenina encontrados em *S. marginata*, o que sugeriu uma substituição do OH de C-4'. O espectro de ROESY-1D (Figura 54), evidenciou a correlação entre o sinal de H-3'/5' e o sinal do hidrogênio anomérico da β -glicose, o que confirmou a ligação entre as duas unidades.

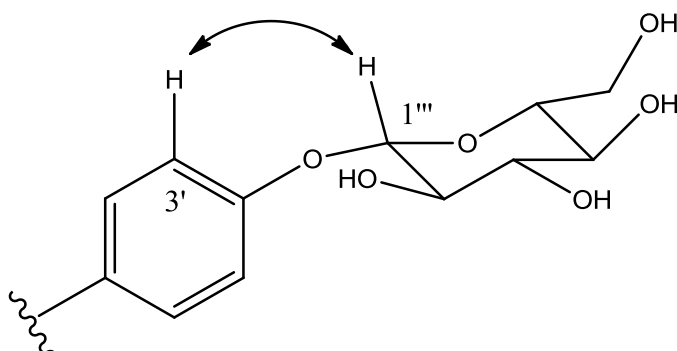


Figura 54 - Correlação observada no espectro de ROESY-1D para confirmar a ligação da unidade da β -glicose no anel B da apigenina.

Os sinais correspondentes ao segundo hidrogênio anomérico (δ 5,39 e δ 64,5) apresentaram uma grande semelhança com os sinais da bovinose do FEN-C, assim, os deslocamentos químicos e as multiplicidades dos sinais do RMN ^1H sugeriram que o açúcar se encontra desoxigenado na posição 2. Os espectros de *g*COSY e TOCSY evidenciaram sinais concordantes com um sistema de spin [-CHOR-CH₂-CHOH-CHOH-] correspondentes aos carbonos C-1'' a C-4'', o que confirmou essa hipótese. O espectro de RMN ^1H evidenciou um singlete de intensidade 3H (δ 1,63) que se correlaciona com C-4'' no espectro de *g*HMBC (Figura 52), por outro lado, os sinais correspondentes a esta metila e ao H-4'' se correlacionam com um carbono quaternário a δ 102,4, o que sugeriu que pudesse corresponder a C-5'', que já se encontrava totalmente substituído, sendo C-6'' a metila anteriormente referida. A correlação observada no espectro de *g*HMBC (Figura 55) entre H-1'' (δ 5,39) e C-5'' (δ 102,4) confirmou a natureza da piranose do açúcar.

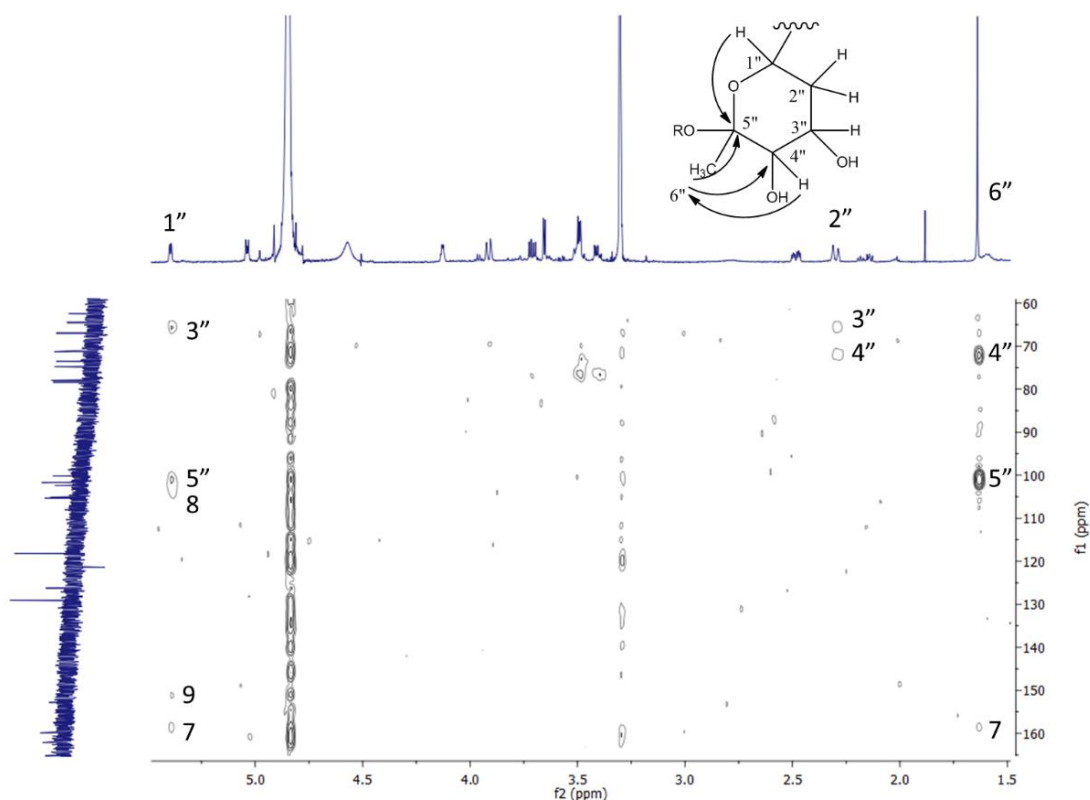


Figura 55 - Correlações observadas no espectro de gHMBC que justificam a natureza da unidade do açúcar cujo hidrogênio anomérico foi evidenciado em $\delta 5,39$.

O deslocamento químico de C-5'' está de acordo com uma substituição de dois oxigênios. Não há na literatura a descrição de um monossacarídeo do tipo hexopiranosose natural, com duas substituições oxigenadas em um carbono quaternário C-5'', no entanto, há açúcares sintéticos descritos com um grupo hidroxila em C-5'' (RALE *et al.*, 2011), sendo os valores dos sinais evidenciados nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C para C-5'' e C-6'', concordantes com os determinados para o FEN-E.

As constantes de acoplamento do hidrogênio anomérico $\delta 5,39$ evidenciaram que este não se encontrava em disposição axial-axial com o H-2'', sugerindo configuração α . O espectro de ROESY-2D evidenciou uma correlação entre os hidrogênios H-2'' e H-4'', o que indicou que ambos se encontravam em posição axial. O H-2'' axial apresenta uma constante de acoplamento com H-3'' de 3,5 Hz, o que indicou que este último está em posição equatorial, o que está de acordo com a $J_{4''/3''}$ cujo valor é de 4,5 Hz. A disposição de H-2'', H-3'' e H-4'' corrobora com os

descritos para o digitoxopiranosídeo, sendo os valores obtidos neste trabalho concordantes com os descritos na literatura (XU *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2012).

Todos os valores determinados confirmaram a configuração relativa do açúcar (Figura 56), que corresponde a um α -5-hidroxi-2,6-dideoxiribohexopiranosídeo.

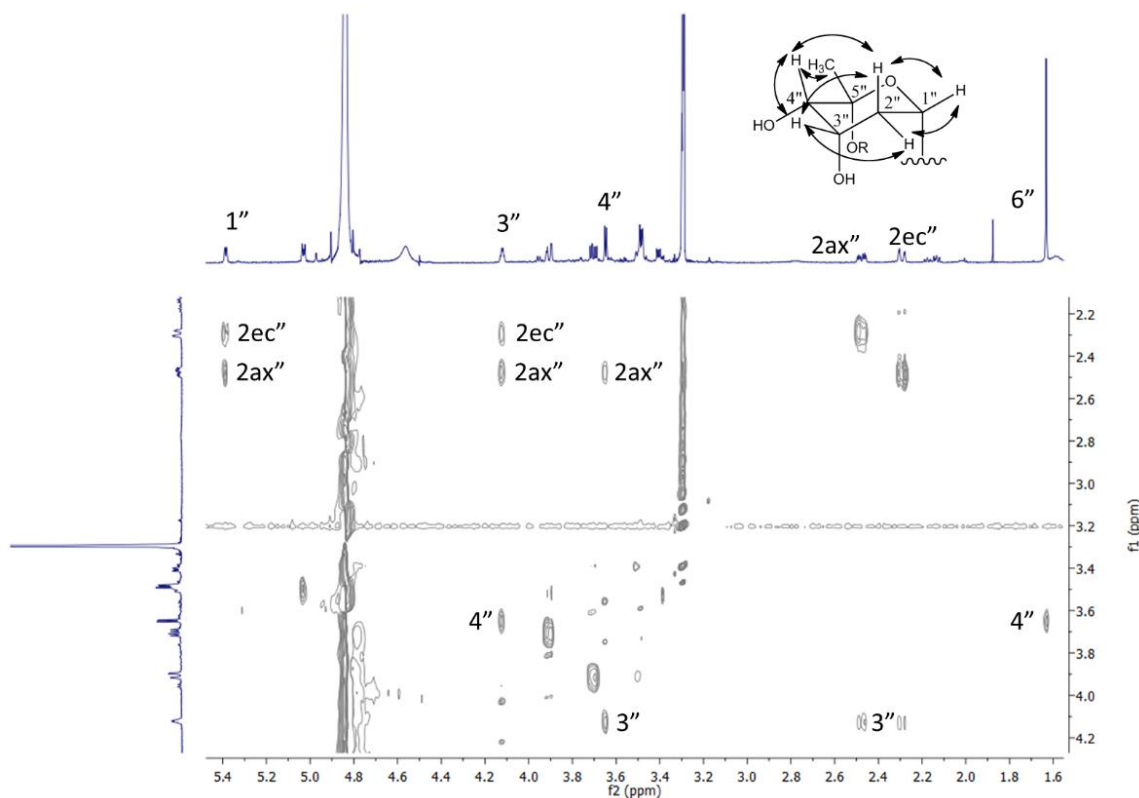


Figura 56 – Correlações observadas no espectro ROESY-2D para a unidade de açúcar cujo hidrogênio anomérico foi evidenciado em δ 5,39.

O sinal evidenciado no espectro de RMN ^{13}C (δ 64,5) para o C-1'' apresentou um deslocamento químico característico de uma ligação C-glicosídica. A posição proposta (C-8) é devido, por um lado, aos deslocamentos químicos observados para as posições C-6 e C-8 e, por outro lado, pela correlação evidenciada no espectro de ROESY-1D (Figura 57) entre o hidrogênio anomérico e os H-2'/6'.

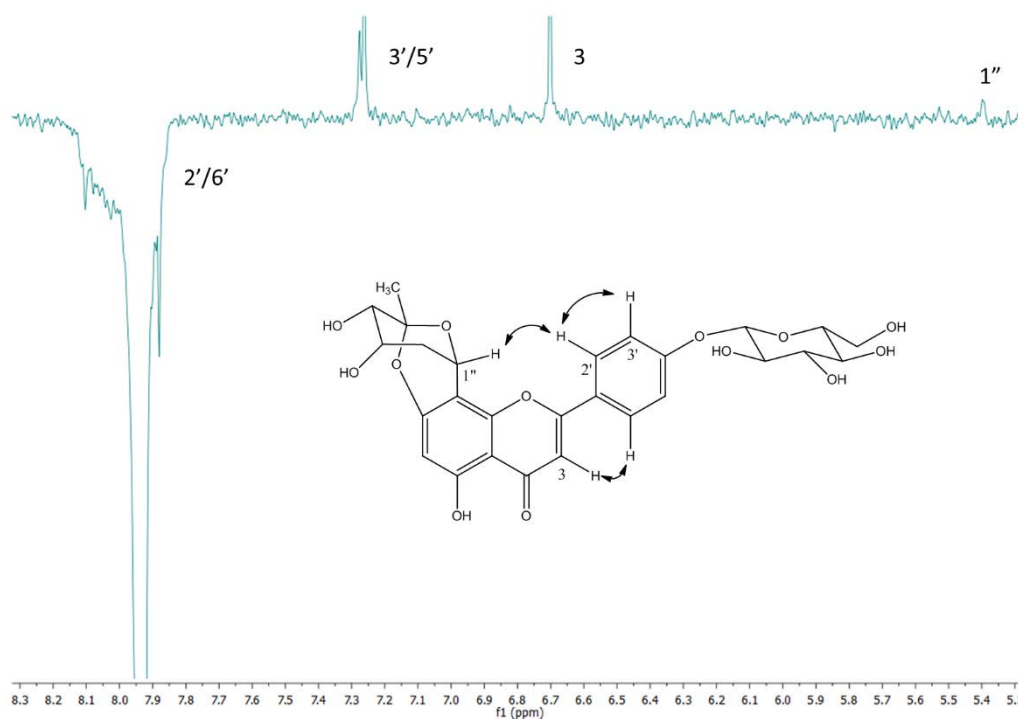


Figura 57 – Correlações observadas no espectro ROESY-1D resultante da irradiação do H-2'/6' do anel B da apigenina.

A fórmula molecular $C_{27}H_{28}O_{13}$ está de acordo com uma insaturação adicional que poderia estar relacionada com a presença de um éter cíclico. O espectro gHMBC evidenciou correlação de uma metila C-6'' (δ 1,63) com C-7 (δ 159,9), evidenciando a presença de um éter cíclico entre as duas posições (Figura 52). Flavonoides O, C-glicosilados, em que a unidade de açúcar está unida, simultaneamente, à flavona, por duas posições (por um carbono e por um oxigênio à mesma flavona), são raramente descritos na literatura (FURUTA *et al.*, 2004), somente estão descritos para outras disposições dos açúcares. A estrutura minimizada evidenciou valores teóricos para as constantes de acoplamento concordantes com as experimentais. Desta forma, FEN-E (Tabela 17) foi caracterizado como sendo 7,5''-anidroapigenina 8-C- α -(2,6-dideoxi-5-hidroxi-ribo-hexopiranosil)-4'-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 58). Esta substância está sendo descrita pela primeira vez na literatura e foi denominada Serjanona A

Tabela 17 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada FEN-E (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

Posição	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)
Aglicona		
2	165,2	--
3	105,3	6,70 (s)
4	184,1	--
5	160,6	--
6	100,2	6,21 (s)
7	159,8	
8	105,1	--
9	152,8	--
10	105,1	--
1'	126,2	--
2',6'	129,0	7,93 (d, 9,0)
3',5'	118,2	7,27 (d, 9,0)
4'	162,1	--
α-2,6-dideoxi-5-hidroxi-ribo-hexopiranosil		
1''	64,5	5,39 (dd, 5,0 e 1,5)
2 _{ax} ''	37,4	2,49 (ddd, 14,0, 5,0 e 3,5)
2 _{eq} ''	37,4	2,30 (dl, 14,0)
3''	67,0	4,14 (m)
4''	73,5	3,66 (d, 4,5)
5''	102,4	--
6''	25,6	1,64 (s)
Glicose		
1'''	101,7	5,04 (d, 7,5)
2'''	74,8	3,49 (o)
3'''	77,9	3,45 (m)
4'''	71,2	3,40 (m)
5'''	78,3	3,49(o)
6a'''	62,5	3,91 (dd, 12,0 e 2,0)
6b'''	62,5	3,71 (dd, 12,0 e 6,0)

(o) overlap – sinais sobrepostos

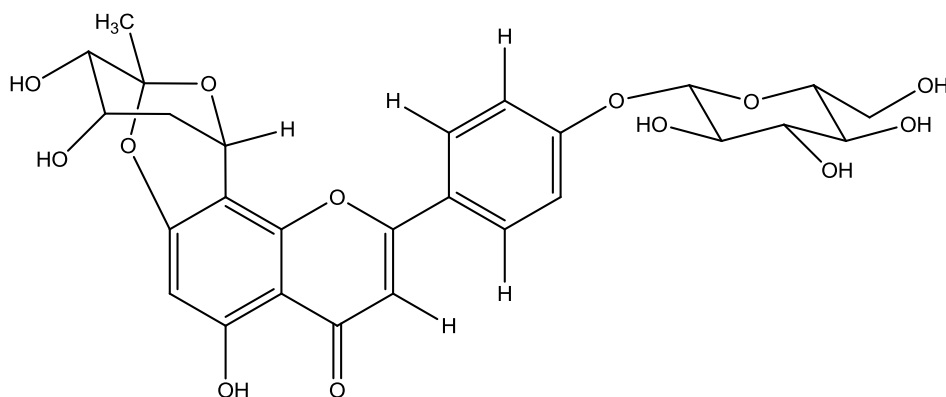


Figura 58 - Estrutura proposta para o FEN-E.

3.1.5.2.5 Flavonoide F

O flavonoide F (FEN-F) é um sólido amarelo amorfo cuja análise do espectro de RMN ^1H evidenciou sinais típicos de uma flavona glicosilada. Diferentemente dos outros flavonoides descritos, observaram-se um duplo dubleto em $\delta 7,30$ ($J = 8,5$ e $2,0$ Hz) e um dubleto em $\delta 6,90$ ($J = 8,5$ Hz), característicos do anel B de um flavonol. Além disso, na região de $3,0$ a $5,0$ ppm, evidenciou-se o sinal em $\delta 5,34$ (d , $1,5$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico, sendo o carbono anomérico correspondente observado no espectro de RMN ^{13}C em $\delta 103,5$. O conjunto desses dados sugeriu a presença de um flavonoide com uma unidade de açúcar.

O açúcar foi caracterizado utilizando-se, principalmente, os experimentos de $g\text{COSY}$ e RMN ^1H , por meio dos quais foi possível determinar a presença de uma unidade de α -ramnose. Os dados obtidos (Tabela 18) foram comparados com os descritos por Zhong *et al.* (1997) e Santos *et al.* (2005) e confirmou-se que a estrutura do FEN-F é a 3-O- α -L-ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (Figura 59).

Tabela 18 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada FEN-F (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

Posição	RMN ^{13}C - δ/ppm	RMN ^1H - δ/ppm (J/Hz)
Aglicona		
2	158,5	--
3	nv	--
4	nv	--
5	163,2	--
6	99,8	6,20 (<i>d</i> , 2,0)
7	165,9	--
8	94,7	6,36 (<i>d</i> , 2,0)
9	159,3	--
10	105,9	--
1'	122,8	--
2'	116,9	7,33 (<i>d</i> , 2,0)
3'	146,5	--
4'	149,8	--
5'	116,4	6,90 (<i>d</i> , 8,5)
6'	123,0	7,30 (<i>dd</i> , 8,5 e 2,0)
Ramnose		
1''	103,5	5,34 (<i>d</i> , 1,5)
2''	72,0	4,20 (<i>dd</i> , 3,5 e 1,5)
3''	72,1	3,74 (<i>dd</i> , 8,5 e 3,5)
4''	73,2	3,33 (<i>o</i>)
5''	71,9	3,41 (<i>dq</i> , 9,5; 6,0)
6''	17,6	0,93 (<i>d</i> , 6,0)

*nv – não visível no espectro

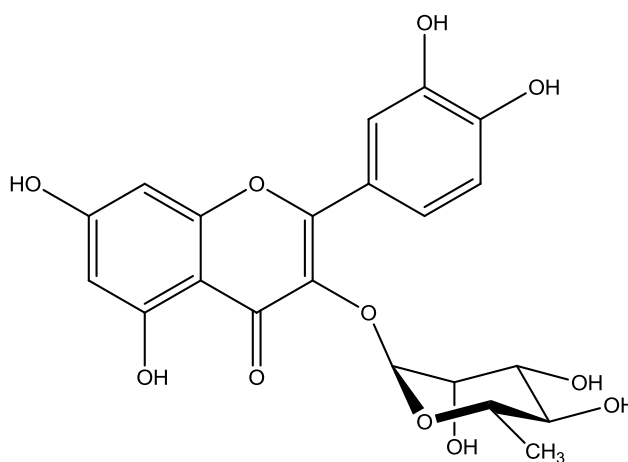


Figura 59 – Estrutura proposta para o FEN-F.

3.1.5.2.6 Flavonoide G

O flavonoide G (FEN-G) é um sólido amarelo amorfo cujo espectro de RMN ^1H evidenciou sinais característicos de um flavanol. Observaram-se um duplo dubleto em $\delta 6,79$ ($J = 8,0$ e $2,0$ Hz) e um dubleto em $\delta 6,75$ ($J = 8,0$ Hz), típico do anel B dessa classe química, além disso, diferentemente do observado para FEN-E, observaram-se dois duplos dubletos em $\delta 2,86$ ($J = 17,0$ e $4,5$ Hz) e $\delta 2,73$ ($J = 17,0$ e $2,5$ Hz), um duplo duplo dubleto em $\delta 4,17$ e um singlete largo em $\delta 4,81$, típicos do anel C de catequinas.

Os dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (Tabela 19) foram comparados com os descritos por Araújo *et al.* (1994) e Lôbo *et al.* (2008) e confirmou-se que a estrutura do FEN-G é a (-)-epicatequina (Figura 60).

Tabela 19 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada FEN-G (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

Posição	RMN ^{13}C - δ /ppm	RMN ^1H - δ /ppm (J/Hz)
Aglicona		
2	79,9	4,81 (s)
3	67,5	4,17 (ddd 4,5, 3,0 e 1,5)
4 $_{\alpha}$	29,2	2,86 (dd, 17,0 e 4,5)
4 $_{\beta}$		2,73 (dd, 17,0 e 3,0)
5	157,9	--
6	96,3	5,93 (d, 1,5)
7	158,0	--
8	95,8	5,90 (d, 1,5)
9	157,6	--
10	100,5	--
1'	132,3	--
2'	115,3	6,97 (d, 2,0)
3'	145,8	--
4'	145,9	--
5'	115,8	6,75 (d, 8,0)
6'	119,4	6,79 (dd, 8,0 e 2,0)

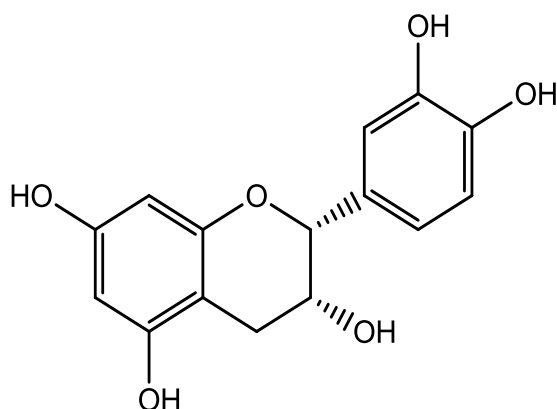


Figura 60 – Estrutura proposta para o FEN-G.

3.1.5.3 Taninos

3.1.5.3.1 Taninos A e B

Os taninos A e B (TAN-A e TAN-B) são sólidos amarronzados amorfos que apresentam a mesma fórmula molecular ($C_{30}H_{24}O_{12}$). Os espectros de RMN 1H destes isômeros evidenciaram sinais semelhantes e são típicos de proantocianidinas tipo A. Observaram-se, nos espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C do TAN-A (Tabela 20), duplos dubletos em $\delta 6,86$ ($J = 8,0$ e $2,0$ Hz) e $\delta 7,02$ ($J = 8,5$ e $2,0$) e dubletos em $\delta 6,84$ ($J = 8,0$ Hz) e $\delta 6,82$ ($J = 8,5$ Hz) referentes aos anéis B e E, respectivamente, de taninos condensados. Por outro lado, no espectro de RMN 1H de TAN-B, evidenciaram-se um multipletto em $\delta 7,04$ e um duplo dubleto em $\delta 6,98$ ($J = 6,0$ e $2,0$ Hz) e dubletos em $\delta 6,86$ e $\delta 6,88$, ambos com $J = 6,0$ Hz, referentes aos anéis B e E deste tanino, respectivamente.

As diferenças mais significativas entre os TAN-A e B foram observadas pelas constantes de acoplamento dos sinais em $\delta 2,56$ (dd , $16,0$ e $8,5$) e $\delta 2,96$ (dd , $16,0$ e $5,5$) de TAN-A e $\delta 2,72$ (dd , $17,0$ e $3,0$) e $\delta 2,94$ (dd , $17,0$ e $4,5$) de TAN-B, referentes aos hidrogênios $3' \alpha$ e β do anel F, respectivamente. Pelas constantes de acoplamento observadas foi possível determinar a configuração α do TAN-A e β do TAN-B.

Tabela 20 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada de TAN-A (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

TAN-A		
Posição	δ_c	δ_H ($J = \text{Hz}$)
Unidade superior		
C		
2	100,3	--
3	67,3	4,13 (<i>d</i> , 3,5)
4	28,9	4,24 (<i>d</i> , 3,5)
A		
5	157,4	--
6	98,2	5,93 (<i>d</i> , 2,5)
7	158,1	--
8	96,7	6,06 (<i>d</i> , 2,5)
9	155,6	--
10	104,2	--
B		
11	131,9	--
12	115,6	6,96 (<i>d</i> , 2,0)
13	145,9	--
14	146,4	--
15	116,7	6,84 (<i>d</i> , 8,0)
16	120,0	6,86 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,0)
Unidade inferior		
F		
2'	83,4	4,74 (<i>d</i> , 8,0)
3'	68,0	4,06 (<i>m</i>)
4' α	28,6	2,56 (<i>dd</i> , 16,0 e 8,5)
4' β		2,96 (<i>dd</i> , 16,0 e 5,5)
D		
5'	156,1	--
6'	96,7	6,08 (<i>s</i>)
7'	151,8	--
8'	106,6	--
9'	150,7	--
10'	103,0	--
E		
11'	130,8	--
12'	115,6	7,14 (<i>d</i> , 2,0)
13'	145,3	--
14'	146,3	--
15'	116,4	6,82 (<i>d</i> , 8,5)
16'	120,6	7,02 (<i>dd</i> , 8,5 e 2,0)

Os dados obtidos foram comparados com os descritos por Lou *et al.* (1999) e Zhang *et al.* (2013) e confirmou-se que a estrutura do TAN-A é a proantocianidina A-1 (Figura 58) e TAN-B a proantocianidina A-2 (Figura 61).

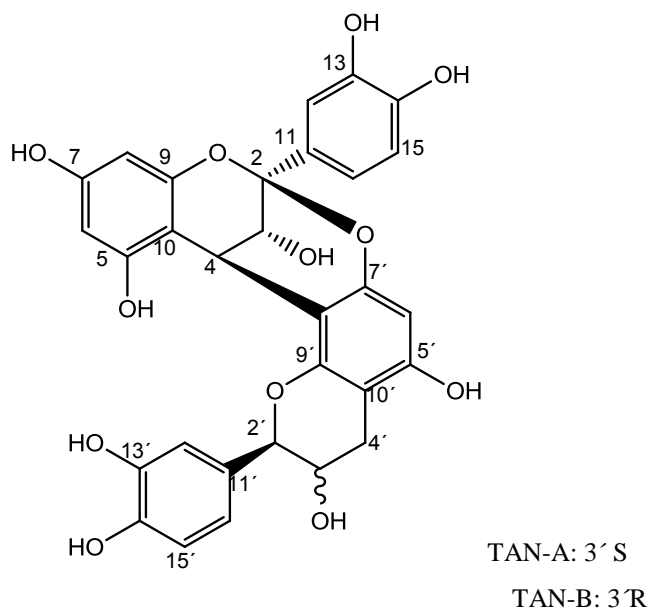


Figura 61 - Estruturas propostas para o TAN-A e TAN-B.

3.1.5.3.2 Tanino C

O tanino C (TAN-C) é um sólido amarronzado amorfo cujo espectro de RMN ^1H evidenciou sinais semelhantes aos observados para FEN-F (epicatequina), porém, observou-se a presença de mais de uma unidade deste flavanol, já que foram evidenciados dubletos de 8,0 Hz em δ 6,81, δ 6,77 e δ 6,74 e duplos dubletos de 8,0 e 2,0 Hz em δ 6,84, δ 7,18 e δ 6,71, referentes aos hidrogênios 5' e 6' dos anéis B, E e H, respectivamente, de flavanóis. Além disso, observaram-se dubletos em δ 3,27 e δ 4,13, ambos com $J = 3,5$ Hz, referentes aos hidrogênios 3 e 4 do anel C e singletos largos em δ 5,69, δ 4,11, δ 4,54, δ 4,38, δ 3,85 e δ 2,83, referentes aos hidrogênios 2, 3 e 4 dos anéis F e I de catequinas, respectivamente. Desta forma, foi possível sugerir a presença de um trímero de epicatequina.

Os dados obtidos nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (Tabela 21) foram comparados com os descritos por Idowu *et al.* (2010) e confirmou-se que a estrutura do TAN-C é o cinnamtannin B-1 (Figura 62).

Tabela 21 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância denominada de TAN-C (11,7 e 2,9 T, CD_3OD , ppm).

TAN-C					
Posição			Posição		
Unidade superior	δ_c	δ_H ($J = \text{Hz}$)	Unidade inferior	δ_c	δ_H ($J = \text{Hz}$)
C			I		
2	99,9	3,27 (<i>d</i> , 3,5)	2	80,3	4,38 (<i>sl</i>)
3	67,2	4,13 (<i>d</i> , 3,5)	3	67,5	3,85 (<i>sl</i>)
4	28,9		4	29,9	2,83 (<i>sl</i>)
A			G		
5	156,8	5,95 (<i>d</i> , 2,5)	5	156,0	
6	98,3		6	96,4	6,09 (<i>s</i>)
7	157,8	6,00 (<i>d</i> , 2,5)	7	155,6	
8	96,5		8	108,8	
9	154,2		9	155,8	
10	104,9		10	100,0	
B			H		
1'	132,5	7,02 (<i>d</i> , 2,0)	1'	133,2	
2'	116,0		2'	115,5	6,80 (<i>d</i> , 2,0)
3'	145,8		3'	145,3	
4'	145,9	6,81 (<i>d</i> , 8,0)	4'	145,5	
5'	116,0	6,84 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,0)	5'	115,7	6,74 (<i>d</i> , 8,0)
6'	119,8		6'	119,4	6,71 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,0)
Unidade central					
F					
2	78,9	5,69 (<i>sl</i>)			
3	72,6	4,11 (<i>sl</i>)			
4	38,3	4,54 (<i>sl</i>)			
D					
5	155,8				
6	96,0	5,79 (<i>s</i>)			
7	151,1				
8	106,4				
9	151,8				
10	106,7				
E					
1'	131,8				
2'	116,7	7,30 (<i>d</i> , 2,0)			
3'	146,3				
4'	146,6				
5'	115,7	6,77 (<i>d</i> , 8,0)			
6'	121,4	7,18 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,0)			

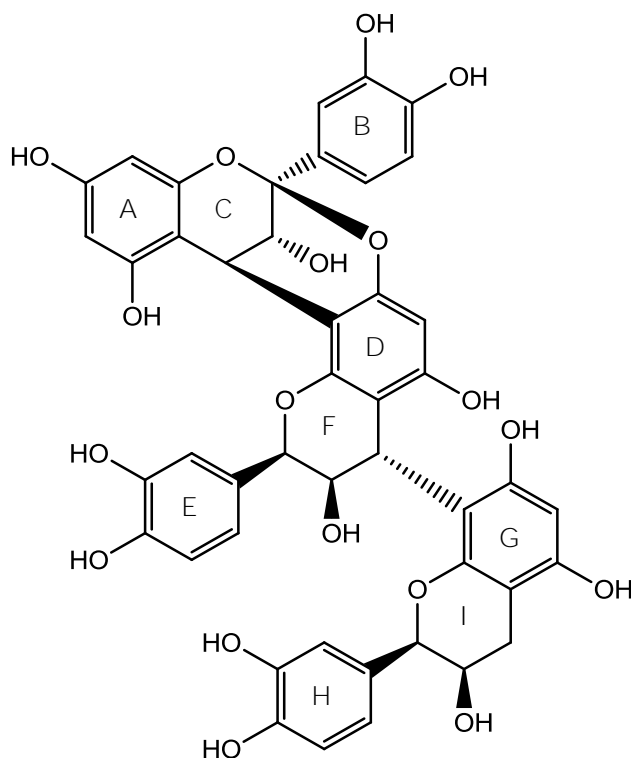


Figura 62 – Estrutura proposta para o TAN-C.

3.1.6 Quantificação de substâncias marcadoras

O projeto BIOTA/FAPESP (Proc. 2009/52237-9, intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas”) tem como proposta investigar novas possibilidades de espécies vegetais para o tratamento de doenças crônicas, em que a eficácia e segurança de uso sejam prioridade. Desde 1993, a Organização Mundial de Saúde expõe a importância do controle de qualidade de fitoterápicos, visando uma preocupação com a saúde da população mundial; desta forma, torna-se imprescindível a determinação de substâncias marcadoras da *S. marginata*, buscando eliminar efeitos indesejáveis e até tóxicos no uso desta espécie, garantindo assim, o uso seguro pela população (CAMARGO & VILEGAS, 2010).

Para a quantificação das possíveis substâncias marcadoras da espécie estudada, foram selecionadas substâncias de diferentes classes químicas. Sendo assim, selecionaram-se a SAP-A por ser uma substância inédita, o TAN-C por ter se apresentado estável quando comparado aos outros taninos isolados neste trabalho,

mesmo em solução e após certo período de armazenamento e o FEN-B, por ter sido isolado em quantidade suficiente para a realização da análise.

Foram monitoradas as transições MRM 559→395 para FEN-B, 1027→513 para SAP-A e 863→711 para TAN-C, para resolução e sensibilidade ideal. As transições monitoradas são referentes ao pico do íon molecular e ao pico base.

As substâncias foram eluídas com um tempo de retenção de 4,2 (FEN-B), 5,7 (SAP-A) e 3,7 (TAN-C) min, como mostra a Figura 63. Observou-se que os picos são bastante simétricos e com largura na base de 8,0 (FEN-B), 11,0 (SAP-A) e 7,0 s (TAN-C). A nitidez dos picos e sua natureza simétrica permitem a integração de processamento e de pico eficiente, com boa resolução de qualquer interferência endógena.

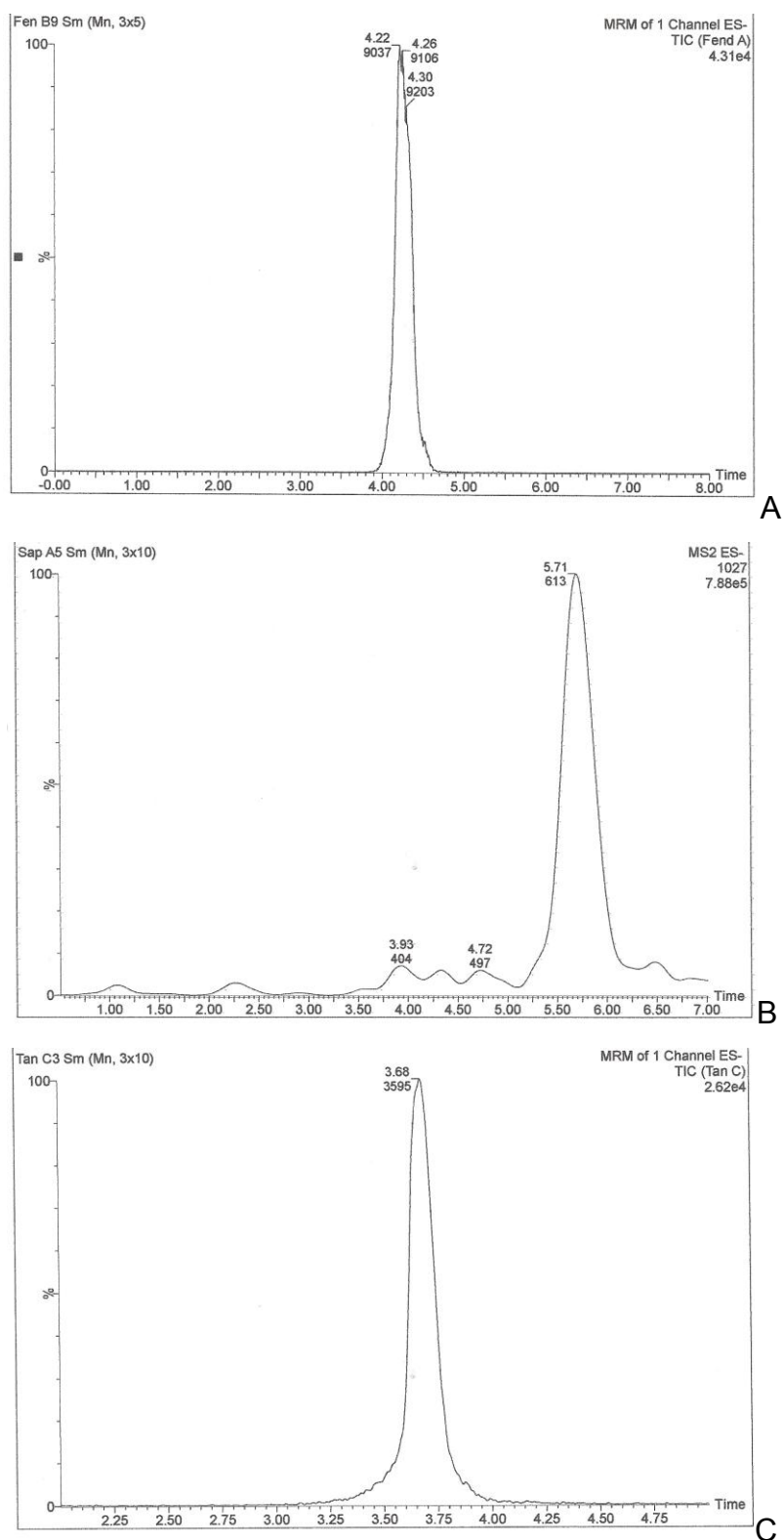


Figura 63 – Tempos de retenção das substâncias FEN-B (A), SAP-A (B) e TAN-C (C), determinadas no UHPLC.

Os coeficientes de determinação das linhas de calibração para as substâncias avaliadas foram obtidos usando regressão linear e foram 0,99 (FEN-B, $y = 466,65x - 9281,3$), 0,98 (SAP-A, $y = 4523,3x - 104517$) e 0,99 (TAN-C, $y = 121,74x - 815,29$).

Após análise dos dados, foram determinados que em 100,0 mg do extrato EtOH 70% de *S. marginata*, há 0,1 mg de FEN-B, 0,8 mg de SAP-A e 2,8 mg de TAN-C.

A escolha da técnica utilizada nesta parte do trabalho foi baseada no fato de que o LC/MS/MS é um sistema de análise que permite identificar e quantificar pequenas concentrações da substância de interesse em uma determinada amostra. Além disso, o detector Xevo TQD, equipado com uma fonte de ionização proven ZSprayTM, é uma importante ferramenta para técnicas analíticas que visem rápidas análises, que sejam fiáveis, reproduzíveis e com alta sensibilidade (MATHER *et al.*, 2012).

3.1.7 Ensaios biológicos

Os ensaios de toxicidade e neurotoxicidade e a avaliação da atividade anti-úlcero-gênica foram realizados pela aluna Larissa Lucena Périco, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, sob supervisão da profa Dra Clélia Akiko Hiruma-Lima. O ensaio de mutagenicidade foi realizado pela aluna Flávia Aparecida Resende, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, sob supervisão da profa Dra Eliana Aparecida Varanda.

O desenvolvimento de novos fármacos requer uma completa investigação da eficácia e segurança de uso. O potencial de risco e benefícios dos extratos e/ou substâncias que poderão ser utilizadas pela população, devem ser cuidadosamente considerados, de modo que os benefícios do uso superem os efeitos colaterais (VARANDA, 2006). Daí, a importância de um estudo inicial em que sejam avaliados a toxicidade, neurotoxicidade e mutagenicidade do extrato da espécie em estudo.

3.1.7.1 Estudo de toxicidade

A administração da dose de 5000,0 mg kg⁻¹ do extrato, considerada como dose limite para avaliação toxicológica aguda (ANVISA, 2004), avaliada tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados quando comparados aos animais do grupo controle que receberam somente salina. O monitoramento diário do peso dos animais (Figuras 64A e B) não indicou variação significativa em relação ao grupo controle (salina) e não ocorreu morte seguida à administração, nem durante o período de observação e pesagem (14 dias pós-tratamento). Além disso, não houve variação significativa do peso dos órgãos vitais monitorados (Tabelas 22 e 23). Portanto, os resultados observados são extremamente importantes, pois não mostraram indícios de toxicidade aguda do extrato avaliado. Desta forma, o uso oral agudo do extrato EtOH 70% de *S. marginata* pode ser considerado seguro.

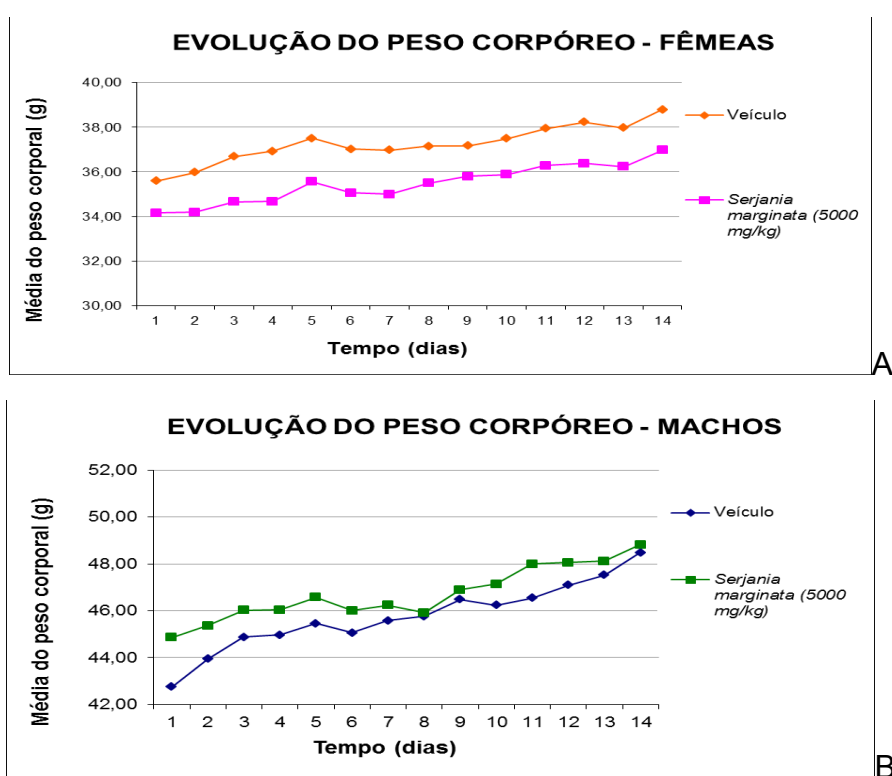


Figura 64 – Peso corpóreo dos camundongos fêmeas (A) e machos (B) ao longo do tempo, tratados com o extrato EtOH 70% de *S. marginata*.

Tabela 22 - Toxicidade em fêmeas - relação peso órgão/peso animal.

Órgão	Veículo (salina, 10,0 ml kg ⁻¹)	<i>S. marginata</i> (5000,0 mg kg ⁻¹)
Coração	4,14±0,08	3,92±0,17
Rins	5,99±0,19	5,97±0,10
Pulmões	5,13±0,20	4,66±0,15
Fígado	13,90±0,36	13,58±0,22
Baço	3,38±0,11	3,50±0,17
# Ovários*100	10,32±1,28	8,83±1,26
Útero	2,29±0,31	2,10±0,34

Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média

ANOVA com teste "t" de Student não-paramétrico *a posteriori*

Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse viável a realização da conversão dos dados em arcoseno e posterior análise estatística

Tabela 23 - Toxicidade em machos - relação peso órgão/peso animal.

Órgão	Veículo (salina, 10,0 ml kg ⁻¹)	<i>S. marginata</i> (5000,0 mg kg ⁻¹)
Coração	3,99±0,07	3,93±0,13
Rins	6,47±0,12	6,68±0,24
Pulmões	4,30±0,12	4,41±0,15
Fígado	13,10±0,20	14,80±1,05
Baço	3,18±0,16	4,34±0,88
Testículos	4,14±0,11	4,13±0,12

Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média

ANOVA com teste "t" de Student não-paramétrico *a posteriori*

3.1.7.2 Estudo de neurotoxicidade

O Rota-Rod é um modelo experimental proposto por Dunham & Miya (1957) que permitiu avaliar a ação do extrato da *S. marginata* na coordenação motora dos animais (relaxamento muscular ou incoordenação motora), avaliando a capacidade do animal se equilibrar sobre uma barra giratória de velocidade constante (CARLINI

& BURGOS, 1979). De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o extrato da espécie em estudo, avaliado na dose de $5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$, não demonstrou alterações no número de quedas dos animais ($2,8 \pm 0,7$), quando comparado ao grupo controle, previamente tratado com solução salina, que apresentou $1,6 \pm 0,5$ quedas durante os 3 min de avaliação experimental. Por outro lado, o grupo tratado com diazepam, utilizado como controle positivo, também quando comparado ao grupo controle, apresentou um aumento expressivo no número de quedas dos animais ($5,7 \pm 0,4$) (Figura 65).

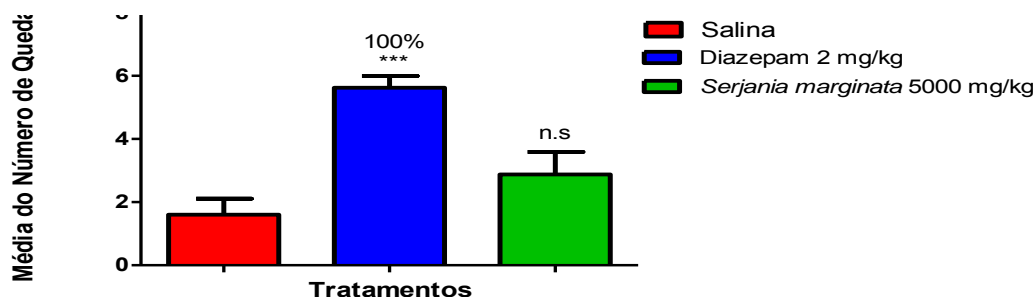


Figura 65 - Número de quedas de camundongos machos tratados oralmente com o extrato EtOH 70% de *S. marginata* na dose de $5000,0 \text{ mg kg}^{-1}$, no modelo de Rota-Rod. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste a posteriori de Dunnett com $***p < 0,001$.

Outro resultado observado foi de que o grupo tratado com a *S. marginata* não demonstrou alterações no início de queda dos animais durante o tempo de avaliação ($40,4 \pm 12,4 \text{ s}$), porém, o diazepam, influenciou significativamente o início das quedas ($1,7 \pm 0,5$). Ambos foram comparados ao grupo controle ($87,2 \pm 25,6$) (Figura 66).

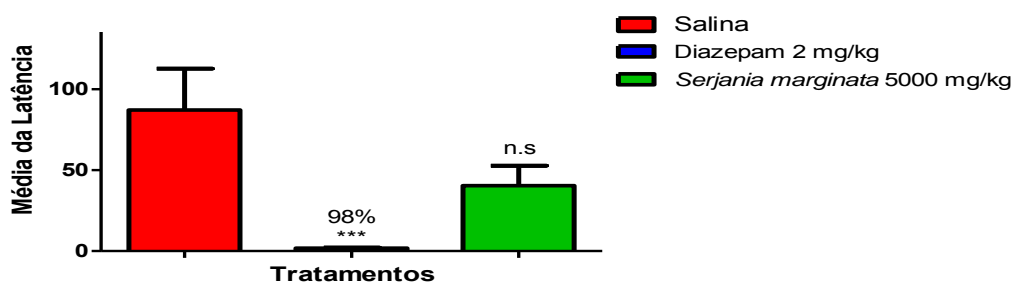


Figura 66 - Início das quedas de camundongos machos tratados oralmente com o extrato EtOH 70% de *S. marginata* na dose de 5000,0 mg kg⁻¹, no modelo de Rota-Rod. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett com ***p<0,001.

Foi possível concluir que o extrato EtOH 70% da *S. marginata* não produziu nenhum efeito relaxante muscular nem alterou a coordenação motora dos animais, indicando ausência de possíveis efeitos neurotóxicos agudos.

3.1.7.3 Mutagenicidade (teste de Ames)

A Tabela 24 mostra o número de revertentes obtidas para cada linhagem de *Salmonella typhimurium*, bem como as razões de mutagenicidade, em experimentos realizados com o extrato EtOH 70% de folhas de *S. marginata*. De acordo com os resultados obtidos, o extrato não apresentou qualquer efeito mutagênico, nas concentrações e linhagens testadas, nos experimentos com ou sem ativação metabólica.

O teste de Ames tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de triagem que estabelece uma estimativa inicial da mutagenicidade de uma determinada amostra (MAZZATORTA *et al.*, 2007). A ausência de mutagenicidade evidenciada neste estudo é um passo positivo no sentido de se determinar, de forma preliminar, a utilização segura da *S. marginata*. Desta forma, considerando o uso popular da planta, a falta de efeito mutagênico em sistemas bacterianos é altamente relevante.

Porém, estudos *in vivo*, utilizando modelos metabólicos próximos aos humanos, são etapas futuras fundamentais nos estudos sobre a segurança do uso da espécie em preparações farmacêuticas.

Tabela 24 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com o extrato EtOH 70% de folhas de *Serjania marginata*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Trata- mentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
mg/placa		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
<i>S. marginata</i>	0.0 ^a	24 ± 8	45 ± 4	158 ± 8	162 ± 12	467 ± 53	563 ± 15	158 ± 19	164 ± 23
	2.5	24 ± 5 (1,0)	29 ± 6 (0,6)	170 ± 18 (1,1)	137 ± 7 (0,8)	524 ± 31 (1,1)	582 ± 8 (1,0)	170 ± 51 (1,1)	158 ± 25 (1,0)
	5.0	25 ± 5 (1,1)	26 ± 9 (0,6)	184 ± 14 (1,2)	149 ± 22 (0,9)	533 ± 66 (1,1)	555 ± 44 (1,0)	110 ± 36 (0,7)	151 ± 16 (0,9)
	10.0	37 ± 14* (1,5)	30 ± 4 (0,7)	185 ± 21 (1,2)	128 ± 17 (0,8)	557 ± 40 (1,2)	484 ± 33 (0,9)	126 ± 20 (0,8)	140 ± 16 (0,9)
	15.0	42 ± 2* (1,8)	29 ± 9 (0,6)	218 ± 25 (1,4)	123 ± 15 (0,8)	515 ± 36 (1,1)	428 ± 36 (0,8)	174 ± 31 (1,1)	144 ± 36 (0,9)
	20.0	41 ± 3* (1,7)	29 ± 7 (0,6)	225 ± 32 (1,4)	135 ± 6 (0,8)	549 ± 48 (1,2)	506 ± 7 (0,9)	143 ± 17 (0,9)	115 ± 21 (0,7)
Ctrol +		1097 ± 115 ^b	1349 ± 155 ^c	1152 ± 128 ^c	1103 ± 62 ^c	2329 ± 173 ^d	1955 ± 156 ^f	1048 ± 93 ^b	1272 ± 76 ^e

*P < 0,05 (ANOVA); M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C+): ^b4-nitro-o-fenilenodiamino (NPD - 10,0 µg/placa - TA98); ^cAzida Sódica (AZS - 1,25 µg/placa - TA100); ^dMitomicina C (MMC - 0,5 µg/ placa - TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/placa - TA98, TA100); ^f2-aminofluoreno (2-AF - 10 µg/placa - TA102), na presença de S9.

A ausência de efeitos tóxicos e mutagenicidade observadas através dos resultados obtidos até o momento viabilizaram a continuidade dos estudos farmacológicos do extrato da *S. marginata*. Desta forma, avaliaram-se a atividade gastroprotetora do extrato frente a diferentes agentes lesivos.

3.1.7.4 Avaliação das úlceras pépticas

3.1.7.4.1 Úlceras gástricas

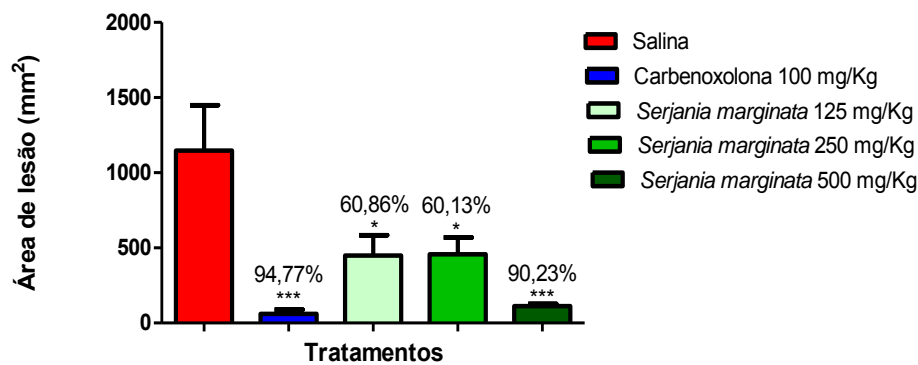
A úlcera decorre de um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa e os fatores de agressão da mucosa gastroduodenal. Fatores como infecção por *Helicobacter pylori*, o largo uso de anti-inflamatórios não-esteróides, o consumo de cigarros e bebidas alcoólicas contribuem para a formação das úlceras gástricas. O tratamento atual envolve a utilização de medicamentos como os antagonistas dos receptores H₂, inibidores da bomba de prótons, antiácidos e os anticolinérgicos, porém, estes fármacos podem ocasionar reações adversas graves, como hepatotoxicidade, trombocitopenia, nefrotoxicidade, dentre outros, além do alto custo direto (diagnóstico e tratamento) e indireto, como a alteração da qualidade de vida dos pacientes (BRUNTON, 1996; BITTENCOURT *et al.*, 2006; DONATINI *et al.*, 2009). Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes anti-ulcerosos, que sejam mais eficazes, mais seguros e de custo mais baixo (VIANA *et al.*, 2013).

3.1.7.4.1.1 Induzidas por etanol absoluto e por indometacina

Houve significativa atividade gastroprotetora do extrato avaliado nos dois modelos testados. No modelo de úlcera induzida por etanol (Figura 67A), quando comparado à carbenoxolona (fármaco referência) (94,8%), o extrato, na dose de 500,0 mg kg⁻¹, foi capaz de inibir 90,2% da úlcera induzida. Porém, quando houve uma diminuição na dose do extrato (250,0 e 125,0 mg kg⁻¹), houve também diminuição da atividade gastroprotetora (60,1 e 60,9%).

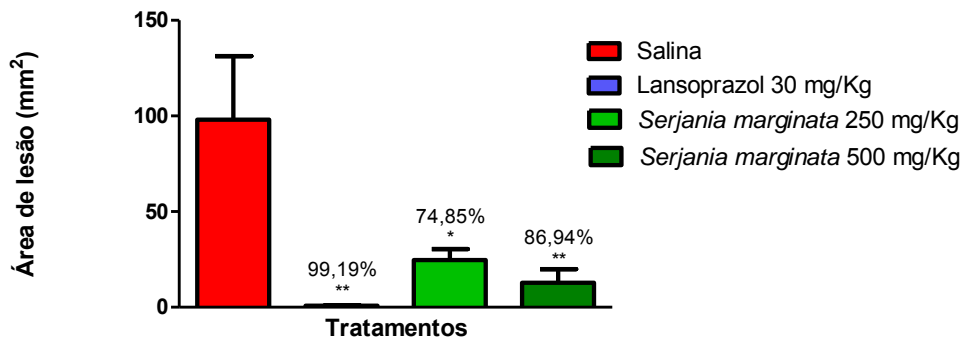
No modelo de úlcera induzida por indometacina (Figura 67B), apesar de a dose de 125,0 mg kg⁻¹ ter sido testada, esta não foi plotada no gráfico por não ter apresentado significância. Neste modelo, o lansoprazol (fármaco referência) apresentou inibição de 99,2% e o extrato, 86,9% na dose de 500,0 mg kg⁻¹ e 74,8% na de 250,0 mg kg⁻¹.

**Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto
(Robert *et al.*, 1979 com modificações)**



A

**Indução de lesão gástrica por Indometacina em ratos
(GUIDOBONO *et al.*, 1997 com modificações)**



B

Figura 67 – Ação do extrato EtOH 70% de *S. marginata* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto (A) e por indometacina (B) em ratos. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (A) e * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (B).

Em estudo realizado por Arruda *et al.* (2009), os extratos clorofórmico e metanólico, obtidos das folhas da *Serjania erecta*, foram avaliados quanto ao

potencial anti-ulcerogênico da planta, frente ao etanol absoluto. Os autores concluíram que ambos os extratos apresentaram efeito gastroprotetor; o extrato metanólico nas doses de 62,5 mg kg⁻¹ (59,0%), 125,0 mg kg⁻¹ (52,0%), 250,0 mg kg⁻¹ (81,0%) e 500,0 mg kg⁻¹ (87,0%). Já o extrato clorofórmico, nas doses de 62,5 mg kg⁻¹ (70,0%), 125,0 mg kg⁻¹ (63,0%); 250,0 mg kg⁻¹ (87,0%) e 500,0 mg kg⁻¹ (99,0%). Os autores descreveram a espécie com significativa ação gastroprotetora e recomendaram, fortemente, a continuidade dos estudos do potencial gastroprotetor da espécie. Baseando-se na literatura e, considerando-se os resultados obtidos nos modelos de úlcera induzidos por etanol e indometacina para *S. marginata*, deu-se continuidade ao estudo do potencial anti-ulcerogênico.

3.1.7.4.2 Úlceras duodenais

As úlceras duodenais apresentam-se com mais frequência do que as gástricas e há fortes evidências do envolvimento da bactéria *H. pylori* na etiopatogênese. Este tipo de úlcera é causado principalmente pelo aumento da acidez, de pepsina e metaplasia gástrica no duodeno e para que um agente anti-úlcera apresente ótimo perfil de eficiência, deve ser eficiente na cicatrização das úlceras duodenais (CARVALHO, 2000; CARBAJAL *et al.*, 2005; YUAN *et al.*, 2006).

Poucos são os experimentos que induzem a úlcera duodenal, quando comparado às gástricas. Selye & Szkabo (1973) demonstraram que a cisteamina administrada oral ou intraduodenalmente em ratos pode provocar úlcera duodenal devido à indução de uma hipersecreção gástrica, portanto, este foi o modelo utilizado no estudo.

3.1.7.4.2.1 Induzidas por cisteamina

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o extrato da *S. marginata*, na dose de 250,0 mg kg⁻¹ (dose selecionada a partir dos resultados obtidos nos modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol e por indometacina), não reduziu de forma significativa a área da lesão provocada pela administração oral

de cisteamina, quando comparado ao grupo controle (tratado com salina) (Figura 68). Desta forma, concluiu-se que a *S. marginata* não foi capaz de proteger a mucosa duodenal contra a lesão provocada por cisteamina, demonstrando que o mecanismo protetor pelo qual atua não é capaz de bloquear as alterações provocadas pela droga referência.

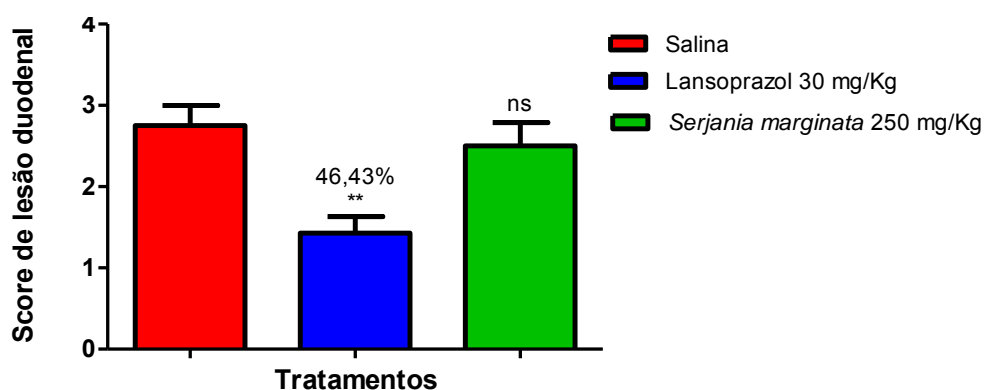


Figura 68 – Ação do extrato EtOH 70% de *S. marginata* no modelo de indução de úlcera duodenal por cisteamina em ratos. Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunn's com $**p < 0,01$.

Não se sabe ao certo qual é a classe de compostos responsável pela atividade gastroprotetora do extrato da *S. marginata*. Arruda *et al.* (2009) determinaram a atividade gastroprotetora de uma espécie desta mesma família, a *S. erecta*. Por outro lado, Cardoso *et al.* (2013) evidenciaram a presença de flavonoides no extrato desta espécie. Os flavonoides são descritos na literatura por apresentarem potencial anti-ulcerogênico, atuando na prevenção ou redução de lesões gástricas induzidas por diferentes agentes ulcerosos (MOTA *et al.*, 2009), portanto, pode-se supor que os flavonoides presentes na *S. marginata* sejam os responsáveis pela atividade determinada, porém, são necessários estudos que comprovem esta hipótese.

Comprovada a atividade anti-ulcerogênica do extrato, fez-se necessário a compreensão do mecanismo de ação envolvido nesta atividade, portanto, optou-se por avaliar o extrato frente ao modelo de ligadura do piloro.

3.1.7.4.3 Mecanismo de ação das úlceras gástricas

3.1.7.4.3.1 Avaliação dos parâmetros do suco gástrico pelo modelo de ligadura do piloro

Ligadura do piloro é um procedimento que tem como objetivo avaliar a ação antissecretória do extrato, através de parâmetros como volume de secreção gástrica, pH e concentração de H^+ (ARRUDA, 2008; LAKSHIMI *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados foi possível sugerir que a ação gastroprotetora do extrato da *S. marginata* não está relacionada com propriedades antissecretórias. Quando os animais foram tratados, por via oral, com o extrato EtOH 70% de *S. marginata*, não houve alterações significativas. Por outro lado, o lansoprazol, controle positivo, aumentou o pH e reduziu o volume do suco gástrico e a concentração de H^+ . Ambos os resultados foram comparados ao grupo salina (controle) (Tabela 25).

Tabela 25 - Efeito do extrato EtOH 70% de *S. marginata* em ratos submetidos à ligadura de piloro oral e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Tratamento	Peso conteúdo gástrico	pH	Volume suco gástrico	Concentração de H^+ (mEq L^{-1})
Salina	3,010 ± 0,4199	1,377 ± 0,0936	3,367 ± 0,4193	8,853 ± 0,4372
Lansoprazol (30,0 mg kg^{-1})	1,609 ± 0,2351	5,927 ± 0,4588***	1,756 ± 0,2892*	3,663 ± 0,3115***
<i>S. marginata</i> (250,0 mg kg^{-1})	3,027 ± 0,5256	1,619 ± 0,1625	3,330 ± 0,6044	8,830 ± 0,5585

Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Os animais tratados com o extrato da planta administrado por via intraduodenal apresentaram alterações significativas no peso do conteúdo gástrico e no volume do suco gástrico, porém, não alterou o pH e nem a concentração de H^+ ; já o lansoprazol, diminuiu o peso do conteúdo gástrico, aumentou o pH e reduziu o volume do suco gástrico, também quando comparados ao grupo salina (Tabela 26).

Tabela 26 - Efeito do extrato EtOH 70% de *S. marginata* em ratos submetidos à ligadura de piloro intraduodenal e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Tratamento	Peso conteúdo gástrico	pH	Volume suco gástrico	Concentração de H ⁺ (mEq L ⁻¹)
Salina	5,451 ± 0,4204	1,409 ± 0,03680	5,829 ± 0,4235	15,98 ± 1,606
Lansoprazol (30,0 mg kg ⁻¹)	1,571 ± 0,1906***	6,060 ± 0,3546***	1,860 ± 0,2112***	8,286 ± 0,8077
<i>S. marginata</i> (250,0 mg kg ⁻¹)	2,983 ± 0,3681***	1,703 ± 0,06716	3,350 ± 0,3417***	15,87 ± 2,359

Os números indicam a proteção em relação ao grupo veículo (controle). Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett com ***p<0,001.

Avaliou-se, neste trabalho, apenas a ação antissecretória do extrato EtOH 70% de *S. marginata*, porém, considerando-se o potencial gastroprotetor da planta, sugere-se a continuidade dos estudos para compreensão do mecanismo de ação envolvido nesta atividade.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DE *Serjania marginata* Casar (SAPINDACEAE) NATIVA E CULTIVADA.

1 INTRODUÇÃO

Os estudos realizados até o momento com a *Serjania marginata* demonstraram que esta é uma planta promissora para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico. O extrato EtOH 70% obtido dessa espécie apresentou potencial gastroprotetor e ausência de toxicidade nos modelos agudos avaliados, além de não ter sido mutagênico, nas concentrações testadas. Desta forma, optou-se por avaliar a época de colheita da planta e os diferentes tratos culturais *ex situ* visando obter maior produção de biomassa e alto rendimento de extrato, similar ao determinado para a mesma espécie nativa do Cerrado coletada em fevereiro de 2011. A literatura indica que, além dos fatores intrínsecos, os ambientais influenciam no rendimento e composição química das plantas.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Coleta e processamento do material vegetal

As folhas da *S. marginata* foram coletadas de plantas nativas e cultivadas *ex situ*. As nativas ocorrem em um fragmento de Cerrado localizado no Assentamento Lagoa Grande, em Dourados-MS, Brasil (21°59'41,8"S e 55°19'24,9"W e altitude de 429 m). As cultivadas originaram-se de um experimento implantado no Horto de Plantas Medicinais (HPM) (22°11'43.7"S e 054°56'08.5"W e altitude de 430 m), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados-MS, onde foram submetidas a diferentes tratos culturais. As temperaturas e precipitações ocorrentes em Dourados – MS nas épocas de coleta encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27 - Temperaturas médias mínima e máxima e precipitações mensais nos meses de coleta das folhas das plantas da *S. marginata*.

Mês	Temp. mín (°C)	Temp. max (°C)	Precipitação (mm/mês)
Fevereiro 2011	21,6	31,5	197,2
Outubro 2011	18,6	31,0	127,7
Dezembro 2011	19,4	32,4	77,6
Fevereiro 2012	20,7	32,7	118,6

Para o cultivo, foram produzidas mudas a partir de sementes e transplantadas em parcelas onde haviam sido incorporados anteriormente os seguintes adubos verdes, com ou sem adição de nitrogênio em cobertura, compondo oito tratamentos: mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) com e sem nitrogênio (N), crotalária (*Crotalaria spectabilis* Roth) com e sem N, feijão-de-porco (*Canavalia ensiforme* L.) com e sem N, além de duas testemunhas (solo sem adição de adubos verdes), sendo uma com N e outra sem N.

O arranjo experimental foi como parcelas subdivididas, no delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições de cinco plantas cada. O N utilizado foi aplicado ao solo na forma de uréia, na dose de 80,0 kg.ha⁻¹, aos 60 dias após o transplântio das mudas.

As coletas das folhas foram realizadas em três épocas do ciclo da planta, tanto das nativas quanto das cultivadas: antes (fevereiro de 2011), durante (outubro de 2011) e após o florescimento (dezembro de 2011), o que correspondeu a 445, 685 e 745 dias de ciclo, respectivamente, das cultivadas. As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 37±2°C e trituradas em moinho tipo Wiley com peneira de 10 mesh (Tabela 28).

Tabela 28 – Folhas de *Serjania marginata* Casar. frescas e secas e resíduo sólido (1-Coletada em fevereiro de 2011; 2-Coletada em outubro de 2011 e 3-Coletada em dezembro de 2011).

	Planta Fresca (g)	Planta Seca (g)	Resíduo Sólido (%)
Planta Nativa	1- 6573,5	1- 3618,0	1- 44,9
	2- 970,0	2- 636,0	2- 34,4
	3- 464,6	3- 411,9	3- 11,3
<i>Stizolobium</i> <i>aterrimum</i> com N	1- 253,5	1- 110,3	1- 56,5
	2- 239,0	2- 84,0	2- 64,8
	3- 248,7	3- 128,5	3- 41,1
<i>Stizolobium</i> <i>aterrimum</i> sem N	1- 345,0	1- 143,9	1- 58,3
	2- 317,0	2- 110,0	2- 65,3
	3- 222,7	3- 108,5	3- 51,3
<i>Crotalaria</i> <i>spectabilis</i> com N	1- 335,3	1- 148,3	1- 55,8
	2- 263,6	2- 98,0	2- 63,0
	3- 244,5	3- 125,3	3- 48,7
<i>Crotalaria</i> <i>spectabilis</i> sem N	1- 345,3	1- 149,6	1- 56,7
	2- 291,9	2- 102,0	2- 65,0
	3- 307,4	3- 158,9	3- 48,3
<i>Canavalia</i> <i>ensiformes</i> com N	1- 360,7	1- 157,1	1- 56,4
	2- 280,7	2- 106,0	2- 76,3
	3- 221,1	3- 109,1	3- 50,6
<i>Canavalia</i> <i>ensiformes</i> sem N	1- 358,2	1- 154,7	1- 56,8
	2- 330,3	2- 116,0	2- 34,6
	3- 258,9	3- 132,7	3- 48,7
Testemunha com N	1- 361,2	1- 171,0	1- 52,6
	2- 338,9	2- 120,0	2- 64,6
	3- 259,5	3- 153,8	3- 40,7
Testemunha sem N	1- 345,2	1- 149,6	1- 56,6
	2- 359,9	2- 138,0	2- 61,6
	3- 234,3	3- 122,7	3- 47,6

2.2 Etapa Química

2.2.1 Extração

Os extratos foram obtidos pelo processo de percolação exaustiva (EtOH 70%) (PRISTA *et al.*, 1995) (Tabela 29). Após a extração, os líquidos foram rotaevaporados sob pressão reduzida e liofilizados para completa remoção da água. Os rendimentos foram calculados.

Tabela 29 – Quantidade de pó, EtOH 70% e tempo de extração da *S. marginata* nativa e cultivada com adubos verdes e nitrogênio (Coletadas em 1-fevereiro de 2011; 2-outubro de 2011 e 3-dezembro de 2011).

Planta nativa/cultivada	Pó (g)	EtOH 70% (mL)	Tempo de extração (dia)
Planta nativa	1- 500,0	1- 33050,0	1- 40
	2- 2,0	2- 890,0	2- 15
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Stizolobium aterrimum</i> com N	1- 78,0	1- 6710,0	1- 27
	2- 2,0	2- 852,0	2- 16
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Stizolobium aterrimum</i> sem N	1- 1,0	1- 366,0	1- 6*
	2- 1,0	2- 380,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Crotalaria spectabilis</i> com N	1- 1,0	1- 479,5	1- 6*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Crotalaria spectabilis</i> sem N	1- 2,0	1- 665,0	1- 5*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Canavalia ensiformes</i> com N	1- 1,5	1- 529,0	1- 6*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
<i>Canavalia ensiformes</i> sem N	1- 1,5	1- 532,0	1- 6*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
Testemunha com N	1- 15,0	1- 3240,0	1- 6*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*
Testemunha sem N	1- 2,0	1- 561,0	1- 5*
	2- 1,0	2- 100,0	2- 1*
	3- 1,0	3- 100,0	3- 1*

*Preparo do extrato (percolação) realizado em microescala.

2.2.2 Determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais

Foram preparadas soluções-estoque dos extratos EtOH 70% da espécie nativa coletada antes (HDA-AF), durante (HDA-DF) e após o florescimento (HDA-PF) e dos padrões, a partir de 10,0 mg das substâncias testes em 10,0 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v). Realizaram-se diluições obtendo-se as concentrações de 6,25; 12,5; 50,0; 100,0 e 200,0 µg.ml⁻¹.

Para a quantificação dos fenólicos, utilizaram-se as concentrações de 6,25; 12,5; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para o ácido gálico (padrão) e 200,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para os extratos. Utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e a leitura foi realizada em 750 nm em leitor de Elisa. Para a quantificação dos flavonoides totais, utilizaram-se as concentrações de 6,25; 12,5; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para a quercetina (padrão) e 200,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para os extratos e utilizou-se metodologia descrita por Jurd & Geissman (1956) com modificações.

Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas.

2.2.3 Produção de biomassa e composição de macro e micronutrientes

As avaliações da produção de biomassa e da composição de macro e micronutrientes da *S. marginata* foram realizadas pela profa Dra Maria do Carmo Vieira da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade da Grande Dourados de Dourados-MS.

Em fevereiro de 2012, após 365 dias das primeiras coletas de folhas da planta cultivada, foi realizada a coleta das partes aéreas das plantas (810 dias de ciclo), dos diferentes tratamentos citados em 2.1, cortando-as rente ao solo. Foram separadas as folhas e os caules e pesados para obtenção das massas frescas, além da área foliar, utilizando-se o software Windias 3 (Windias, Delta-T Devices, Cambridge, UK). Em seguida, os materiais foram rasurados, armazenados em sacos de papel e colocados para secar em estufa com circulação forçada de ar a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$, até massa constante, para obtenção da massa seca. Após a pesagem, as folhas foram pulverizadas em moinho tipo Wiley e os teores de macro e micronutrientes analisados, conforme Malavolta (2006).

Os dados de produção foram submetidos à análise de variância e, quando detectou-se significância pelo Teste F, as médias foram testadas por Tukey, a 5,0% de probabilidade.

2.3 Ensaio biológicos

2.3.1 Atividade antiradicalar

2.3.1.1 Espécie nativa coletada em diferentes épocas

Realizou-se o experimento através do uso do reagente DPPH, com o qual foi preparada uma solução a 0,004% em MeOH:H₂O (8:2 v/v) e esta, misturada às soluções das amostras em análise. Foram preparadas soluções-estoque dos extratos HDA-AF, HDA-DF e HDA-PF e dos padrões, a partir de 10,0 mg das substâncias testes em 10,0 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v). Realizaram-se diluições obtendo-se as concentrações de 6,25; 12,5; 50,0; 100,0 e 200,0 µg.mL⁻¹. A cada 0,02 mL da amostra, adicionaram-se 0,2 mL da solução de DPPH. Após 30 min da reação, as absorbâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro (leitor de elisa – Elx800) no comprimento de onda 517 nm. A solução referência (branco) foi constituída de 0,2 mL de DPPH e 0,02 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v). Os padrões ácido gálico e quercetina foram submetidos ao mesmo procedimento experimental. Os resultados foram expressos em relação ao percentual de inibição, os quais foram calculados utilizando-se a seguinte equação $(\% \Delta_0) = 100 \times (A_0 - A)/A_0$, na qual, $(\% \Delta_0)$ é a porcentagem de sequestro, A_0 é a absorbância da solução de referência e A é a absorbância da amostra após 30 min de reação. A avaliação foi determinada em triplicata.

2.3.1.2 HDA-AF, frações e substâncias isoladas

A atividade antiradicalar do HAD-AF, frações de taninos (FT), saponinas (FS), flavonoides (FF) e das substâncias FEN-A e FEN-B foram avaliadas. Inicialmente, avaliaram-se as concentrações de 6,25, 12,5, 50,0, 100,0 e 200,0 µg.mL⁻¹ para o extrato e frações e 0,625, 1,25, 5,0, 10,0 e 20,0 µg.mL⁻¹ para os flavonoides, para que a concentração inibitória 50% (IC₅₀) de cada amostra fosse localizada, porém, observou-se uma regressão não linear, portanto, as análises foram repetidas

próximas da região do IC₅₀ para avaliar com mais precisão a porcentagem de sequestro de radicais livres. As soluções-estoque (1000,0 µg.mL⁻¹) foram diluídas obtendo-se as concentrações de 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 80,0 e 90,0 µg.mL⁻¹ para o HAD-AF, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0 e 70,0 µg.mL⁻¹ para a FT, 100,0, 250,0, 400,0, 550,0 e 700,0 µg.mL⁻¹ para a FS, 100,0, 175,0, 250,0, 325,0 e 400,0 µg.mL⁻¹ para a FF, todas em MeOH:H₂O (8:2 v/v). Realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.4.4.1. Os IC₅₀ foram calculados por regressão linear e as avaliações realizadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Etapa química

3.1.1 Extração

A *S. marginata* apresentou altos rendimentos dos extratos, destacando-se como o maior o da planta nativa (Tabela 30). Dentre as plantas cultivadas, o maior rendimento médio foi daquelas da testemunha sem N, que superou em 3,0%, à média da testemunha com N, e em 6,5%, à média do tratamento *Canavalia ensiformes* com N, que apresentou o menor valor.

Cabe destacar que considerando os períodos de coleta, as plantas nativas, coletadas em fevereiro e outubro de 2011, apresentaram rendimentos maiores e similares (32,6 e 32,3%, respectivamente). Em geral, os rendimentos da *S. marginata* podem ser considerados altos, comparados aos de outras espécies de plantas medicinais relatados na literatura (ARRUDA, 2008; TANGERINA, 2012).

Tabela 30 – Rendimento dos extratos EtOH 70% de *S. marginata* nativa e cultivada em solo coberto com três adubos verdes, com ou sem nitrogênio, coletadas em fevereiro, outubro e dezembro de 2011, em Dourados-MS.

Tratamentos		Fevereiro	Outubro	Dezembro	Média
		%			
Planta nativa	--	32,6	32,3	23,3	29,4
<i>Stizolobium aterrimum</i>	Com	26,4	21,1	17,9	21,8
	Sem	22,0	21,8	25,3	23,0
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Com	18,1	23,0	24,9	22,0
	Sem	21,4	22,5	28,6	24,2
<i>Canavalia ensiformes</i>	Com	13,5	26,7	23,2	21,1
	Sem	17,0	28,2	28,2	24,5
Testemunha	Com	18,8	27,9	27,0	24,6
	Sem	27,2	27,3	28,4	27,6
Média		21,9	25,6	25,2	

Os maiores rendimentos da planta nativa devem-se, provavelmente, às condições de estresse do ambiente a que elas estavam submetidas, dentre elas, possibilidade de ataques de micro-organismos patogênicos e animais, temperaturas altas e déficit hídrico. Essas condições estimulam a maior produção de metabólitos secundários, que exercem importantes funções ecológicas nos vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários protegem as plantas contra os herbívoros e contra a infecção por micro-organismos patogênicos. Podem agir também como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta. Isso, porque as plantas não conseguem evitar os inimigos potenciais, que são os herbívoros e patógenos, simplesmente deslocando-se. Elas têm de dispor de outras formas de proteção. As defesas vegetais são consideradas um produto da evolução e levaram ao surgimento dos metabólitos secundários, compostos que podem ser tóxicos ou deterrentes para herbívoros ou micro-organismos patogênicos (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Estudando espécies medicinais do gênero *Mikania* de hábito de crescimento trepador, semelhante ao da *S. marginata*, Carollo (2008) também obteve maior quantidade de extrato quando estudou a *Mikania cordifolia* nativa do Cerrado e determinou rendimento de 11,0% para o extrato EtOH 95%; porém, da *M. glomerata* cultivada, o rendimento foi de 8,6%.

Embora o rendimento da *S. marginata* nativa tenha sido maior, observou-se que as plantas cultivadas sob alguns dos tratamentos apresentaram rendimentos próximos ao da espécie nativa. Quando cultivadas com o adubo verde *Crotalaria spectabilis* sem nitrogênio e coletada em dezembro de 2011 ou com *Canavalia ensiformes* sem nitrogênio e coletada em outubro e dezembro de 2011, apresentaram rendimento de 28,6%, 28,2% e 28,2% respectivamente, comparados com os 29,4%, em média, da espécie nativa. Desta forma, pode-se concluir que, apesar de a espécie nativa ter apresentado maior rendimento, as plantas cultivadas sob alguns tratamentos apresentaram rendimento que deve ser considerado relevante, já que, comparando-se com a literatura, foram maiores que os descritos para outras espécies. Além disso, deve-se considerar a importância da busca de tratamentos culturais favoráveis à produção satisfatória do ponto de vista agrônomo (biomassa) a farmacêutico (concentração de compostos ativos) para produção da planta, já que o objetivo final do projeto Biota/FAPESP é a obtenção de extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas, que possam ser utilizados pela população, evitando-se assim o uso contínuo da espécie nativa, o que poderia ocasionar baixas populacionais para a espécie. Recomenda-se, portanto, testar novos tratamentos culturais, incluindo o uso de adubos químicos e orgânicos, de modo a se obter maior produção de massa associada à produção de metabólitos secundários.

Sabe-se que o efeito do cultivo e diferentes tratamentos culturais, dentre eles, a adubação, é bastante contraditório nas plantas medicinais. Diversos trabalhos relatados na literatura mostram efeitos antagônicos na produção de metabólitos secundários em relação às adubações orgânica e química (REIS *et al.*, 2004). Carollo (2008) avaliou o efeito das adubações orgânica (com cama de frango semidecomposta) e química na composição das espécies de *Mikania*, *M. glomerata*,

M. cordifolia e *M. micrantha*, colhidas em duas épocas, em agosto e dezembro. Observou que as plantas de *M. cordifolia* cultivadas com a cama de frango tiveram aumento na concentração de ácido fértrico, ácido 3,5-DCQ e isoquercetina nos dois períodos. O autor destacou o fato de o acúmulo do ácido fértrico ser até 20 vezes maior nas plantas coletadas em dezembro e que por isso a espécie sofre maior influência da época de coleta do que do tipo de adubação utilizada. Na *M. glomerata*, os efeitos foram semelhantes, sendo suas principais substâncias os derivados fenilpropanóides, ácido clorogênico, ácido fértrico, ácido 3,5-DCQ e o flavonoide 3-O-sulfato de *Mikania*.

3.1.2 Determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais

Considerando a hipótese de que os flavonoides são os responsáveis pelo potencial gastroprotetor da *S. marginata* e que um dos objetivos deste estudo foi o de identificar a época de colheita em que a planta tivesse o maior teor desses metabólitos, optou-se por quantificar os teores de fenólicos e flavonoides da espécie em diferentes épocas do ciclo da planta.

Para a determinação de fenólicos totais foram usadas as absorvâncias obtidas para os extratos HDA-AF, HDA-DF e HDA-PF de 0,301, 0,249 e 0,403 nm, respectivamente, usando a equação de regressão de quantificação do ácido gálico ($y = 0,047x + 0,1176$, $R^2 = 0,98$). O HDA-PF apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, seguido do HDA-AF e HDA-DF (Figura 69). Para a determinação do teor de flavonoides foram usadas as absorvâncias obtidas para os extratos HDA-AF, HDA-DF e HDA-PF de 0,152, 0,111 e 0,087 nm, respectivamente, usando a equação de regressão de quantificação da quercetina ($y = 0,0166x + 0,0286$, $R^2 = 0,99$). Ao contrário do que foi determinado para os compostos fenólicos, o HDA-AF apresentou maior concentração de flavonoides (Figura 69).

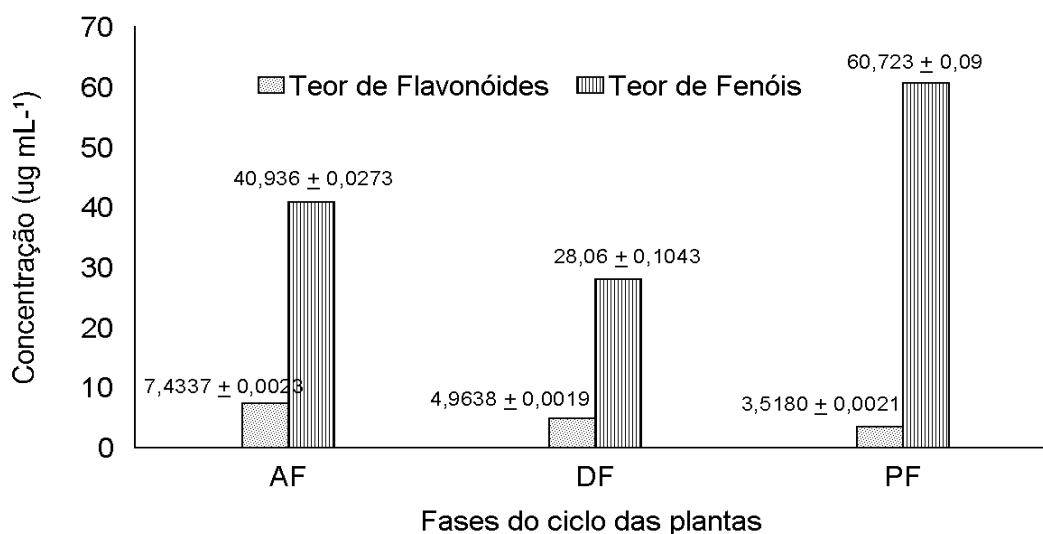


Figura 69 – Teor de flavonoides (μg de quercetina mL^{-1}) e teor de fenóis (μg de ácido gálico mL^{-1}) obtidos em extratos EtOH 70% de *S. marginata* nativa coletada antes (AF), durante (DF) e após o florescimento (PF). Valor médio \pm desvio padrão.

Foi possível sugerir que a melhor época de colheita da *S. marginata* é antes do florescimento da planta (fevereiro de 2011). O maior acúmulo de flavonoides nesse período está relacionado com a função de agirem na proteção contra radiação UV e como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes. Embora esses metabólitos não sejam visíveis ao olho humano, insetos como as abelhas, que enxergam na faixa extrema do UV, respondem às flavonas e aos flavonóis como sinais atrativos, auxiliando-os na localização do pólen e do néctar, mesmo estando localizados nas camadas epidérmicas das folhas e caules das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

3.1.3 Produção e composição de macro e micronutrientes

A importância de avaliar a produção de biomassa e teor de nutrientes das folhas se justifica porque, além de almejar a maior produção de princípios ativos, visa-se uma produtividade de biomassa ótima. Tal possibilidade implica o domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento da espécie. Assim, a estratégia de obtenção de biomassa requer um conhecimento da forma de propagação,

adaptação ao ambiente de cultivo, forma de crescimento, adubação e outros tratamentos culturais (REIS *et al.*, 2004).

A massa seca de folhas e massas frescas e secas dos caules da *S. marginata* cultivada e colhida aos 810 dias foram influenciadas significativamente pela interação entre os adubos verdes usados em cobertura do solo antes do plantio e pelo nitrogênio aplicado ao solo no início do ciclo de cultivo (Tabela 31).

Tabela 31 – Massa seca de folhas e massas frescas e secas de caules de *Serjania marginata* cultivada em sucessão a adubos verdes e nitrogênio.

Adubos verdes	Massa seca folhas		Massa fresca caule		Massa seca caule	
	Nitrogênio (80 kg ha ⁻¹)					
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Sem adubo verde	583,15aA	581,36aA	2344,55aA	1429,92bA	745,19aA	468,22bA
<i>Stizolobium aterrimum</i>	442,84aA	466,81aA	1879,45aA	1904,24abA	700,05aA	751,26abA
<i>Crotalaria spectabilis</i>	369,07aB	643,49aA	1377,03aB	3922,42aA	435,11bB	1337,82aA
<i>Canavalia ensiformes</i>	629,37aA	385,63aB	2204,11aA	1118,57bA	767,99aA	396,74 bA
C.V. (%)	29,47		51,10		49,74	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes, pelos testes Tukey e t, respectivamente (P<0,05).

Dentre os adubos verdes usados, apenas com a *Crotalaria spectabilis* foi necessário usar nitrogênio adicional para se obter maior produção, corroborando com os dados obtidos por Tabaldi *et al.* (2012) de que essa espécie, dentre três adubos verdes usados, foi a que produziu menos massa de parte aérea. Isso, porque ao estudarem a produção da *S. marginata* cultivada após os mesmos adubos verdes e nitrogênio e colhendo as plantas com 240 dias de ciclo, observaram que os adubos verdes *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia ensiformes* foram as culturas de cobertura mais promissoras para o cultivo da planta medicinal, por aumentarem a produção de biomassa e a economia de N. Os efeitos benéficos da cobertura do solo resultaram da baixa relação C/N (18), maior fixação de N por ano, menor perda de nutrientes por lixiviação, favorecimento da manutenção da estrutura do solo, permitindo melhor distribuição das raízes e maior absorção de

nutrientes (FAGERIA, 2007; WUTKE *et al.*, 2014). Os efeitos benéficos dos adubos verdes foi demonstrado em outras culturas, como em cana-de-açúcar (AMBROSANO *et al.*, 2011), em milho (ZANATTA *et al.*, 2007), na sucessão arroz-trigo (MANDAL *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2007), em alface e repolho (FONTANÉTTI *et al.*, 2006) e em milho e tomate (TOSTI *et al.*, 2012).

A massa fresca de folhas e área foliar não foram influenciadas pelos adubos verdes nem pelo nitrogênio, sendo suas médias de 1862,63 g/planta e 48604,53 cm²/planta, respectivamente. Essa ausência de influência significativa pode estar relacionada ao fato de a *S. marginata* ser uma planta nativa, adaptada às condições, sem que os adubos verdes adicionados ao solo como cobertura tenham sido suficientes para ocasionar mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do solo que trariam resposta sobre a produção de folhas das plantas. Provavelmente, a expansão foliar seja característica menos influenciada pelo ambiente do que a massa seca que, ao contrário, variou com o uso dos adubos verdes e o nitrogênio. Além disso, por ser a *S. marginata* uma espécie escandente, com grande número de folhas, as plantas têm plasticidade de desenvolvimento para se adaptarem a uma amplitude de regimes de luz, de tal modo que na mesma planta podem ser encontradas folhas expostas a regimes luminosos diferentes, com folhas crescendo ao sol e outras à sombra (TAIZ & ZEIGER, 2013). Como consequência, em média, a área foliar permaneceu semelhante nos diferentes tratamentos. A adubação verde pode ser considerada prática promissora na produção da *S. marginata* e na preservação do solo, sendo mais recomendável o uso de *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia ensiformes*.

A análise foliar indica a relação entre o crescimento e o estado nutricional da planta. Pode ser considerada normal a planta que apresenta teores e proporções ótimas dos nutrientes nas folhas. A produtividade da maioria das culturas agrícolas aumenta linearmente com a quantidade de fertilizantes que absorvem para garantir a elas uma nutrição adequada, o que é avaliado pelo teor de nutrientes em órgãos específicos como as folhas (FONTES, 2011). Os nutrientes atuam como componentes de compostos orgânicos, no armazenamento de energia, nas

estruturas vegetais, como cofatores enzimáticos e nas reações de transferências de elétrons (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os teores de macro e micronutrientes, avaliados descritivamente, nas folhas da *S. marginata*, variaram pouco em função dos adubos verdes (*Stizolobium aterrimum*, *Crotalaria spectabilis* e *Canavalia ensiforme*) ou o nitrogênio usados como cobertura do solo no cultivo (Tabela 32). Os teores, em geral, foram baixos, comparados com os que Marschner (2011) considera ótimos para o crescimento vegetal. No entanto, como não existem trabalhos na literatura referenciando a composição química da *S. marginata*, pode-se supor que a planta, por ser nativa, é pouco exigente e/ou bastante eficiente no uso dos nutrientes.

Tabela 32 – Teores de macro e micronutrientes de folhas da *S. marginata* cultivada com três adubos verdes (AV), sem (S) ou com (C) nitrogênio (N).

Adubos verdes/Nitrogênio	N %	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
S AV/ S N	2,4	2,3	7,4	7,9	4,1	6,9	901,9	168,1	69,8
<i>S. aterrimum</i> / SN	1,5	2,3	8,3	7,7	4,0	9,3	759,6	166,4	69,0
<i>C. spectabilis</i> /SN	3,1	2,2	8,2	7,9	4,4	24,5	571,7	170,4	66,8
<i>C. ensiformes</i> /SN	2,3	2,7	8,4	7,1	4,1	8,1	658,9	143,6	65,5
S AV/ C N	2,4	2,4	8,6	7,4	3,9	30,5	933,9	160,8	29,0
<i>S. aterrimum</i> / CN	2,5	2,1	8,2	6,9	3,9	11,4	981,2	158,2	60,8
<i>C. spectabilis</i> / CN	2,3	2,4	8,7	7,1	3,7	7,8	988,5	148,0	56,9
<i>C. ensiformes</i> /CN	2,5	2,8	10,5	6,1	3,4	7,1	641,5	112,0	69,5
Teor médio	2,4	2,4	8,5	7,3	3,9	13,2	804,6	153,4	60,9

3.2 Ensaio biológicos

3.2.1 Atividade antiradicalar

3.2.1.1 Espécie nativa coletada em diferentes épocas

Visando comparar os extratos das espécies nativas, coletadas nas diferentes épocas do ciclo da planta, avaliou-se o potencial de sequestro de radicais livres dos mesmos, através do uso do reagente DPPH. Observou-se que todos os extratos apresentaram alta atividade quando comparados aos padrões (Figura 70). O percentual de inibição dos extratos HDA-AF, HDA-DF, HDA-PF e dos padrões ácido

gálico e quercetina, na concentração de $200,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, foram de 78,0%, 72,0%, 78,0%, 79,0% e 81,0%, respectivamente, portanto, foi alta a correlação dos extratos avaliados com os padrões utilizados, destacando-se HDA-AF e HDA-PF, os quais demonstraram que nessas fases do ciclo, a espécie apresenta melhor atividade.

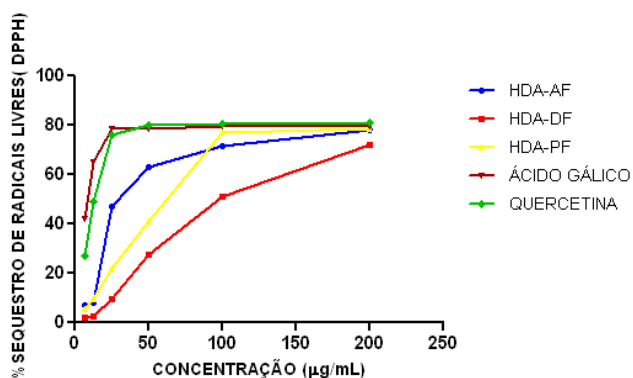


Figura 70 – Capacidade sequestradora de radicais livres dos HDA-AF, HDA-DF e HDA-PF de *S. marginata* e dos padrões ácido gálico e quercetina, sobre o DPPH. Absorbância em 517 nm após 30 min de reação.

A atividade antiradicalar determinada foi, inicialmente, relacionada aos compostos fenólicos, dentre eles, os flavonoides, detectados nos extratos da espécie em estudo. Embora o teor de fenóis e flavonoides tenha sido menor que o determinado em outras espécies do mesmo gênero (SILVA *et al.*, 2011), o seu potencial sequestrante de radicais livres foi significativo; isso pode ser explicado em razão de os compostos fenólicos/flavonoides possuírem um esqueleto propício à atividade antiradicalar, pois são aceptores de radicais livres e foi estabelecido que a posição, grau de hidroxilação, configuração e os tipos de substituintes são fatores importantes para a determinação da atividade antioxidante destes compostos (LARRAURI, *et al.*, 1996; HEIM *et al.*, 2002).

3.2.1.2 HDA-AF, frações e substâncias isoladas

Visando confirmar a hipótese de que os flavonoides poderiam ser os responsáveis pelo potencial sequestrante de radicais livres dos extratos EtOH 70%

das espécies nativas de *Serjania*, realizou-se um estudo biomonitorado com o HDA-AF, em que foram avaliados desde o extrato até algumas das substâncias isoladas. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o HDA-AF apresentou IC₅₀ de 69,6 µg.mL⁻¹, porém, quando o extrato foi fracionado, a fração FT (IC₅₀ = 42,8 µg.mL⁻¹) apresentou melhor atividade, seguida das frações FF (IC₅₀ = 196,2 µg.mL⁻¹) e FS (IC₅₀ = 397,6 µg.mL⁻¹), as quais apresentaram menor potencial sequestrante de radicais livres.

As substâncias isoladas da fração FT foram as proantocianidinas A-1 e A-2 e o cinnamtannin B-1. A atividade antioxidante dessas substâncias, avaliadas pelo método do DPPH, está descrita na literatura. O cinnamtannin B-1, isolado das folhas de *Ixora coccinea*, apresentou um IC₅₀ de 5,3 µg.mL⁻¹ (IDOWU *et al.*, 2010). Por outro lado, as proantocianidinas A-1 e A-2, isoladas do Peanut skin, apresentaram IC₅₀ de 8,5 e 9,7 µg.mL⁻¹, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2013). Os autores citam que as substâncias capazes de sequestrar 50% do radical DPPH em uma concentração menor ou igual a 10,0 µg.mL⁻¹, apresentam forte atividade antiradicalar. Em relação à fração FF, os flavonoides FEN-A e FEN-B foram as substâncias isoladas em quantidade suficiente para avaliação da atividade antioxidante. Nas concentrações testadas, os flavonoides não apresentaram potencial de sequestro significativo.

Conclui-se, desta forma, que os taninos são os maiores responsáveis pela atividade antiradicalar de *S. marginata* com forte potencial sequestrante de radicais livres. Isso, provavelmente pelo grau de hidroxilação desta classe de compostos. O trímero isolado da espécie em estudo apresenta a presença adicional de um grupo 3-OH quando comparado aos dímeros e este pode ser o responsável pela maior atividade antiradicalar desta substância (HEIM *et al.*, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado com a *Serjania marginata* evidenciou resultados bastante promissores considerando o objetivo do projeto de investigar novas possibilidades de espécies vegetais para o tratamento de doenças crônicas. O rendimento do extrato EtOH 70% (32,6%) da espécie nativa do Cerrado sul-mato-grossense foi considerado relevante. Além disso, na triagem fitoquímica, detectou-se a presença de flavonoides, taninos, saponinas, compostos fenólicos e esteróides, sendo essas classes químicas já descritas na literatura por apresentarem diferentes potenciais farmacológicos, como anti-ulcerogênico e anti-inflamatório. A caracterização do extrato evidenciou a presença de quinze substâncias, sendo o (3-O-[[α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-[[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil]ácido oleânico e a apigenina 8-C-(α -5-carboxi-2,6-dideoxiribohexopiranosídeo)-4'-O- β -glicopiranosídeo, descritos pela primeira vez na literatura. Os taninos e os flavonoides C-glicosilados isolados, com a presença de 3-oxoaçúcares e 2-deoxiaçúcares, estão sendo descritos pela primeira vez na família Sapindaceae. Determinou-se que em 100,0 mg do extrato EtOH 70% da *S. marginata* há 0,1 mg de FEN-B, 0,8 mg de SAP-A e 2,8 mg de TAN-C, sendo essas, as possíveis substâncias marcadoras da espécie.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda e barra giratória demonstraram ausência de efeitos tóxicos no uso oral agudo do extrato da planta. Além disso, a planta não apresentou mutagenicidade no teste de Ames. Por outro lado, como o extrato apresentou potencial anti-ulcerogênico, nos modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol e indometacina, este pode ser um excelente candidato para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico. Determinou-se que o potencial gastroprotetor da *S. marginata* não está ligado à ação antissecretória, já que se evidenciou que o extrato não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros do suco gástrico monitorados. Serão necessários outros estudos para determinação do mecanismo de ação envolvido na atividade anti-ulcerogênica desta espécie.

O estudo comparativo da *S. marginata* nativa do Cerrado com a mesma espécie cultivada no Horto de Plantas Medicinais da UFGD, em Dourados-MS,

demonstrou que apesar de as plantas nativas coletadas em fevereiro e outubro de 2011 terem apresentado maiores rendimentos de extrato (32,6 e 32,3%, respectivamente), as plantas cultivadas com o adubo verde *Crotalaria spectabilis* sem nitrogênio e coletada em dezembro de 2011 ou com *Canavalia ensiformes* sem nitrogênio e coletada em outubro e dezembro de 2011, apresentaram rendimentos próximos (28,6%, 28,2% e 28,2% respectivamente), o que demonstra que a planta pode ser cultivada *ex situ*.

Na avaliação da influência da época de coleta das plantas, realizada com a espécie nativa coletada em fevereiro, outubro e dezembro de 2011, observou-se que o HDA-PF apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, seguido do HDA-AF e HDA-DF, sendo o HDA-AF o extrato que apresentou maior concentração de flavonoides. Desta forma, foi possível concluir que a melhor época de colheita da *S. marginata* é antes do florescimento (fevereiro de 2011), já que nesta época a planta produz maior quantidade de flavonoides, os quais são hipoteticamente responsáveis pelo potencial gastroprotetor da planta.

A adubação verde pode ser considerada prática promissora na produção da *S. marginata* e na preservação do solo, sendo mais recomendável o uso de *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia ensiformes*. Por outro lado, os teores de macro e micronutrientes determinados para a espécie foram considerados baixos, sugerindo que a planta, por ser nativa, é pouco exigente e/ou bastante eficiente no uso dos nutrientes.

A avaliação do potencial sequestrante de radicais livres realizado em diferentes épocas do ciclo da planta demonstraram alta correlação dos extratos HDA-AF, HDA-DF, HDA-PF e dos padrões ácido gálico e quercetina avaliados, na concentração de 200,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo os percentuais de inibição de 78,0%, 72,0%, 78,0%, 79,0% e 81,0%, respectivamente, destacando-se o HDA-AF e HDA-PF, os quais demonstraram que nessas fases do ciclo, a espécie apresenta melhor atividade. Além disso, foi possível determinar que os taninos são os maiores responsáveis pela atividade antiradicalar da *S. marginata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part. I: A revision of *Serjania* sect. *Platycoccus*. Mem. **New York Botanical Garden**, v. 67, n. 1, p. 1-93, 1993.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Tecnology**, v. 110, n. 10, p. 865-878, 2008.
- AMBROSANO, E.J.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMAS, E.A.; DIAS, F.L.F.; ROSSI, F.; TRIVELIN, P.C.O.; MURAOKA, T.; SACHS, R.C.C.; AZCÓN, R. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 1-9, 2011.
- ANVISA 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução - RE nº 90/2004. **Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.
- ARAÚJO, F.W.L.; LEMOS, T.L.G.; MILITÃO, J.S.L.T.; FILHO, R.B. 2-O-Metilinositol e proantocianidina de *Magonia glabrata* St. Hill. **Química Nova**, v. 17, n. 2, p. 128-136, 1994.
- ARRUDA, A.P.C.C.B.N. **Avaliação da atividade antiulcerogênica e tóxica dos extratos metanólicos e clorofórmico das folhas de *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae)**. 2008. 71 f. Dissertação (Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu.
- ARRUDA, A.P.C.C.B.N., COELHO, R.G., HONDA, N.K., FERRAZOLI, C., POTT, A., HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): involvement of sensory neurons, endogenous nonprotein sulfhydryls, and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p. 1411-1415, 2009.
- BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. (Eds.) **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória-ES: EDUFES, 2008. 623 p. il.
- BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M do C.B.; AMORIM, L.L.S.S.; PAULA, J.R. de. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 211-215, 2006.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BITTENCOURT, P.F.S.; ROCHA, G.A.; PENNA, F.J.; QUEIROZ, D.M.M. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo *Helicobacter pylori* na criança e adolescente. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 325-334, 2006.

BOURDY, G.; CHAVEZ DE MICHEL, L.R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 189-208, 2004.

BRITO, A.R.M.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Editora Unicamp, v. 1, p. 15–31, 1994.

BRUNTON, L.L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamento de úlceras pépticas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (eds.) **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 663-674, 1996.

CAMARGO, E.E.S., VILEGAS, W. Controle de qualidade dos extratos polares de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 228-232, 2010.

CARBAJAL, D., MOLINA, V., ARRUZAZABALA, L., MÁZ, R. D-002 (Abexol[®]) sobre la úlcera duodenal inducida por cisteamina. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v. 36, n. 3, p. 167-169, 2005.

CARDOSO, C.A.L., COELHO, R.G., HONDA, N.K., POTT, A., PAVAN, F.R., LEITE, C.Q.F. Phenolic compounds and antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 775-782, 2013.

CARLINI, E.A. Pharmacological screening of brazilian plants. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, p. 275-285, 1972.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v.1, n. 1, p. 25-31, 1979.

CAROLLO, C.A. **Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania***. 2008. 228 f.: il. Tese (Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo.

CARVALHO, A.S.T de. Peptic ulcer. **Jornal de Pediatria**, v. 76, supl 2, p. S127-S134, 2000.

CHÁVEZ, M.I., DELGADO, G. Isolation and relay synthesis of 11 α -hydroperoxy diacetyl Hederagenin, a novel triterpenoid derivative from *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic implications. **Tetrahedron**, v. 50, n. 13, p. 3869-3878, 1994.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Cerrado**. Disponível em: <<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots/cerrado/Pages/default.aspx>> Acessado em: 24 abr. 2011.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, apr. 2004.

DAVID, J.P., MEIRA, M., DAVID, J.M., BRANDÃO, H.N., BRANCO, A., AGRA, M.F., BARBOSA, M.R.V., QUEIROZ, L.P., GIULIETTI, A.M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

DIÁRIO DA SAÚDE. SUS tem interesse em 71 espécies de plantas medicinais. Notícia em 06/03/2009. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=sus-tem-interesse-em-71-especies-de-plantas-medicinais&id=3882>>. Acessado em: 9 de set. de 2013

DI STASI, L.C.; COSTA, M.; MENDACOLLI, S.L.; KIRIZAWA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 205-211, 1988.

DONATINI, R.S., ISHIKAWA, T., BARROS, S.B.M., BACCHI, E.M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 89-94, 2009.

DOWD, P.F.; BERHOW, M.A.; JOHSON, E.T. Differential activity of multiple saponins against omnivorous insects with varying feeding preferences. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 5, p. 443-449, 2011.

DUNHAM, N.W.; MYIA, T.S. A note an simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M.F. de.; FRANCO, G.A.D.C. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. **Scientia Agrícola**, v. 64, n. 4, p. 355-363, 2007.

EKABO, O.A.; FARNSWORTH, N.R.; HENDERSON, T.O.; MAO, G.; MUKHERJEE, R., Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 431-435, 1996.

FAGERIA, N.K. Green manuring in crop production. **Journal of Planta Nutrition**, v. 30, p. 691-719, 2007.

FAN, L.; LU, J.; XU, B., GAO, S.; ZHANG, H.; LIU, R. Oleanane saponins from rhizome of *Anemone raddeana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 1, p. 58-64, 2010.

FERNANDES, R.S., COSTA, T.R., MARCUSSI, S., BERNARDES, C.P., MENALDO, D.L., GONZALÉZ, R., PEREIRA, P.S., SOARES, A.M. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

FERREIRA, F. Anvisa reconhece que existem benefícios em produtos fitoterápicos. Notícia em 17/05/2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/jornal-hoje/noticia/2014/05/anvisa-reconhece-que-existem-beneficios-em-produtos-fitoterapicos.html>>. Acessado em: 17 de mai de 2014.

FERRUCCI, M.S. Guias ilustradas de clases. Sapindaceae Juss. **Flora del Valle de Lerma**, v. 7, n. 4, p. 1-45, 2004.

FONTANÉTTI, A.; CARVALHO, G.J.; GOMES, L.A.A.; ALMEIDA, K.; MORAES, S.R.G.; TEIXEIRA, C.M. Adubação verde na produção orgânica de alface americana e repolho. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 146-150, 2006.

FONTES, P.C.R. **Nutrição mineral de plantas: avaliação e diagnose**. Viçosa, MG: O Autor, 2011. 296 p.

FURUTA, T.; KIMURA, T.; KONDO, S.; MIHARA, H.; WAKIMOTO, T.; NUYURA, H.; TSUJI, K.; TANAKA, K. Concise total synthesis of flavone C-glycoside having potent anti-inflammatory activity. **Tetrahedron**, v. 60, n. 42, p. 9375-9379, 2004.

GHEYSEN, K.; MIHAI, C.; CONRATH, K.; MARTINS, J. Rapid identification of common hexapyranose monosaccharide units by a simple TOCSY matching approach. **Chemistry – A European Journal**, v. 14, n. 29, p. 8869-8878, 2008.

GOMES, R.C. **Prospecção biológica por drogas antinociceptivas e antiinflamatórias provenientes do extrato de plantas medicinais “em ensaios pré-clínicos”**. 2007. 61 f. Dissertação (Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto.

GOMIG, F.; PIETROVSKI, E.F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E.M.; CALDERARI, M.T.; GUIMARÃES, C.L.; PINHEIRO, R.M.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 220–224, 2008.

- GUARIM NETO, G. **Plantas medicinais do Estado de Mato Grosso**. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, Brasília. Jacomassi, E. & Piedade, L. H. 1996. 72 p.
- GUARIM NETO, G.; SANTANA, S.R. A família sapindaceae para a flora do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal: os Desafios do Novo Milênio, III. **Anais...Corumbá-MS**, v. 1, n. 1, p. 1-46, 2000.
- GUARIM NETO, G.; SANTANA, S.R.; SILVA, J.V.B. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 327-334, 2000.
- GUENKA, L.C. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiedematogênica de extratos etanólicos de *Zeyheria montana* e *Serjania erecta* em ratos e camundongos**. 2008. 90 f. Dissertação (Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto.
- GUIDOBONO, F.; PAGANI, F.; TICOZZI, C.; SIBILIA, V.; PECILE, A.; NETTI, C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 4, p. 581-586, 1997.
- HAI, W.; CHENG, H.; ZHAO, M.; WANG, Y.; HONG, L.; TANG, H.; TIAN, X. Two new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argentea*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 4, p. 759-764, 2012.
- HATANO, T.; MIZUTA, S.; ITO, H.; YOSHIDA, T. C-glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 7, p. 1379-1383, 1999.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- IDOWU, T.O.; OGUNDAINI, A.O.; SALAU, A.O.; OBUOTOR, E.M.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B.M. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 1092-1098, 2010.
- IOR, L.D.; UGURU, M.O.; OLOTU, P.N.; OHEMU, T.L.; UKPE, A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities and phytochemical screening of the leaves extract of *Paullinia pinnata* (Sapindaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 351-356, 2011.
- JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVEIRA, M.C.de, BOLZANI, V.da S., BERLINK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v. 89, n. 2, p. 114-133, 2011.

JURD, L.; GEISSMAN, T.A. Absorption spectra of metal complex of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, p. 1395-1401, 1956.

KANG, S.S. Saponins from the roots of *Pulsatilla Koreana*. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 42-27, 1989.

KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I de. Agrobiodiversidade nativa, uma riqueza negligenciada: diversidade de plantas alimentícias não convencionais (PANC) na Região Metropolitana de Porto Alegre. In: MING, L.C.; AMOROZO, M.C.de M.; KFFURI, C.W. **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. Recife: NUPPEA, 2012. p. 181 – 203.

KIATKOSKI, E.C.; SILVA, R.Z da; NAVARRO, D.F. Avaliação preliminar do perfil fitoquímico de *Aloe cooperi* Baker e *Plantago major* Lineu. **Anais do XVI EAIC – 26 a 29 de Setembro de 2007 – ISSN: 1676-0018**. Maringá. 3 p.

LAKSHIMI, V.; SINGH, N.; SHRIVASTVA, S.; MISHRA, S.K.; DHARMANI, P.; PALIT, G. Gedunian and photogedunin of *Xilocarpus granatum* show significant antisecretory effects and protect the gastric mucosa of peptic ulcer in rats. **Phytomedicine**, v. 17, p. 569-574, 2009.

LARRAURI, J.; GONI, I.; MARTIN-CARRON, N.; RUPEREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Measurement of health promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 71, p. 515-519, 1996.

LEITE, L.F.C.; FREITAS, R.C.A.; SAGRILO, E.; GALVÃO, S.R.S. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos vegetais depositados sobre Latossolo Amarelo no Cerrado Maranhense. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 1, p. 29-35, 2010.

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, n. 1-2, p. 137–147, 2006.

LIU, H.M.; TSUDA, Y. Chemistry of Oxo-sugars: III. Transformations of 2- and 3-oxoglycosides in a pyridine solution. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 80-87, 1996.

LÔBO, L.T.; CASTRO, K.C.F.; ARRUDA, M.S.P.; da SILVA, M.N.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; ARRUDA, G.N.S.; SANTOS, A.S.; FILHO, A.P. da S.S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LOU, H.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; UCHIDA, M.; TANAKA, H.; OKA, S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. **Phytochemistry**, v. 51, n. 2, p. 297-308, 1999.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo. Ceres. 2006. 638 p.

MANDAL, U.K.; SINGH, G.; VICTOR, U.S.; SHARMA, K.L. Green manuring: its effect on soil properties and crop growth under rice-wheat cropping system. **European Journal of Agronomy**, v. 19, n. 2, p. 225-237, 2003.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 2011. 672 p.

MABRY, T.J.; YOSHIOKA, H.; SUTHERLAND, S.; WOODLAND, S. New C-glycosylflavones from *Phlox drummondii*. **Phytochemical Reports**, v. 10, n. 3, p. 677-679, 1971.

MACÍAS, F.A.; GUERRA, J.O.; SIMONET, A.M.; NOGUEIRAS, C.M. Characterization of the fraction components using 1D TOCSY and 1D ROESY experiments. Four new spirostane saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 615-620, 2007.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MATHER, J., CHAMBERS, E., PLUMB, R., BHATTACHARYA, D. Quantification of exenatide using Xevo TQD. **Waters: The science of what's possible**, p. 1-4, 2012.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 148 p.

MAZZATORTA, P.; TRAN, L. A.; SCHILTER, B.; GRIGOROV, M. Integration of structure-activity relationship and artificial intelligence systems to improve in silico prediction of Ames test mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 1, p. 34-38, 2007.

MEI-NA, J.; GUO-RU, S.; SHENG-NA, T.; NAN-QIN.; WEI, Q.; HONG-QUAN, D. Flavonoids from *Tetrastigma obtectum* enhancing glucose consumption in insulin-resistance HepG2 cells via activating AMPK. **Fitoterapia**, v. 90, p. 240-246, 2013.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

- MINEO, S.; KENICHI, S.; NAOKATA, M.; KIZU, H.; TSUYOSHI, T. Triterpenoid saponins from *Pulsatilla cernua* Spreng. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 1666-1671, 1978.
- MONTRUCCHIO, D.P.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; MONACHE, F.D.; CARVALHO, J.L.S. Chemical compounds and antimicrobial activity of *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 48-52, 2005.
- MOREIRA, R.P.M.; BATISTA, C.A.S.; GUARIM NETO, G. "Check list" de angiospermas da vegetação marginal da estrada Santo Antônio de Leverger – Mimoso, Pantanal de Mato Grosso. **Flovet**, v. 5, n. 1, p. 1-21, 2013.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.
- MOTA, K.S.L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009.
- MOURA, A.C.S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.
- PACIFICO, S.; SCOGNAMIGLIO, M.; ABROSCA, B.; PICCOTELLA, S.; TSAFANTAKIS, N.; GALLICCHIO, M.; RICCI, A.; FIORENTINO, A. Spectroscopic characterization and antiproliferative activity on HepG2 human hepatoblastoma cells of flavonoid C-glycosides from *Petrorhagia velutina*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 12, p. 1973-1978, 2010.
- PÉRICO, L.L.; BESERRA, F.P.; LOPES, J.A.; VIEIRA, S.C.H; VILEGAS, W.; ROCHA, L.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A. Anti-edematogenic activity of hidroalcoholic extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae): role of PGE2. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DRUG DISCOVERY, 3, Araraquara, 2013.
- POLANCO-HERNÁNDEZ, G., ESCALANTE-EROSA, F., GARCÍA-SOSA, K., ACOSTA-VIANA, K., CHAN-BACAB, M.J., SAGUA-FRANCO, H., GONZÁLEZ, J., OSORIO-RODRÍGUEZ, L., MOO-PUC, R.E., PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 31-35, 2012.
- PORTAL DA SAÚDE. Fitoterápicos são alternativa de tratamento no SUS. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/sus-oferece-fitoterapicos-como-alternativa-de-tratamento.html>>. Acessado em: 6 out. 2013.
- POTT, A.; POTT, V.S. **Plantas do pantanal**. Corumbá: EMBRAPA-SPI, 1994. 320 p.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Tecnologia Farmacêutica. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 1. 786 p.

RADLKOFER, L. *Sapindaceae*. **Flora Brasiliensis**, v. 13, n. 3, p. 562-591, 1900.

RALE, M.; SCHNEIDER, S.; SPRENGER, G.A.; SAMLAND, A.K.; FESSNER, W.D. Broadening deoxysugar glycodiversity: natural and engineered transaldolases unlock a complementary substrate space. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, n. 9, p. 2623-2632, 2011.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre, 2004. p. 45-74.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979.

RODAL, M.J.N.; NASCIMENTO, L.M. Levantamento florístico da floresta serrana da reserva biológica de Serra Negra, microrregião de Itaparica, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 481-500, 2002.

RODRIGUES, A.M.S., PAULA, J.E., DEGALLIER, N., MOLEZ, J.F., ESPÍNDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314–317, 2006.

RUBISTEIN, I.; GOAD, L.J.; CLAGE, A.D.H.; MULJEIRN, L.J. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 195-200, 1976.

SANTOS, P.M.L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R.M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SANTOS, M.A.; BARBIERI, A.F.; CARVALHO, J.A.M.; MACHADO, C.J. **O cerrado brasileiro**: notas para estudo. Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar, 2010. 15 p. (Texto para discussão ; 387)

SCHENKEL, P.; WERNER, W.; SCHULTE, K.E. Die Saponine aus *Thinouia coriacea*. **Planta Médica**, v. 57, n. 5, p. 463-467, 1991.

SELYE, H., SZABO, S. Experimental model for Production of perforating duodenal ulcers by cysteamine in rats. **Nature**, v. 244, p. 458-459, 1973.

SHAY, H. KOMAROV, S.A.; FELLS, S.E.; MERAZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v.5, n. 1, p.43-61, 1945.

SHEN, C. C.; CHENG, J. J.; LAY, H. L.; WU, S. Y.; NI, C. L.; TENG, C. M.; CHEN, C. C. Cytotoxic apigenin derivatives from *Chrysopogon aciculatis*. **Journal of Natural Products**, v.75, n. 2, p. 75, 198-201, 2012.

SILVA, R.O.; VITORINO, G.T.; CARDOSO, C.A.L.; BATISTOTE, M. Teores de favonóides e fenóis totais, atividades antioxidante e antibacteriana de extratos das folhas de *Serjania erecta*. **Resumos...** 63^a Reunião Anual da SBPC, 2011.

SILVA, J.L.V., CARVALHO, V.S., SILVA, F.L., BARBOSA-FILHO, J.M., RIGONI, V.L.S., NOUAILHETAS, V.L.A. Gastrointestinal property of *Serjania caracasana* (Jacq.) Willd. (Sapindaceae) on rats. **Pharmacology online**, v.1, n. 1, p. 22-26, 2012.

SINGH, G.; JALOTA, S.K.; SINGH, Y. Manuring and residue management effects on physical properties of a soil under the rice-wheat system in Punjab, Índia. **Soil and Tillage Research**, v. 94, n. 1, p. 229-238, 2007.

SOMNER, G.V.; FERRUCCI, M.S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. 2010. *Serjania* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB020963>> Acessado em: 24 abr. 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógmas Nativas e Exóticas no Brasil, baseado em APG III**, 3. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

SPARG, S.G., LIGHT, M.E., VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219–243, 2004.

SPRENGEL-LIMA, C.; REZENDE, A.A. Sapindaceae do Noroeste Paulista: Lista de Espécies e Chave de Identificação Baseada em Caracteres Vegetativos. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 270-282, 2013. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n2/pt/abstract?inventory+bn02413022013> > Acessado em: 15 mai. 2014.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Products Reports**, v. 25, n. 3, p. 517-554, 2008.

SZABO, S. Animal model for human disease: duodenal ulcer disease. **American Journal of Pathology**, v. 93, n. 1, p. 273–276, 1978.

TABALDI, L.A.; VIEIRA M.C.; ZARATE, N.A.H.; SILVA, L.R.; GONCALVES, W. L.F.;

PILECCO, M.; FORMAGIO, A.S.; PADOVAN, M.P.; GASSI, R.P. Cover crops and their effects on the biomass yield of *Serjania marginata* plants. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 614 - 620, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719 p.

TANGERINA, M.M.P. **Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Machaerium hirtum* (Vell.) Steffed**. 2012. 85 f. Dissertação (Química) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

TOSTI, G.; BENINCASA, P.; FRANESELLI, M.; PACE, R.; TEI, F.; GUIDUCCI, M.; THORUP-KRISTENSEN, K. Green manuring effect of pure and mixed barley – hairy vetch winter cover crops on maize and processing tomato N nutrition. **European Journal of Agronomy**, v. 43, p. 136-146, 2012.

TSUZUKI, J.K., SVIDZINSKI, T.I.E., SHINOBU, C.S., SILVA, L.F.A., RODRIGUES-FILHO, E., CORTEZ, D.A.G., FERREIRA, I.C.P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 577–583, 2007.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VIEIRA, M.C., SOUZA, P.H.N., HEREDIA VIEIRA, S.C., HEREDIA ZÁRATE, N.A.; TABALDI, L.A.; VILEGAS, W. Produção e composição em macro e micronutrientes da *Serjania marginata* Casar cultivada com adubos verdes, sem ou com nitrogênio In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves-RS. **Anais Biodiversidade e desenvolvimento de medicamentos: oportunidades e desafios**. Bento Gonçalves-RS: SBPM, v. 1, 2012.

VIANA, A. F. S. C., FERNANDES, H.B., SILVA, F.V., OLIVEIRA, I.S., FREITAS, F.F.B.P., MACHADO, F.D.F., COSTA, C.L.S., ARCANJO, D.D.R., CHAVES, M.H., OLIVEIRA, F.A., OLIVEIRA, R.C.M. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 316-323, 2013.

VIMOLMANGKANG, S.; SITTHITHAWORN, W.; VANNAVANICH, D.; KEATTIKUNPAIROJ, S.; CHITTASUPHO, C. Productivity and quality of volatile oil extracted from *Mentha spicata* and *M. arvensis* var. *piperascens* grown by a hydroponic system using the deep flow technique. **Journal Natural Medicine**, v. 64, n. 1, p. 31-35, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Germany: Springer, 2001

WUTKE, E.B.; CALEGARI, A.; WILDNER, L.P. Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso. In: LIMA FILHO, O.F.; AMBROSANO, E.J.; ROSSI, F.; CARLOS, J.A.D. **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e práticas**. Brasília, Embrapa. p. 59-168, 2014.

XU, F.; WANG, C.; YANG, L.; LUO, H.; FAN, W.; ZI, C.; DONG, F.; HU, J.; ZHOU, J. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Food Chemistry**, v. 136, p. 94-99, 2013.

YU, L.; WANG, X.; WEI, X.; WANG, M.; CHEN, L.; CAO, S.; KANG, N.; QIU, F. Triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and their inhibitory activity on human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 16, p. 5232-5238, 2012.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v.3, n. 2, p. 80-89, 2006.

ZANATTA, J.A.; BAYER, C.; DIECKOW, J.; VIEIRA, F.C.B.; MIELNICZUK, J. Soil organic carbon accumulation and carbon costs related to tillage, cropping systems and nitrogen fertilization in a subtropical Acrisol. **Soil and Tillage Research**, v. 94, n. 2, p. 510-519, 2007.

ZHAO, J.; PAWAR, R.S.; ALI, Z., KHAN, I.A. Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 289-292, 2007.

ZHU, D.; YANG, J.; DENG, X-T.; LAI, M-X.; WANG, Q. A new C-glycosylflavone from *Pogonatherum crinitum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, n. 3, p. 184-186, 2009.

ZHANG, H.; YE, R.; YANG, Y.; MA, C. Structures, antioxidant and intestinal disaccharidase inhibitory activities of A-type proanthocyanidins from Peanut skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8814-8820, 2013.

ZHONG, X-N.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKUSHI, A.; TAKEDA, Y. Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 943-946, 1997.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.