

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Mayara Maio Luiz

Prospecção química da parte aérea da espécie aquática
Eichhornia crassipes

ARARAQUARA
2019

MAYARA MAIO LUIZ

Prospecção química da parte aérea da espécie aquática
Eichhornia crassipes

Monografia apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Isabele R. Nascimento

Araraquara

2019

Folha de aprovação

Dedico este trabalho à minha bisavó, Irene da Rocha Cacilha (in memorian), que não pôde estar ao meu lado neste momento, mas continua sendo minha maior fonte de força, inspiração e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por acreditarem em mim e me ajudarem a concretizar esse sonho. Além de todo amor, carinho e incentivo recebido durante essa jornada árdua.

Aos meus queridos irmãos, que sempre estiveram presentes mesmo longe, dividindo nossas conquistas e compartilhando nossas experiências.

À minha orientadora Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pela sua dedicação e confiança durante a orientação.

Aos companheiros de laboratório, Camila, Walter, Lara, Gabriela, Leonardo e Paulo, por todos os momentos de aprendizados e risadas. E em especial à Mayra, pela paciência durante todo o processo de aprendizado.

Aos meus queridos amigos, pela oportunidade de convívio e pela troca de conhecimentos durante todos esses anos, além das risadas e histórias compartilhadas. Em especial à Flávia, Gabriela, Isabela, Thais e Thales.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários do Instituto de Química que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Ao Instituto de Química, pelo espaço cedido e todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que fosse possível realizar este trabalho.

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu. ”

Érico Veríssimo

RESUMO

Eichhornia crassipes, uma macrófita aquática de flutuação livre, é uma espécie tropical pertencente à família Pontederiaceae. Por possuir uma alta taxa de crescimento e distribuição cosmopolita, é considerada uma espécie invasora em corpos aquáticos, tais como lagos e rios. Devido a sua alta capacidade de acumular metais pesados e outros poluentes, tem sido amplamente estudada por pesquisadores como um meio alternativo de descontaminação de águas, através de fitorremediação. Assim, com o intuito de estudar os metabólitos secundários produzidos por essa espécie, o extrato etanólico foi preparado e analisado por técnicas cromatográficas (CCD, CLAE-DAD) e espectroscópicas (RMN 1D e 2D). A fração hidroalcoólica foi submetida a separação em CC utilizando Sephadex LH-20 e metanol, possibilitando o isolamento e identificação estrutural de seis substâncias: 1,4-diidroxi-2-metoxibenzeno, ácido 3,4-diidroxi benzoico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido chiquímico e uridina.

Palavras-chave: *Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae, produtos naturais.

ABSTRACT

Eichhornia crassipes, a free-floating aquatic macrophyte, is a tropical species of Pontederiaceae family. Due to its high growth rate and cosmopolitan distribution, it is considered an invasive species in aquatic bodies such as lakes and rivers. Because of its high capacity to accumulate heavy metals and other pollutants, it has been widely studied as an alternative method of water decontamination by phytoremediation. Thus, in order to study the secondary metabolites produced by this species, the ethanolic extract was prepared and analyzed by chromatographic (TLC, HPLC-DAD) and spectroscopic (1D and 2D NMR) techniques. The hydroalcoholic fraction was separated by CC using Sephadex LH-20 and methanol, allowing the isolation and structural identification of six compounds: 1,4-dihydroxy-2-methoxybenzene, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-benzoic acid, caffeic acid, shikimic acid, and uridine.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae, natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Eichhornia crassipes</i>	15
Figura 2 - Natureza invasiva de <i>E. crassipes</i>	16
Figura 3 – Substâncias derivadas do fenaleno isoladas de <i>E. crassipes</i>	18
Figura 4 - Substâncias identificadas em <i>E. crassipes</i> pelo grupo de pesquisa	19
Figura 5 - Preparação e obtenção dos extratos de <i>E. crassipes</i>	24
Figura 6 - Separação da fração hidroalcoólica da parte aérea de <i>E. crassipes</i>	24
Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H da fração 06 em DMSO- d_6 (600 MHz).....	27
Figura 8 - Cromatograma semipreparativo das substâncias isoladas da fração 06	28
Figura 9 - Substâncias isoladas de <i>E. crassipes</i>	29
Figura 10 - Representação estrutural da substância 1	29
Figura 11 - Representação estrutural da substância 2	31
Figura 12 - Representação estrutural da substância 3	32
Figura 13 - Representação estrutural da substância 4	33
Figura 14 - Representação estrutural da substância 5	35
Figura 15 - Representação estrutural da substância 6	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Extratos obtidos de <i>E. crassipes</i>	26
Tabela 2- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 1 (<i>J</i> em Hz, D_2O , 600 MHz)	30
Tabela 3- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 2 (<i>J</i> em Hz, D_2O , 600 MHz)	32
Tabela 4- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 3 (<i>J</i> em Hz, CD_3OD , 600 MHz)	33
Tabela 5- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4 (<i>J</i> em Hz, CD_3OD , 600 MHz)	34
Tabela 6- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 5 (<i>J</i> em Hz, CD_3OD , 600 MHz)	35
Tabela 7- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 6 (<i>J</i> em Hz, CD_3OD , 600 MHz)	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
MeOH	Metanol
Me ₂ CO	Acetona
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
<i>t</i>	Tripleto
TFA	Ácido Trifluoroacético
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Eichhornia crassipes</i>	15
1.1.1 Utilizações e potenciais	16
1.1.2 Metabólitos secundários	17
2.OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos específicos	20
3.PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 Solventes	21
3.2 Equipamentos	21
3.3 Análises cromatográficas	22
3.4 Coleta da espécie vegetal de <i>E. crassipes</i>	22
3.5 Obtenção e preparação do extrato vegetal	22
3.6 Triagem química dos extratos vegetais	22
3.7 Fracionamento dos extratos vegetais e elucidação ou determinação estrutural das substâncias isoladas	23
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Triagem química dos extratos vegetais	26
4.2 Avaliação do perfil metabólico por CLAE-DAD e RMN de ¹ H do extrato e frações hidroalcoólicas	26
4.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>E. crassipes</i>	28
4.3.1 Uridina (1)	29
4.3.2 Ácido chiquímico (2)	31
4.3.3 Ácido 3,4-diidroxibenzoico (3)	32
4.3.4 Ácido cafeico (4)	33

4.3.5 Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (5)	35
4.3.6 1,4-diidroxi-2-metoxibenzeno (6)	36
5.CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	42

1. INTRODUÇÃO

Plantas, microrganismos e animais são utilizados desde a antiguidade como fonte de substâncias com potencial farmacológico, inseticida, alucinógeno, entre outros.¹ Na Grécia Antiga, por exemplo, extratos vegetais eram ingeridos em rituais para execuções. Já nas civilizações indígenas observa-se o uso da bixina como corante para fins religiosos, estéticos e de proteção, e de espécies de *Strychnos* e *Chondodendron* na obtenção dos curares. Além disso, há relatos da utilização de ópio pelos sumérios, extraído dos bulbos da papoula (*Papaver somniferum*), como sonífero e analgésico. Dessa espécie vegetal foi isolada a morfina, analgésico utilizado até hoje em caso de dores severas.^{1,2}

Os metabólitos obtidos de fontes naturais possuem uma alta complexidade e diversidade molecular, além de uma grande especificidade e seletividade nas atividades biológicas.³ Devido a essas características, os produtos naturais provenientes, principalmente de plantas, contribuíram com o avanço da medicina. A descoberta de compostos como os salicilatos, encontrado nas plantas de *Salix sp*, artemisinina isolada da *Artemisia annua*, que apresenta atividade contra a malária e Paclitaxel (Taxol®), fármaco anticancerígeno isolado de plantas da espécie *Taxus brevifolia*, são exemplos do avanço dos estudos voltados aos produtos naturais.^{4,5}

A química de produtos naturais desempenha um papel importante nos campos de conhecimentos científicos e nas atividades econômicas.⁶ Conforme as técnicas de isolamento e de caracterização cromatográfica, espectroscópica e espectrométrica foram evoluindo, o conhecimento a respeito do metabolismo secundário dos organismos vivos foi se tornando mais abrangente.^{2,6}

Apesar dos inúmeros produtos sintéticos presentes no mercado, os produtos naturais provenientes de plantas e outros organismos vivos ainda continuam sendo alvo de estudos, como é o caso da espécie vegetal *Eichhornia crassipes*.⁷

1.1 *Eichhornia crassipes*

A espécie *Eichhornia crassipes* pertence à família Pontederiaceae, sub-família Trollioideae e tribo Eichhornieae, e é conhecida popularmente como aguapé, jacinto-da-água, mururé, rainha-do-lago e orelha-de-veado (Figura 1). A espécie é originalmente nativa de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, no entanto, seu apelo ornamental levou à sua introdução aos demais continentes, estando presente em mais de 50 países.⁸

Figura 1 - *Eichhornia crassipes*



Fonte: invasive.org

É uma macrófita de flutuação livre, que se prolifera rapidamente, formando “tapetes” (Figura 2) que dificultam a entrada de luz nos corpos aquáticos, diminuindo também a concentração de oxigênio e nutrientes dissolvidos e, portanto, pode causar efeitos negativos no meio ambiente, na saúde humana e no desenvolvimento de atividades econômicas.^{9,10,11} Devido a sua natureza invasiva e infestante, se tornou uma planta daninha em alguns corpos aquáticos, como o lago Victoria (África)¹², sendo listada dentre as 100 piores espécies invasoras do mundo de acordo com a União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN).¹³

Figura 2 - Natureza invasiva de *E. crassipes*



Fonte: invasive.org

1.1.1 Utilizações e potenciais

Por ser uma planta de fácil obtenção, com elevada taxa de crescimento e baixo custo, *E. crassipes* é alvo de estudos por muitos pesquisadores como uma alternativa para solucionar os problemas relacionados à contaminação de águas por metais pesados.¹⁴ A fitorremediação envolve o uso de plantas na descontaminação ambiental, em meios como corpos aquáticos e solos, e possui vantagens quando comparada com métodos físico-químicos tradicionais, além de ser ambientalmente sustentável e de baixo custo.^{15,16}

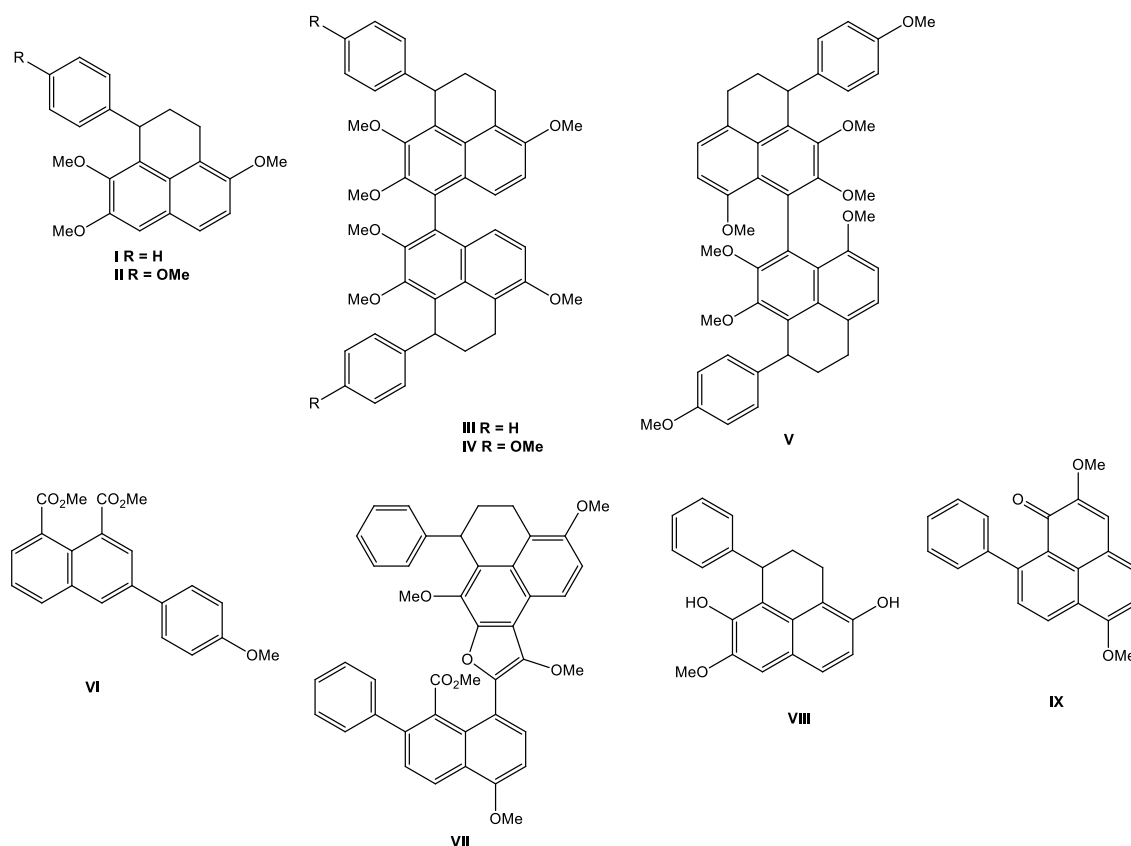
Na literatura são descritos vários trabalhos que apresentam o potencial das macrófitas aquáticas como espécies fitorremediadoras de metais. Em 2017, Romero-Hernández e colaboradores analisaram a tolerância e a hiperacumulação de uma mistura de íons metálicos (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2}) pelas plantas aquáticas *Typha latifolia*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes* e *Myriophyllum aquaticum* e obtiveram resultados promissores, onde a porcentagem de remoção após cinco dias de exposição para *E. crassipes* foi de 97,9% e por *M. aquaticum* de 94,9%, a partir de uma concentração de 1 mg.L^{-1} de Cu e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para os outros metais.¹⁴ Outras pesquisas com macrófitas dos gêneros *Eichhornia*, *Thypha* e *Myriophyllum* mostraram a acumulação de Cu e Zn nas raízes, e a translocação de Pb para as folhas.¹⁷ Diante desses resultados, é possível observar a grande capacidade dessas macrófitas no

processo de fitorremediação. No entanto, até o presente momento, não há trabalhos descritos na literatura que relate os possíveis metabólitos secundários que podem contribuir para esse processo.

A alta concentração de hemicelulose (30-35% da massa seca) obtida da biomassa de *E. crassipes*, a torna uma fonte promissora para estudos de produção de energia, como bioetanol, biogás e hidrogênio.¹⁸ Os nutrientes da planta permitem a produção de ração para alguns animais, como ruminantes e porcos, além de se mostrarem eficazes como adubo em plantações de tomate e batata.^{11,19} Estudos também demonstram a potencialidade dessa macrófita em tratamento de águas contaminadas por fósforo e nitrogênio.²⁰

1.1.2 Metabólitos secundários

Além dos estudos de *E. crassipes* a respeito de fitorremediação e produção de energia, há estudos para a identificação e o isolamento dos metabólitos secundários, os quais foram identificados compostos como flavonoides, terpenoides, esteróis, alcaloides e glicosídeos.¹⁹ Na literatura são encontrados trabalhos como o de Della Greca e colaboradores^{21,22}, nos quais são descritas substâncias aromáticas derivados do fenaleno, que possuem grande importância pelo seu papel como fitoalexinas e fitoanticipinas, capazes de atuarem no sistema de defesa da planta (Figura 3).

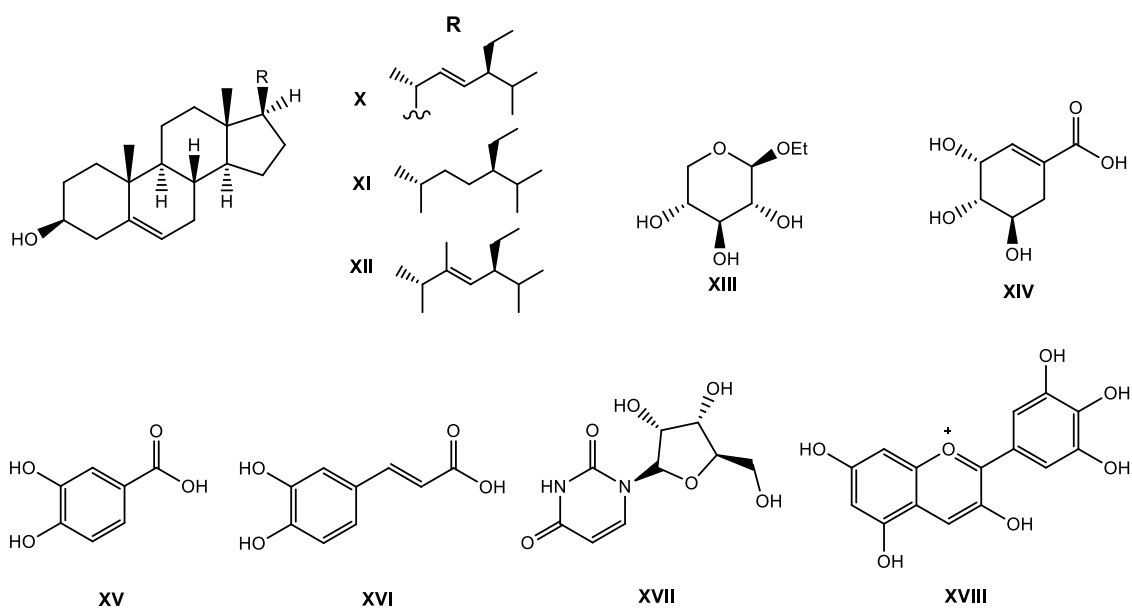
Figura 3 – Substâncias derivadas do fenaleno isoladas de *E. crassipes*

Fonte: Adaptado de Della Greca e colaboradores (2008 e 2009)^{22,23}

Em 2010, Shanab e colaboradores estudaram os efeitos alelopáticos de *E. crassipes*, e evidenciaram a presença de aleloquímicos responsáveis pela inibição e crescimento de outras cepas patogênicas de bactérias, fungos e algas.²⁴ Essas substâncias, derivadas de ftalatos, são complexas para serem sintetizadas. Os autores relataram ainda a presença de alcaloides, compostos fenólicos e terpenóides no estudo fitoquímico da macrófita.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, até o momento, resultaram no isolamento e identificação de nove substâncias (Figura 4): stigmasterol (**X**), sitosterol (**XI**), campesterol (**XII**), etil β -xilopiranosídeo (**XIII**), ácido chiquímico (**XIV**), ácido protocatecuico (**XV**), ácido cafeico (**XVI**), uridina (**XVII**) e delfinidina (**XVIII**).^{25, 26, 27} É importante ressaltar que o ácido chiquímico é o precursor da síntese do medicamento oseltamivir conhecido comercialmente como Tamiflu, um eficiente inibidor do vírus da gripe humana H1N1 origem suína, vírus da gripe sazonal tipo A e B e vírus da gripe aviária H5N1.^{25,28}

Figura 4 - Substâncias identificadas em *E. crassipes* pelo grupo de pesquisa



Tendo em vista a potencialidade de *E. crassipes* nos processos de fitorremediação e o baixo número de estudos na literatura relacionados à composição química dessa espécie vegetal, este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de identificar metabólitos secundários produzidos por essa macrófita visando contribuir com a comunidade científica com a descoberta de novas substâncias, agregando maior valor à planta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Realizar a prospecção química da parte aérea (folhas e pecíolos) da espécie vegetal *Eichhornia crassipes*, através do estudo dos extratos orgânicos, por técnicas de separação, isolamento e identificação de metabólitos secundários.

2.2 Objetivos específicos

Obter os extratos orgânicos brutos da parte aérea de *E. crassipes* e realizar a triagem química dos mesmos por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H . Submeter esses extratos a processos de fracionamento e isolamento das substâncias através de técnicas cromatográficas adequadas. E por fim, elucidar ou determinar as estruturas das substâncias isoladas utilizando técnicas espectrométricas de RMN unidimensionais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Solventes

Os solventes deuterados (CD_3OD , CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ e D_2O) utilizados nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram da marca Sigma-Aldrich™ e CIL®. Os solventes empregados nos processos cromatográficos foram de graus PA e HPLC, sendo eles acetonitrila, acetona, butanol, clorofórmio, etanol e metanol das marcas Merck®, Neon® e J.T.Baker®. A água foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm à 25 °C).

3.2 Equipamentos

Para a concentração dos extratos e frações foi utilizado evaporador rotativo da Büchi® R-114 (banho de aquecimento B-480) sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo Büchi® B-169 e sistema de refrigeração.

As amostras foram pesadas em balanças da Denver Instruments APX200 (analítica) e Gehaka BG2000 (semi-analítica).

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando cromatógrafo JASCO® com controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 Plus, injetor automático AS-2055 Plus, detector de arranjo de fotodiodos MD-2018 Plus e detector de dicroísmo circular CD-2095. No modo analítico foi empregada coluna C-18 ODS (Zorbax RX-C18, 4,6 × 250 mm, 5 µm, Agilent®), enquanto que no modo semi-preparativo foi utilizada coluna C18 ODS (Zorbax RX-C18, 9,4 × 250 mm, 5 µm, Agilent®).

Os espectros de RMN unidimensional (^1H , ^{13}C , NOESY) e bidimensional (HSQC e HMBC) foram adquiridos em espectrômetro Bruker, modelo Avance III HD 600 (14,1 T), com frequência de 600 MHz para o núcleo de ^1H e de 151 MHz para o ^{13}C . Todas as amostras foram analisadas em uma sonda criogênica de 5 mm com detecção inversa e três canais de aquisição (^1H , ^{13}C e ^{15}N) na temperatura de 23 °C

3.3 Análises cromatográficas

As amostras analisadas por CLAE-DAD foram previamente solubilizadas em metanol (10 mg.mL^{-1}) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C18 ODS (500 mg, 3,0 mL, Chromabond®) e filtradas em microfiltro de PVDF (13 mm, $0,22 \mu\text{m}$, Exacta).

3.4 Coleta da espécie vegetal de *E. crassipes*

As macrófitas *E. crassipes* foram coletadas no Clube Náutico (Rodovia Antônio Machado de Sant’anna, Km 63) no estado de São Paulo. A identificação da espécie foi realizada pela Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral, e uma exsicata está depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sob o nº 164949 e nomeação *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.

3.5 Obtenção e preparação do extrato vegetal

As plantas foram lavadas em água corrente e separadas em parte aérea (folhas e pecíolos) e raízes. O material foi seco em 30°C , triturado em moinho de facas e posteriormente submetido a extrações com solventes orgânicos de diferentes polaridades (acetona, butanol, metanol e etanol).

O material vegetal foi extraído três vezes com cada solvente, na proporção de 4 g de material vegetal para 80 mL de solvente, sendo uma extração a cada três dias em temperatura ambiente. Posterior a extração, os solventes foram removidos sob pressão reduzida em um evaporador rotativo.

3.6 Triagem química dos extratos vegetais

Os extratos brutos obtidos foram analisados por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H .

A avaliação química por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) foi realizada utilizando placas de sílica gel e fase móvel $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 9:1, hexano:AcOEt 7:3, tolueno: Me_2CO 3:2 e AcOEt:MeOH 1:1.

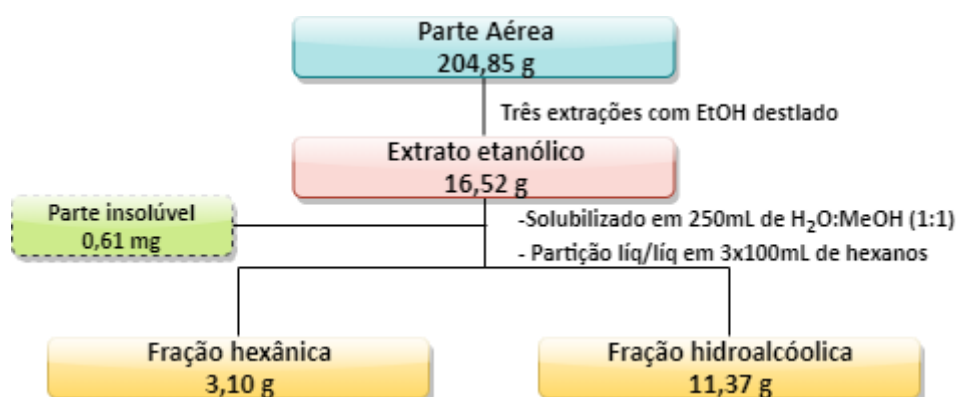
Para as análises por CLAE-DAD em gradiente exploratório, as amostras foram previamente solubilizadas em MeOH (100%) e submetidas a um “clean up”. Após este procedimento, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 mg.mL^{-1} e foram armazenadas em frascos para injeção.

O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica C-18 ODS, com injeção de $40,0 \mu\text{L}$ e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O:ACN}$ (0,1% HOAc) 70:30 à 0:100 v/v por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e λ inicial de 200 até 510 nm.

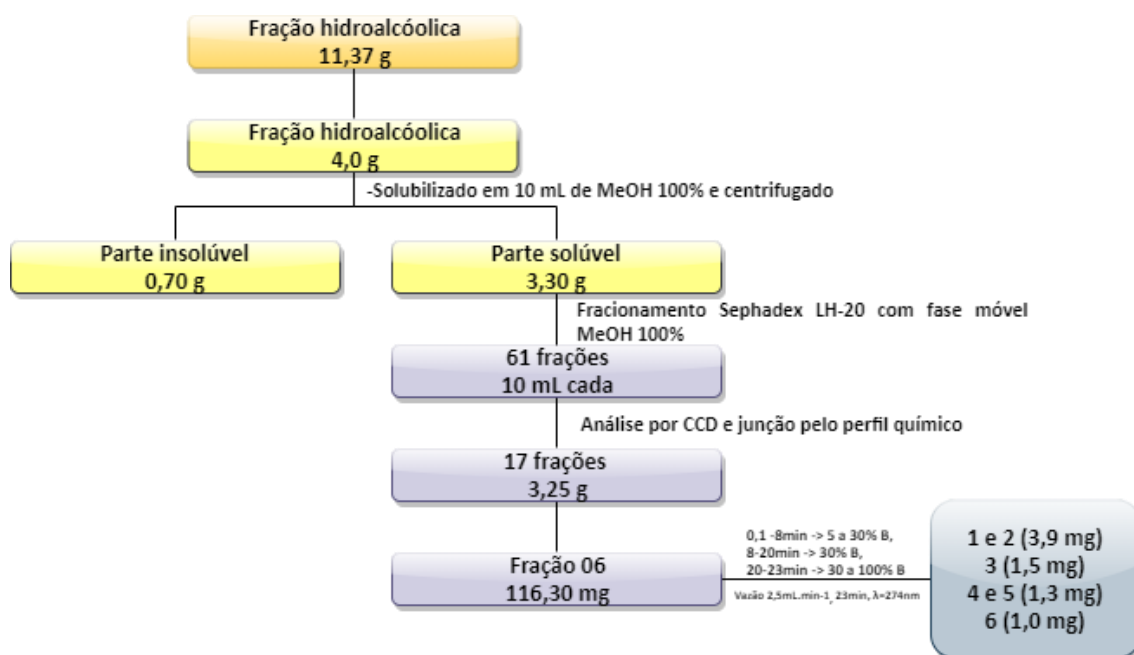
Os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T. Como referência interna utilizou-se TMS. As amostras (5 mg.mL^{-1}) foram solubilizadas em solventes deuterados D_2O (com pureza $\geq 99,8\%$ para D) e CD_3OD (D, 99,9%).

3.7 Fracionamento dos extratos vegetais e elucidação ou determinação estrutural das substâncias isoladas

Após a triagem química dos extratos brutos preparados em escala reduzida, foi selecionado etanol como solvente para a extração em escala ampliada, conforme metodologia descrita no item 3.5. O extrato bruto etanólico da parte aérea (16,52 g) foi previamente solubilizado com 250 mL de $\text{H}_2\text{O:MeOH}$ 1:1 (Figura 5). Realizou-se uma partição líquido-líquido com 3 x 100 mL de hexanos e obteve-se a fração hidroalcolica (11,4 g) e hexânica (3,1 g).

Figura 5 - Preparação e obtenção dos extratos de *E. crassipes*

A fração hidroalcoólica da parte aérea de *E. crassipes* foi submetida à separação por cromatografia em coluna com fase estacionária Sephadex LH-20 (70 x 4 cm) e foi utilizado metanol 100% no modo isocrático como fase móvel. Para o fracionamento, 4 g da fração hidroalcoólica foi solubilizada em 10 mL de metanol 100% e centrifugada. O sobrenadante obtido após a centrifugação (3,30 g) foi aplicado na coluna. Foram coletadas 61 frações, de aproximadamente 10 mL cada, que foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico obtido, resultando em 17 frações (Figura 6).

Figura 6 – Separação da fração hidroalcoólica da parte aérea de *E. crassipes*

As frações obtidas foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H . A avaliação química por CLAE-DAD foi realizada utilizando gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (0,025% de TFA) 95:05 à 0:100 v/v por 20 min com fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e λ inicial de 200 até 510 nm.

Das 17 frações resultantes, a fração 06 foi selecionada, inicialmente, para o isolamento dos metabolitos secundários por CLAE-DAD de acordo com a condição: de 0,1 min à 8 min variou de 5 a 30% de ACN, 8 min à 20 min foi mantido 30% de ACN e de 20 à 23 foi de 30 a 100%. Este fracionamento foi realizado em coluna semipreparativa C-18 ODS com injeção máxima de $100,0 \mu\text{L}$ e eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (0,025% TFA) 95:05 à 0:100 v/v por 23 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e λ inicial de 200 até 510 nm, resultando em 9 subfrações (Figura 6).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem química dos extratos vegetais

A triagem química dos extratos vegetais obtidos de *E. crassipes* (Tabela 1) foi realizada por análises cromatográficas e espectroscópicas, como CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H .

Tabela 1- Extratos obtidos de *E. crassipes*

Material Vegetal	Extrato	Massa do extrato (mg)	Rendimento (%)
Parte Aérea	Acetônico	60,0	1,50
	Butanólico	70,1	1,75
	Metanólico	302,3	7,55
	Etanólico	323,0	8,07
Raízes	Acetônico	31,1	0,77
	Butanólico	32,3	0,80
	Metanólico	110,2	2,75
	Etanólico	122,0	3,06

A Tabela 1 apresenta o rendimento dos extratos vegetais obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.6. Podemos observar que os extratos metanólicos e etanólicos apresentaram os melhores rendimentos, sugerindo que o solvente etanol e metanol tenham extraído uma maior quantidade de metabólitos. Diante disso e dos resultados obtidos das análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H , escolheu-se etanol como solvente para preparação de extrato bruto envolvendo maior massa vegetal

4.2 Avaliação do perfil metabólico por CLAE-DAD e RMN de ^1H do extrato etanólico e frações hidroalcoólicas

A fração hidroalcóolica obtida da partição líquido/líquido do extrato bruto etanólico da parte aérea foi submetida a análise por CLAE-DAD e RMN de ^1H .

Análise detalhada do cromatograma (Apêndice 1) evidenciou a presença de substâncias de polaridade variando de média a alta. Com base nas informações obtidas, como o tempo de retenção e o perfil do espectral UV/vis das substâncias, decidiu-se realizar o fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em coluna (CC) por exclusão de tamanho com fase estacionária Sephadex-LH20 (item 3.7).

As frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H para a avaliação do perfil químico.

A fração 06 foi inicialmente selecionada para estudo com base no perfil cromatográfico e nos dados obtidos por RMN de ^1H . O espectro de RMN (Figura 7) apresentou sinais na região dos hidrogênios metilênicos e metílicos (δ 0,9-3,0), carbinólicos (δ 3,0-4,0), olefínicos (δ 4,5-6,0) e sinais de hidrogênios aromáticos (δ 6,5-8,0). A fração 06 foi submetida à CLAE em escala semipreparativa (item 3.7) (Figura 8), obtendo as substâncias **1** e **2** (3,9 mg), **3** (1,5 mg), **4** e **5** (1,3 mg) e **6** (1,0 mg).

Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H da fração 06 em DMSO- d_6 (600 MHz)

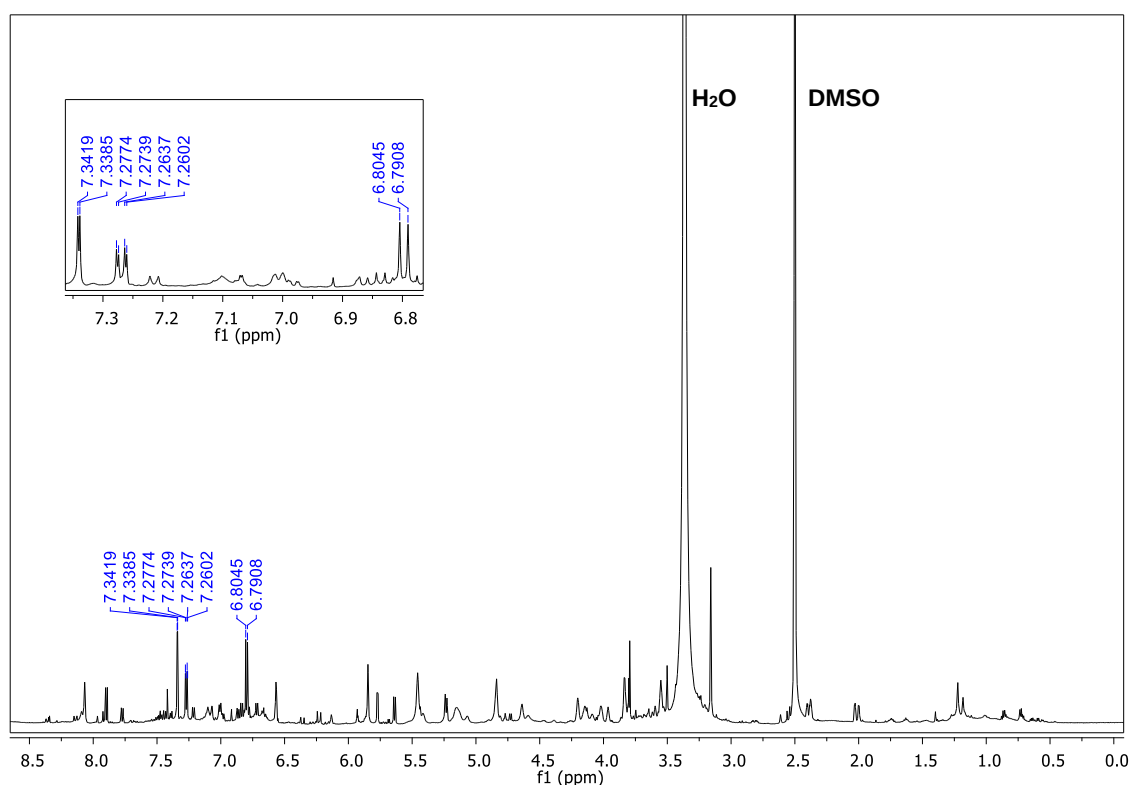
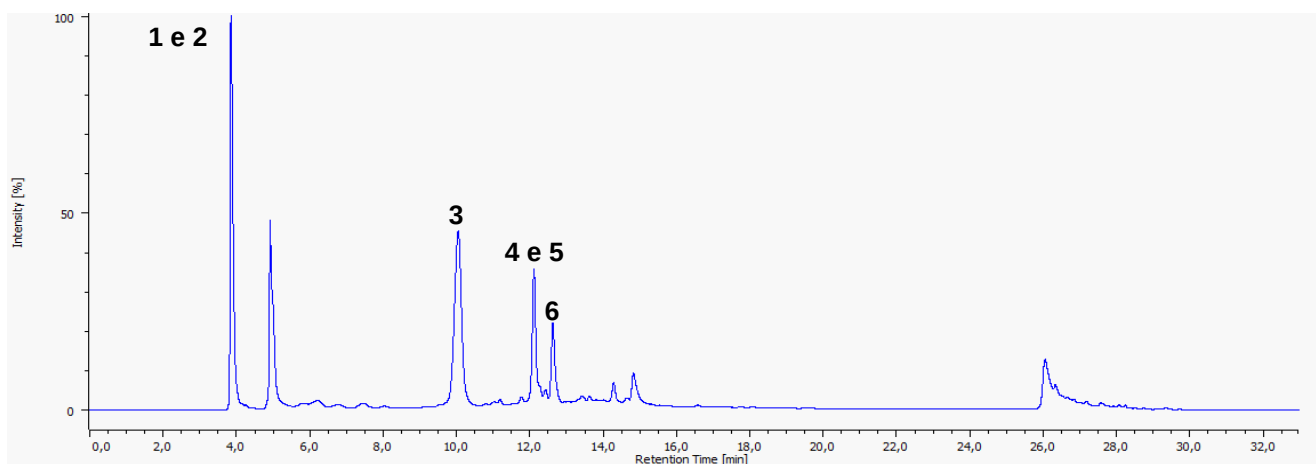


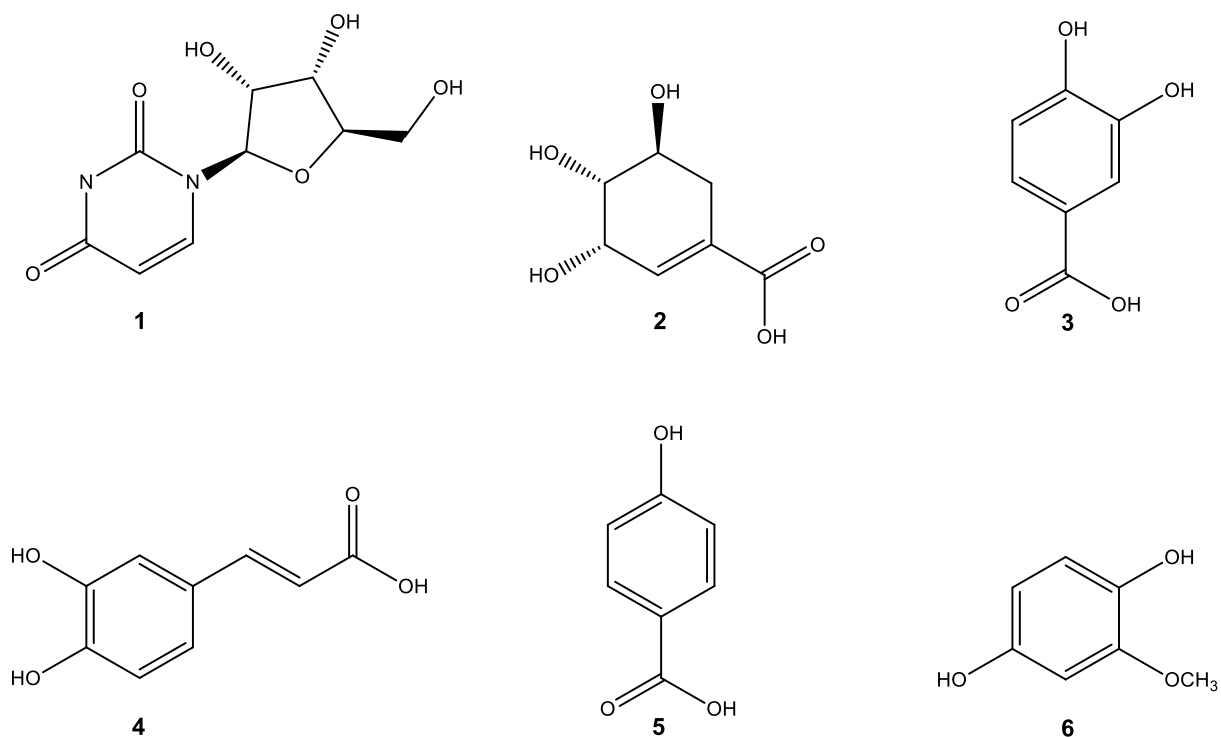
Figura 8 - Cromatograma semipreparativo das substâncias isoladas da fração 06



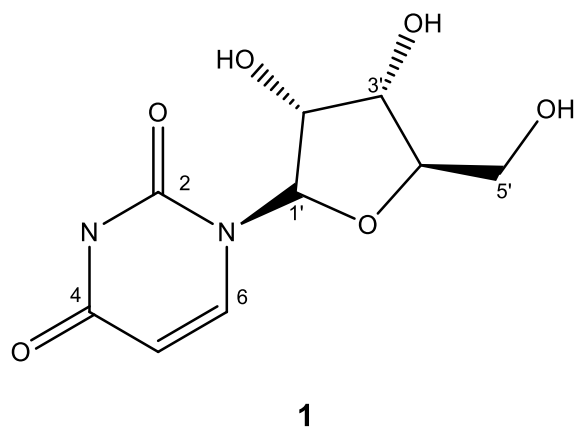
Condições: coluna semipreparativa C-18 ODS (Zorbax RX-C18, 4,6 × 250 mm, 5 µm, Agilent®); fase móvel: H₂O:ACN (0,025% TFA) de 0,1 min à 8 min variou de 5 a 30% de ACN, 8 min à 20 min foi mantido 30% de ACN e de 20 à 23 min foi de 30 a 100% por 23 min; concentração: 2.0 mg.mL⁻¹; injeção: 10,0 a 100,0 µL; detecção λ = 274 nm.

4.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas de *E. crassipes*

Todas as estruturas químicas das substâncias isoladas da fração hidroalcoólica da parte aérea de *E. crassipes* estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9 - Substâncias isoladas de *E. crassipes*

4.3.1 Uridina (1)

Figura 10 - Representação estrutural da substância **1**

A substância **1**, com fórmula molecular $C_9H_{12}N_2O_6$, foi identificada em mistura com a substância **2** com base nos espectros de RMN 1D e 2D.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 2) da substância **1** apresentou dois duplos dupletos em δ 3,78 (dd , $J = 12,8$ e $4,4$ Hz, 1H, H-5'b) e δ 3,89 (dd , $J =$

12,8 e 2,9 Hz, 1H, H-5'a), caracterizando hidrogênios diastereotópicos, dois dupletos em δ 5,86 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-5) e em δ 7,85 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-6) com constantes de acoplamento referentes a hidrogênios olefínicos de configuração *cis*. Apresentou também dois tripletos em δ 4,19 (*t*, $J = 5,5$ Hz, 1H, H-3') e em δ 4,32 (*t*, $J = 4,9$ Hz, 1H, H-2'), um duplete em δ 5,88 (*d*, $J = 4,5$ Hz, 1H, H-1') e um multiplete em δ 4,10 (*m*, 1H, H-4').

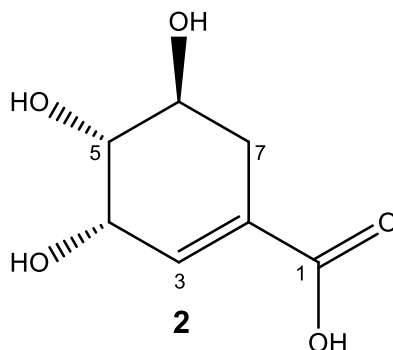
As correlações de ^1H - ^1H observadas no espectro COSY entre H-5' $\leftrightarrow$ H-5', H-2' $\leftrightarrow$ H-1', H-5 $\leftrightarrow$ H-6 confirmam os acoplamentos obtidos no RMN de ^1H (Apêndice 3). Os deslocamentos de RMN de ^{13}C foram obtidos por meio dos mapas de contorno HSQC (Apêndice 4) e HMBC (Apêndice 5). O mapa de contorno de HMBC forneceu correlações (3J , ^1H - ^{13}C) fundamentais, que permitiram atribuir estruturalmente a presença de carbonos não saturados em δ 101,9 (C-5) e em δ 141,6 (C-6). Por meio dos dados obtidos (Tabela 2) e comparação com a literatura²⁹ foi possível identificar a substância como sendo a uridina, uma substância promissora no tratamento de epilepsia³⁰.

Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **1** (J em Hz, D_2O , 600 MHz)

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1'	5,88 (<i>d</i> , 4,5)	88,9	-
2'	4,32 (<i>t</i> , 4,9)	73,4	69,1
3'	4,19(<i>t</i> , 5,5)	69,1	60,5, 73,4
4'	4,10 (<i>m</i>)	84,0	-
5'a	3,89 (<i>dd</i> , 12,8, 2,9)	60,5	84,0, 69,1
5'b'	3,78 (<i>dd</i> , 12,8, 4,4)		-
2		151,8	-
4		166,2	-
5	5,86 (<i>d</i> , 8,1)	101,9	141,6
6	7,85 (<i>d</i> , 8,1)	141,6	88,9, 101,9, 151,8, 166,2

4.3.2 Ácido chiquímico (2)

Figura 11- Representação estrutural da substância 2



A substância **2**, com fórmula molecular $C_7H_{10}O_5$, foi identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 1) da substância **2** apresentou multipletos em δ 2,19 (*m*, 1H, H-7a), em δ 2,73 (*m*, 1H, H-7b), δ 3,99 (*m*, 1H, H-6) e δ 6,60 (*m*, 1H, H-3). Um duplo duplete em δ 3,72 (*dd*, $J = 8,6$ e $4,2$ Hz, 1H, H-5) e um tripleto em δ 4,40 (*t*, $J = 4,2$ Hz, 1H, H-4).

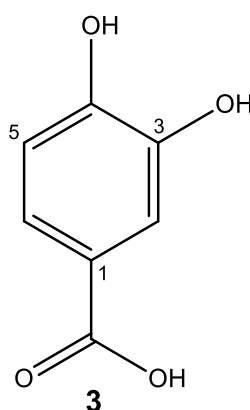
As correlações de 1H - 1H observadas no espectro COSY $H-7 \leftrightarrow H-7$, $H-7 \leftrightarrow H-6$, $H-5 \leftrightarrow H-6$, $H-5 \leftrightarrow H-4$ e $H-4 \leftrightarrow H-3$ confirmam os acoplamentos obtidos no RMN de 1H (Apêndice 3). Os deslocamentos de RMN de ^{13}C foram obtidos por meio dos mapas de contorno HSQC e HMBC. Por meio dos dados obtidos (Tabela 3) e comparação com a literatura³¹ foi possível identificar a substância como sendo o ácido chiquímico.

Tabela 3- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **2** (J em Hz, D_2O , 600 MHz)

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1		*	
2		*	
3	6,60 (<i>m</i>)	133,6	31,3,
4	4,40 (<i>t</i> , 4,2)	65,8	133,6
5	3,72 (<i>dd</i> , 8,6, 4,2)	71,4	-
6	3,99 (<i>m</i>)	66,4	71,4, 133,6
7a	2,19 (<i>m</i>)	31,3	66,4, 133,6
7b	2,73 (<i>m</i>)		66,4

*Sinais não observados

4.3.3 Ácido 3,4-diidroxibenzoico (**3**)

Figura 12 - Representação estrutural da substância **3**

A substância **3**, com fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, foi identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D.

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 6) da substância **3** apresentou um duplete em δ 6,79 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5), um duplo duplete em δ 7,42 (*dd*, $J = 8,2$ e 1,7 Hz, 1H, H-6) e um singleto largo em δ 7,43 (*sl*, 1H, H-2) caracterizando um anel aromático trissubstituído. As correlações de ^1H - ^1H observadas no espectro COSY (Apêndice 7) confirmam os acoplamentos obtidos no RMN de ^1H . Os deslocamentos de RMN de ^{13}C foram obtidos por meio dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Apêndices 8 e 9). Por meio dos dados obtidos (Tabela 4) e comparação com a literatura³² foi possível identificar a substância como

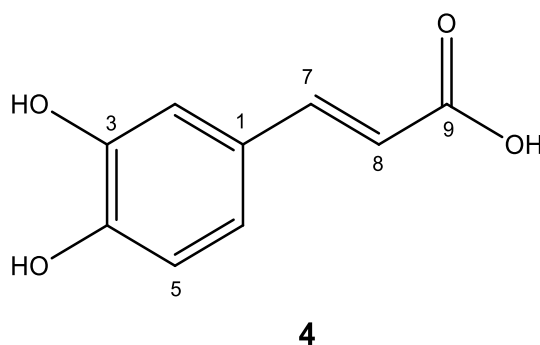
sendo o ácido 3,4-dihidroxibenzoico, que apresenta forte atividade nematocida contra nematoide *Meloidogyne incognita*³².

Tabela 4- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **3** (J em Hz, CD_3OD , 600 MHz)

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	-	122,5	-
2	7,43 (s)	116,2	169,1
3	-	144,6	-
4	-	149,8	-
5	6,79 (d, 8,2)	114,2	144,6, 149,8
6	7,42 (dd, 8,2; 1,7)	122,5	116,2
7	-	169,1	-

4.3.4 Ácido cafeico (4)

Figura 13 - Representação estrutural da substância **4**



A substância **4** foi identificada em mistura com o ácido *p*-hidroxibenzoico (**5**). O espectro de RMN de ^1H da substância **4** (Apêndice 10) apresentou dois dubletos em δ 6,27 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-8) e δ 7,56 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-7) referentes a hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamentos de configuração *trans*. Além desses, foi observado um sistema de sinais em δ 6,77 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-5), δ 6,95 (dd, J = 8,2 e 1,9 Hz, 1H, H-6) e δ 7,04 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-2) característico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído

As correlações ^1H - ^1H observadas no mapa de contornos COSY (Apêndice 11) entre H-7 e H-8, H-2 e H-6, e H-5 e H-6 permitiram a confirmação dos acoplamentos obtidos nos sistemas de sinais de RMN de ^1H .

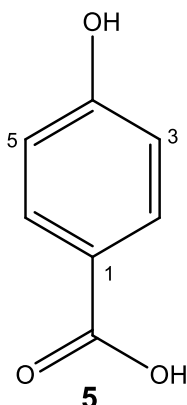
O mapa de contornos HMBC forneceu correlações (3J , ^1H - ^{13}C) fundamentais, que permitiram atribuir estruturalmente a presença de uma carbonila em δ 167,9 (C-9) característica de ácido carboxílico, duas hidroxilas aromáticas em δ 146,6 (C-3) e δ 145,7 (C-4) (Tabela 5, Apêndice 13). Esses dados em comparação com a literatura³³ permitiram identificar a substância **4** como sendo o ácido cafeico.

Tabela 5- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **4** (J em Hz, CD_3OD , 600 MHz)

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	-	126,2	-
2	7,04 (<i>d</i> , 1,9)	113,5	121,4
3	-	146,6	-
4	-	145,7	-
5	6,77 (<i>d</i> , 8,2)	114,4	126,2; 146,6
6	6,95 (<i>d</i> , 8,2; 1,9)	121,4	113,5; 145,7
7	6,27 (<i>d</i> , 15,9)	113,5	-
8	7,56 (<i>d</i> , 15,9)	145,5	113,5
9	-	167,9	-

4.3.5 Ácido *p*-hidroxibenzoico (**5**)

Figura 14 - Representação estrutural da substância **5**



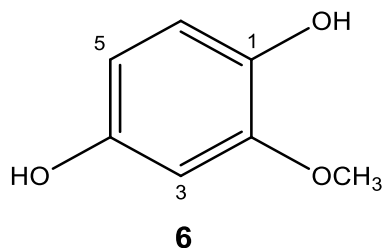
A substância **5** apresentou no espectro de RMN de ^1H (Apêndice 10) dois dubletos em δ 6,80 (*d*, $J = 8,7$ Hz, 2H) e δ 7,86 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H) com valores de constantes de acoplamentos *orto/orto*, característicos de um anel aromático 1,4-dissubstituído (Tabela 6). As correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 11-13) permitiram sugerir a estrutura de **5** e identificá-la como sendo o ácido *p*-hidroxibenzoico³⁴.

Tabela 6 -Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **5** (J em Hz, CD_3OD , 600 MHz)

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	-	122,3	-
2/6	7,86 (<i>d</i> , 8,6)	131,5	161,5, 169,9
3/5	6,80 (<i>d</i> , 8,6)	114,5	122,3
4	-	161,5	-
7	-	169,6	-

4.3.6 1,4-diidroxi-2-metoxibenzeno (6)

Figura 15- Representação estrutural da substância **6**



A substância **6**, com fórmula molecular $C_7H_8O_3$, foi identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D. O espectro de RMN de 1H (Apêndice 14) da substância **6** apresentou um singlete intenso δ 3,88 (*s*, 3H) característico de uma metoxila aromática, dois dupletos em δ 6,80 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-6) e δ 7,55 (*d*, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-3) e um duplo duplete em δ 7,52 (*dd*, $J = 8,2$ e $1,3$ Hz, 1H, H-5), com constantes de acoplamento *orto/meta* de um anel aromático trissubstituído.

A posição da metoxila aromática no carbono C-2 foi atribuída pela correlação observada no espectro de NOESY 1D (Apêndice 15) com o hidrogênio em δ 7,55. As demais correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura³⁵ (Tabela 7, Apêndices 16-18) permitiram identificar a substância como 1,4-diidroxi-2-metoxibenzeno.

Tabela 7- Dados de RMN de 1H e ^{13}C de **6** (J em Hz, CD_3OD , 600 MHz)

Posição	δ_H	δ_C	HMBC
1	-	150,7	-
2	-	147,1	-
3	7,55 (<i>d</i> , 1,3)	112,4	123,7, 150,7
4	-	146,9	-
5	7,52 (<i>dd</i> , 8,2; 1,3)	123,7	112,4
6	6,80 (<i>d</i> , 8,2)	114,1	123,7, 147,1
OCH₃	3,88 (<i>s</i>)	54,7	146,9

5. CONCLUSÃO

A investigação química da parte aérea de *E. crassipes*, conduziu, neste trabalho, ao isolamento e determinação estrutural de seis substâncias, sendo a maioria de natureza aromática: 1,4-diidroxibenzeno, ácido 3,4-diidroxibenzoico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido chiquímico e uridina.

As substâncias isoladas são promissoras para estudos biológicos, como é o caso da uridina, que é alvo de estudos para tratamento de epilepsia,³⁰ o ácido chiquímico, precursor na rota biossintética de compostos aromáticos e na síntese do medicamento Tamiflu,^{25,28} o ácido-3,4-diidroxibenzoico, que apresenta atividade nematicida contra nematoide *Meloidogyne incognita*.³² Esses resultados sugerem a potencialidade do uso dos metabólitos secundários isolados de *E. crassipes*.

REFERÊNCIAS

1. VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
2. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
3. HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 350-354, 2011.
4. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3670-3695, 2013.
5. STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003
6. KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739-753, 2018.
7. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.
8. AGUNBIADE, F. O.; OLUOWOLABI, B. I.; ADEBOWALE, K. O. Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* in metal contaminated coastal water. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4521-4526, 2009.
9. EPSTEIN, P. Weeds bring disease to the east African waterways. **Lancet**, p. 351-577, 1998.
10. FERNÁNDEZ, O. A.; SUTTON, D. L.; LALLANA, V. H.; SABBATINI, M. R.; IRIGOYAN, J. H. Aquatic weed problems and management in South and Central America. In: Charudattan, R. (Ed.). **Aquatic weeds – the ecology and management of nuisance aquatic vegetation**. New York: Oxford University Press; 1990. p. 406-425.
11. MALIK, A. Environmental challenge *vis a vis* opportunity: The case of water hyacinth: a review article. **Environmental International**, v. 33, p. 122-138, 2007.

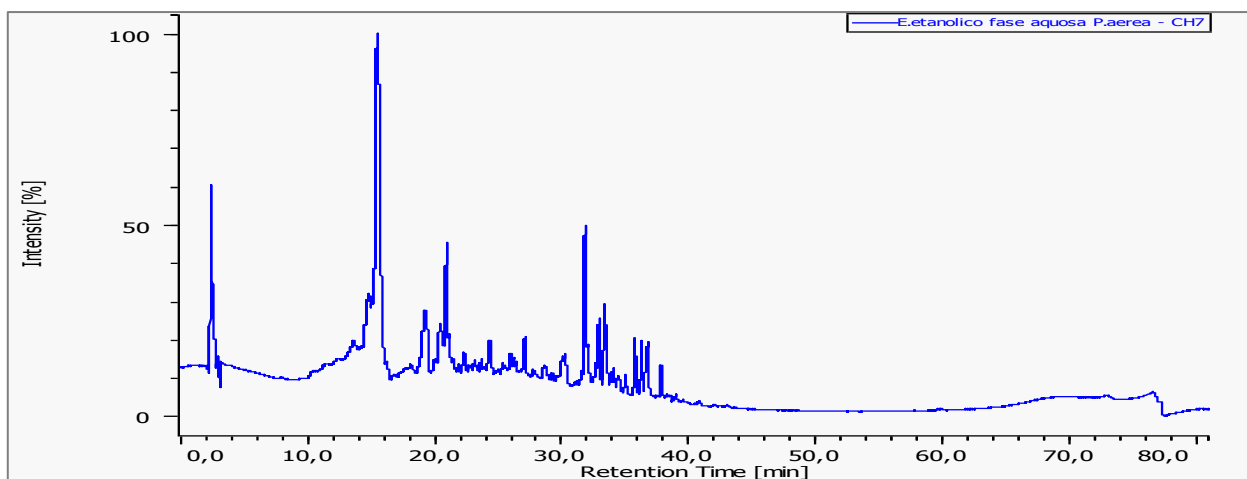
12. GUEREÑA, D.; NEUFELDT, H.; BERAZNEVA, J.; DUBY, S. Water hyacinth control in Lake Victoria: Transforming an ecological catastrophe into economic, social, and environmental benefits. **Sustainable Production and Consumption**, v. 3, p. 59-69, 2015.
13. View 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. Disponível em <http://www.issg.org/worst100_species.html>. Acesso em 04 nov. 2019.
14. ROMERO-HERNÁNDEZ, J. A.; AMAYA-CHÁVEZ, A.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, P.; ROA-MORALES, G.; GONZÁLEZ-RIVAS, N.; BALDERAS-PLATA, M. A. Tolerance and hyperaccumulation of a mixture of heavy metals (Cu, Pb, Hg, and Zn) by four aquatic macrophytes. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, p. 239-245, 2017
15. THAKUR, S.; SINGH, L.; WAHID, Z. A.; SIDDIQUI, M. F.; ATNAW, S. M.; DIN, M. F. M. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, p. 206, 2016.
16. PAZ-ALBERTO, A. M.; SIGUA, G. C. Phytoremediation: a green technology to remove environmental pollutants. **American Journal Climate Change**, v. 2, p. 71-86, 2013.
17. FAWZY, M. A.; BADR, N. E.; EL-KHATIB, A.; KASSEM, A. A. Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 1753-1771, 2012.
18. WANG, Z.; ZHENG, F.; XUE, S. The economic feasibility of the valorization of water hyacinth for bioethanol production. **Sustainability**, v. 11, p. 905, 2019.
19. LALITHA, P.; SRIPATHI, S. K.; JAYANTHI, P. Secondary metabolites of *Eichhornia crassipes* (waterhyacinth): a review (1949 to 2011). **Natural Product Communications**, v. 7, p. 1249-1256, 2012.
20. JAYAWEERA, M. W.; KASTURIARACHCHI, J. C. Removal of nitrogen and phosphorus from industrial wastewaters by phytoremediation using water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). **Water Science and Technology**, v. 50, p.217–225, 2004.

21. DELLA GRECA, M.; MOLINARO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Dimeric phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 3971-3976, 1992.
22. DELLA GRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARELLI, A. Revised structures of phenylphenalene derivatives from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron**, v. 49, p. 3268-3272, 2008.
23. DELLA GRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARELLI, A. Structures of new phenylphenalene – related compounds from *Eichhornia crassipes* (water hyacinth). **Tetrahedron**, v. 65, p. 8206-8208, 2009.
24. SHANAB, S. M. M.; SHALABY, E. A.; LIGHTFOOT, D. A.; EL-SHEMY, H. A. Allelopathic effects of water hyacinth [*Eichhornia crassipes*]. **PLoS One**, v. 5, p. e13200, Oct. 2010.
25. CARDOSO, S. F.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. *Eichhornia crassipes*: an advantageous source of shikimic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 439-442, 2014.
26. ESTEVES, C. R. L.; LIMA, T. R.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. Absorção de metais e produção de antocianidinas em *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae). In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis. 2011.
27. NASCIMENTO, I. R. Esteróides e um nucleosídeo da macrófita fitorremediadora *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae). In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. 2010.
28. LENORA, L. M.; BABU, D. S.; KUMAR, J. S.; KUMAR, N. S. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms – An alternate renewable source for Shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a swine flu drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, p. 178-181, 2016.
29. BARTOSA, P.; KRASZEWSKAB, K.; NAWRO, B. Desulfuration of 2-thiouridine with hydrogen peroxide in the physiological pH range 6.6-7.6 is pH-dependent and results in two distinct products Elzbieta Sochackaa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 5803-5805, 2013.
30. KOVÁCS, Z.; SLÉZIA, A.; BALI, Z. K.; KOVÁCS, P.; DOBOLYI, A.; SZIKRA, T.; HERNÁDI, I.; JUHÁSZ, G. Uridine modulates neuronal activity and inhibits spike-wave discharges of absence epileptic Long Evans and Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. **Brain Research Bulletin**, v. 97, p. 16-23, 2013.

31. SOKENG, A. J. T.; SOBOLEV, A. P.; LORENZO, A. D.; XIAO, J.; MANNINA, L.; CAPITANI, D.; DAGILA, M. Metabolite characterization of powdered fruits and leaves from *Adansonia digitata* L. (baobab): A multi-methodological approach. **Food Chemistry**, v. 272, p. 93-108, 2019.
32. HAN, Y. S. *et al.* Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Pathogenesis**, v. 59-60, p. 52-59, 2013.
33. Tian, X.; GUO, S.; HE, K.; ROLLER, M.; YANG, M.; LIU, Q.; ZHANG, L.; HO, C.; BAI, NAISHENG. Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents of *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Natural Product Research**, v. 32, p. 354-357, 2018.
34. Ren, Q.; Chen, W.; Zhao, H.; Wu, Z.; Zhang, H. Organic acids from *Capparis spinosa* fruit. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, p. 868-869, 2012.
35. SAIKIA, B.; BORAH, P.; BARUA, N.C. H₂O₂ in WEB: a highly efficient catalyst system for the Darkin reaction. **Green Chemistry**, v. 17, p. 4533-4536, 2015.

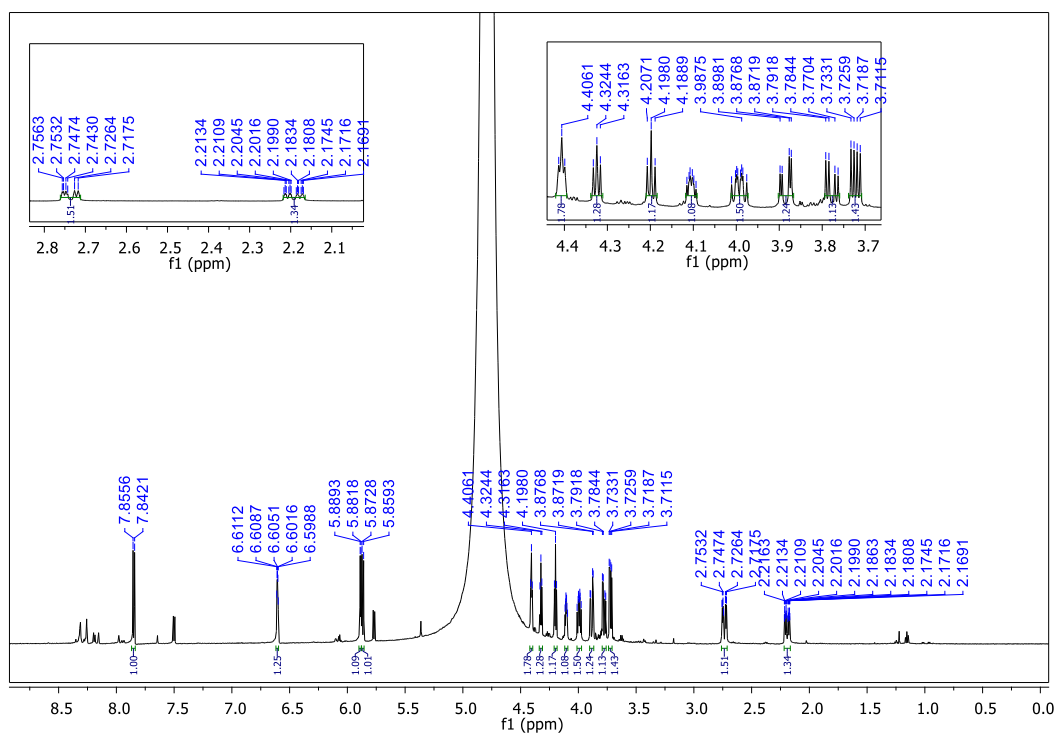
APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Cromatograma CLAE-DAD da fração hidroalcoólica da parte aérea de *E. crassipes*

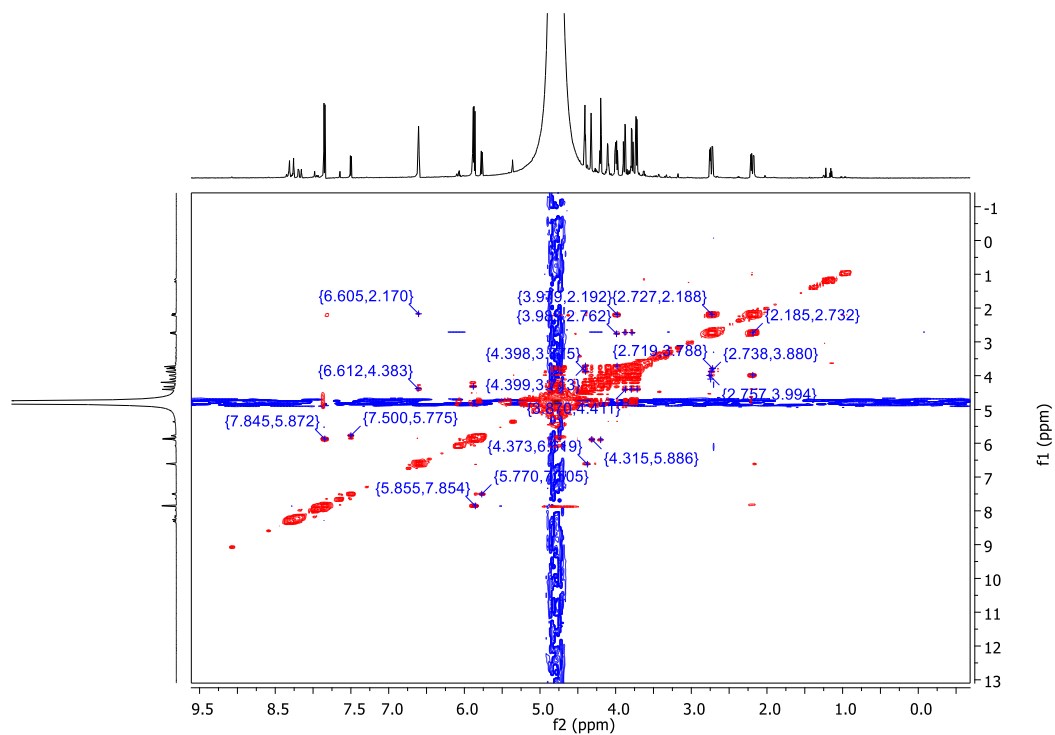


Condições: coluna analítica C-18 ODS (Zorbax RX-C18, 4,6 × 250 mm, 5 µm, Agilent®); fase móvel: H₂O:ACN (0,1% HOAc) 70:30 à 0:100 v/v por 50 min; concentração: 10 mg.mL⁻¹; volume injetado: 40,0 µL; detecção λ = 330 nm.

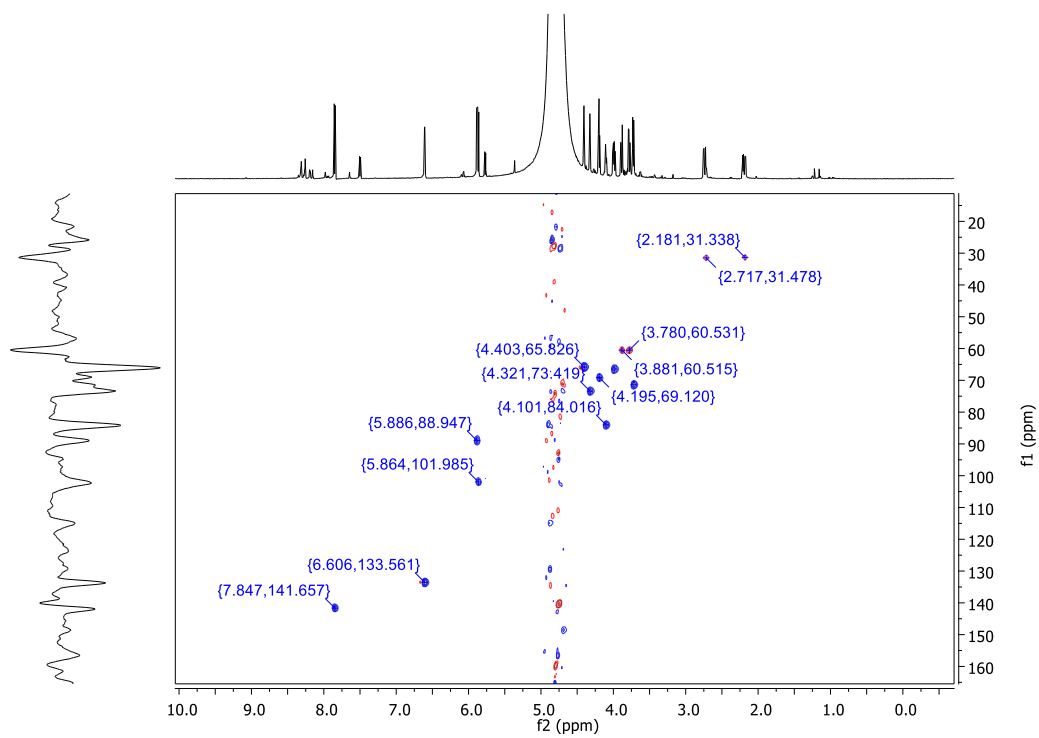
APÊNDICE 2 –Espectro RMN de ¹H das substâncias 1 e 2 (D₂O, 600 MHz)

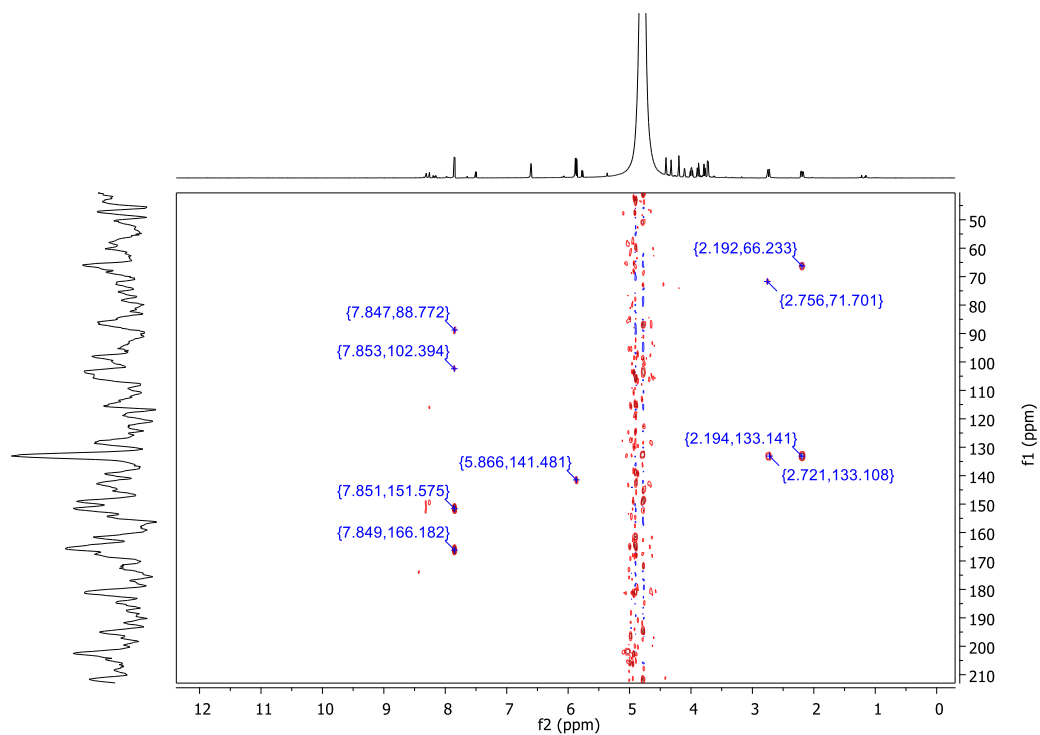
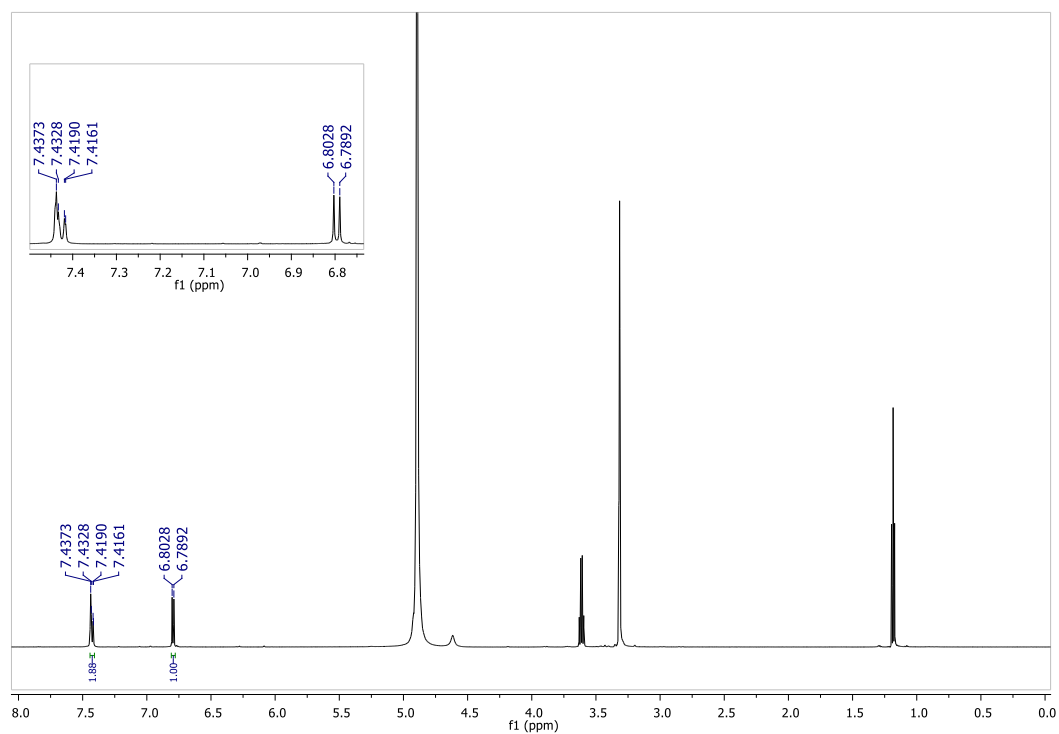


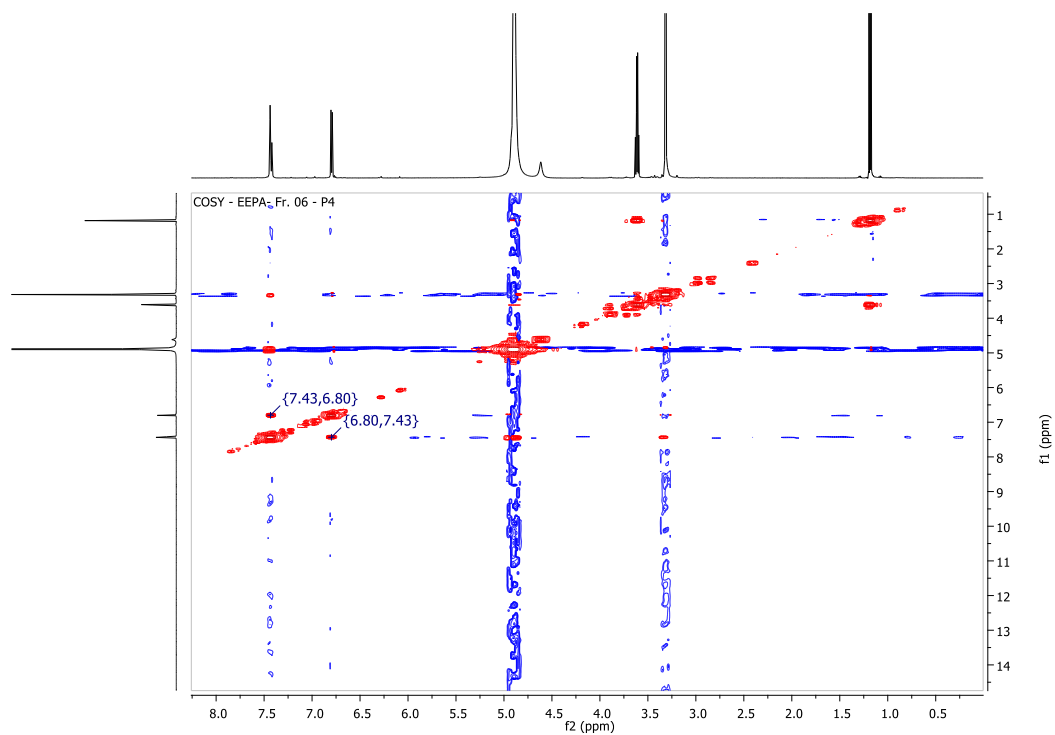
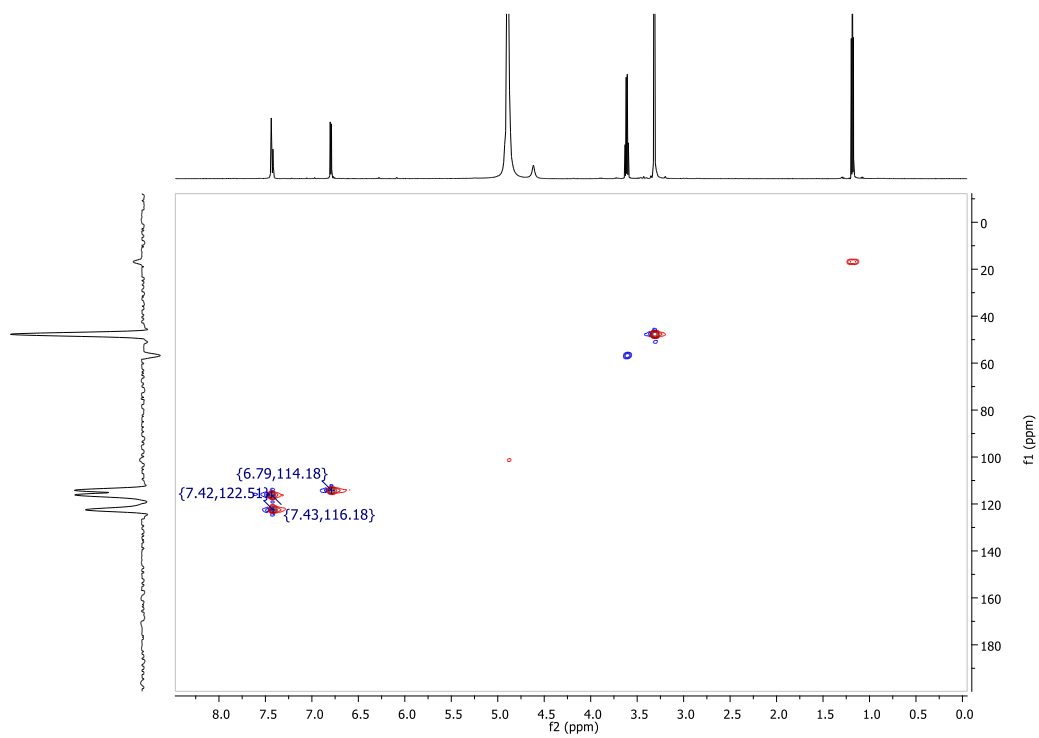
APÊNDICE 3 – Mapa de contornos de COSY da substância **1** e **2** (D₂O, 600 MHz)



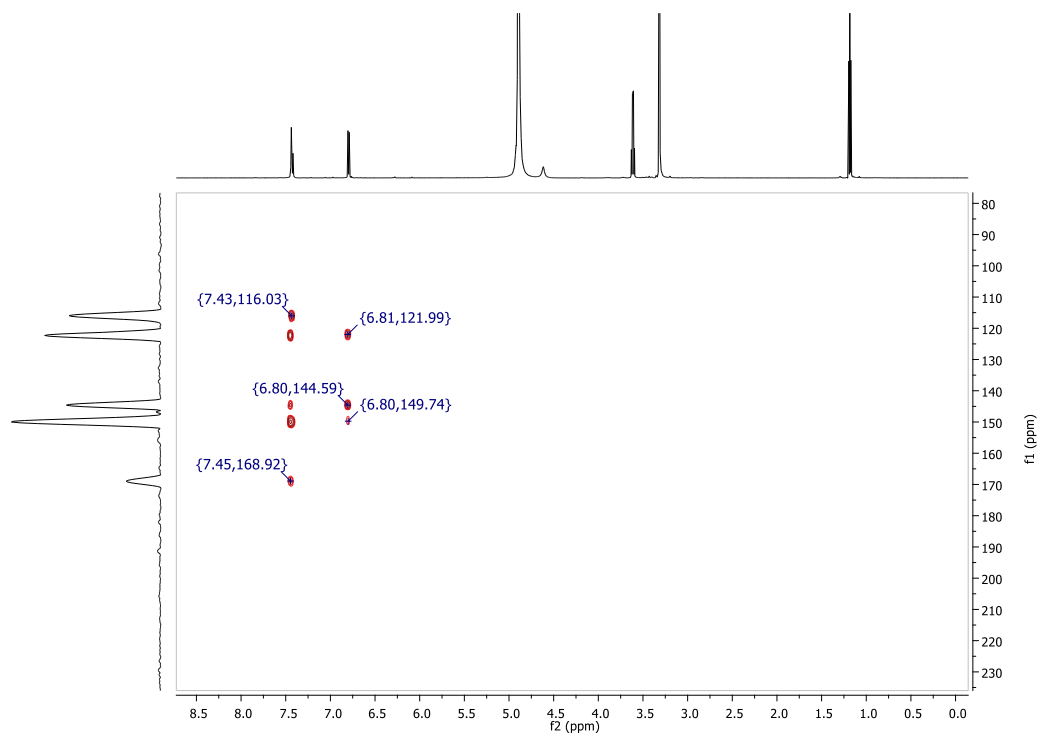
APÊNDICE 4 – Mapa de contornos HSQC da substância **1** e **2** (D₂O, 600 MHz)



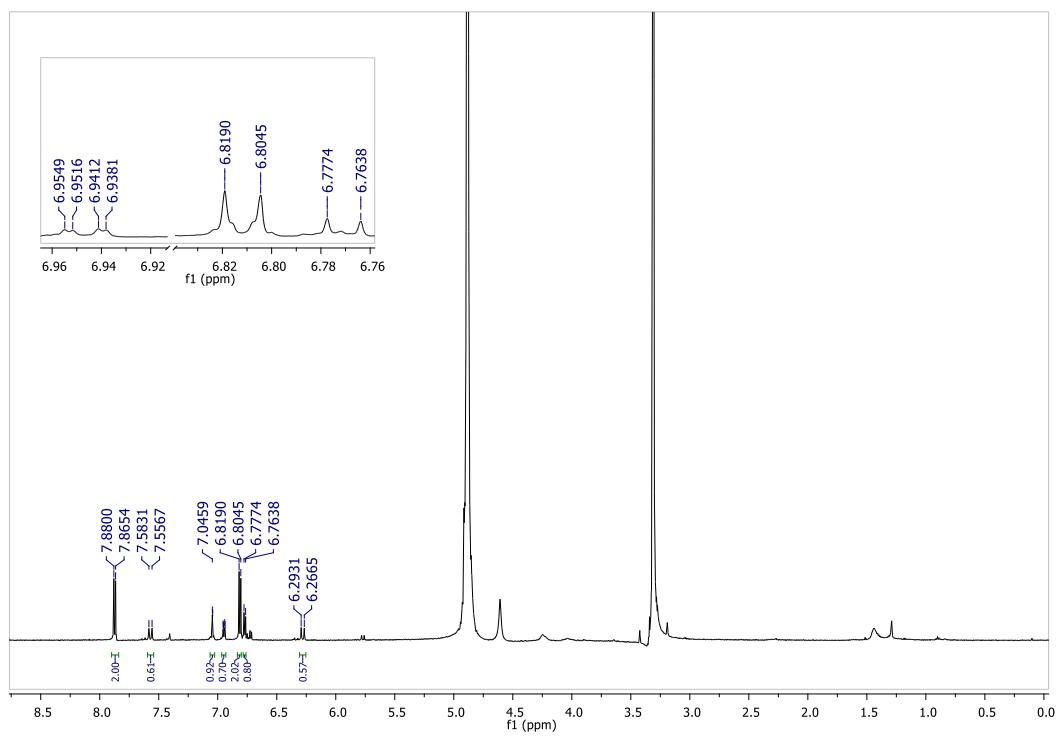
APÊNDICE 5 – Mapa de contornos HMBC da substância **1 e **2** (D₂O, 600 MHz)****APÊNDICE 6 –Espectro RMN de ¹H da substância **3** (CD₃OD, 600 MHz)**

APÊNDICE 7 – Mapa de contornos COSY da substância **3 (CD₃OD, 600 MHz)****APÊNDICE 8 – Mapa de contornos HSQC da substância **3** (CD₃OD, 600 MHz)**

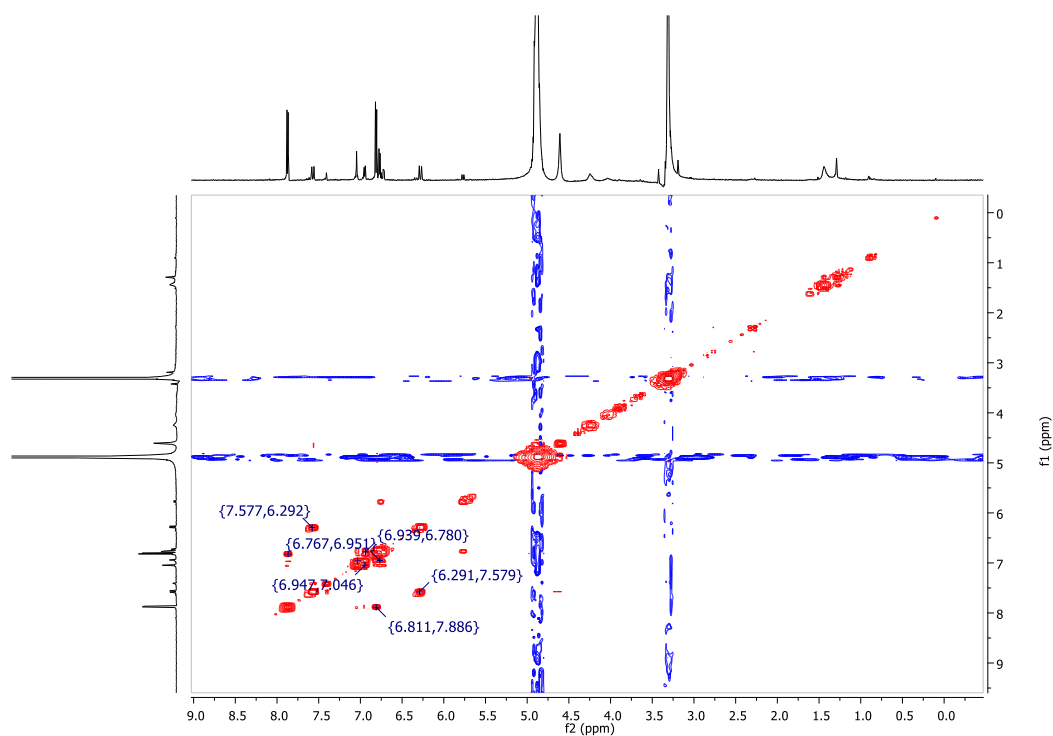
APÊNDICE 9 – Mapa de contornos HMBC da substância **3 (CD₃OD, 600 MHz)**



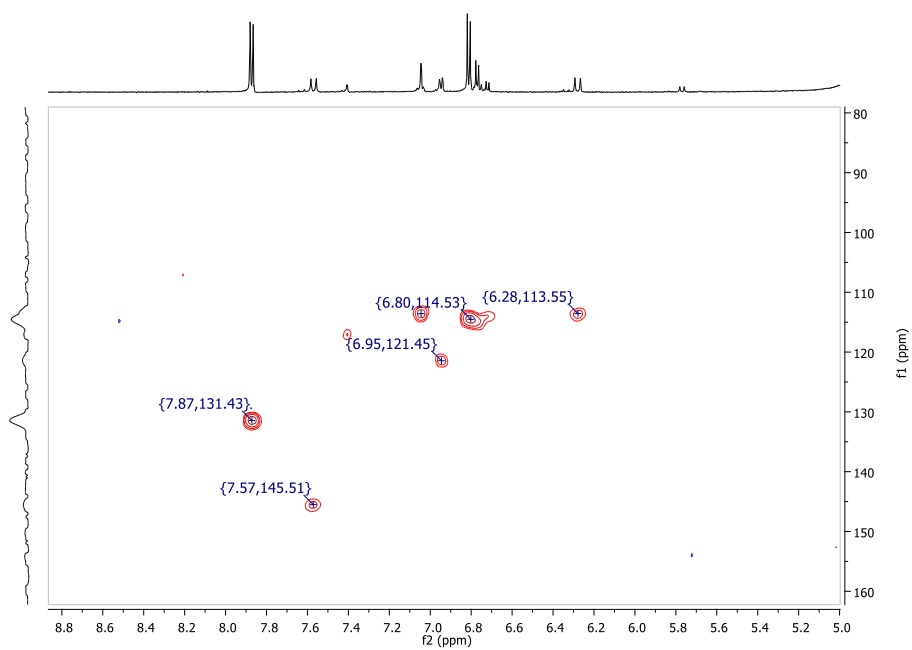
APÊNDICE 10 –Espectro RMN de ¹H das substâncias **4 e **5** (CD₃OD, 600 MHz)**



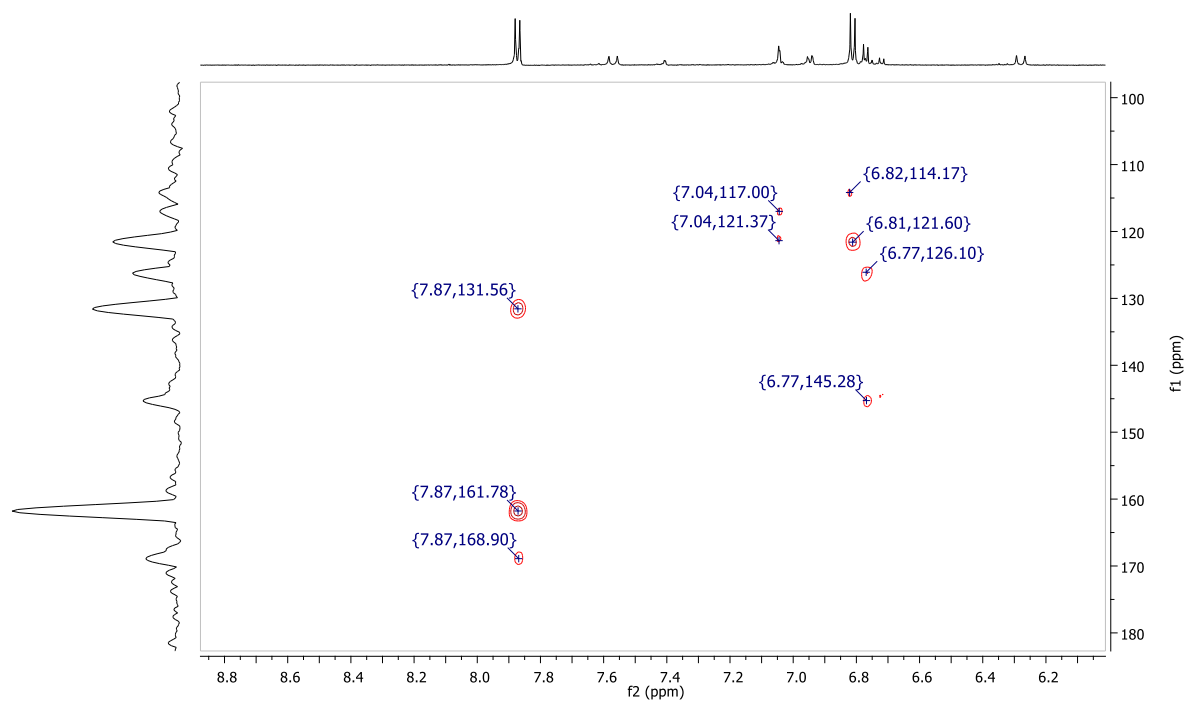
APÊNDICE 11 – Mapa de contornos COSY das substâncias 4 e 5 (CD₃OD, 600 MHz)



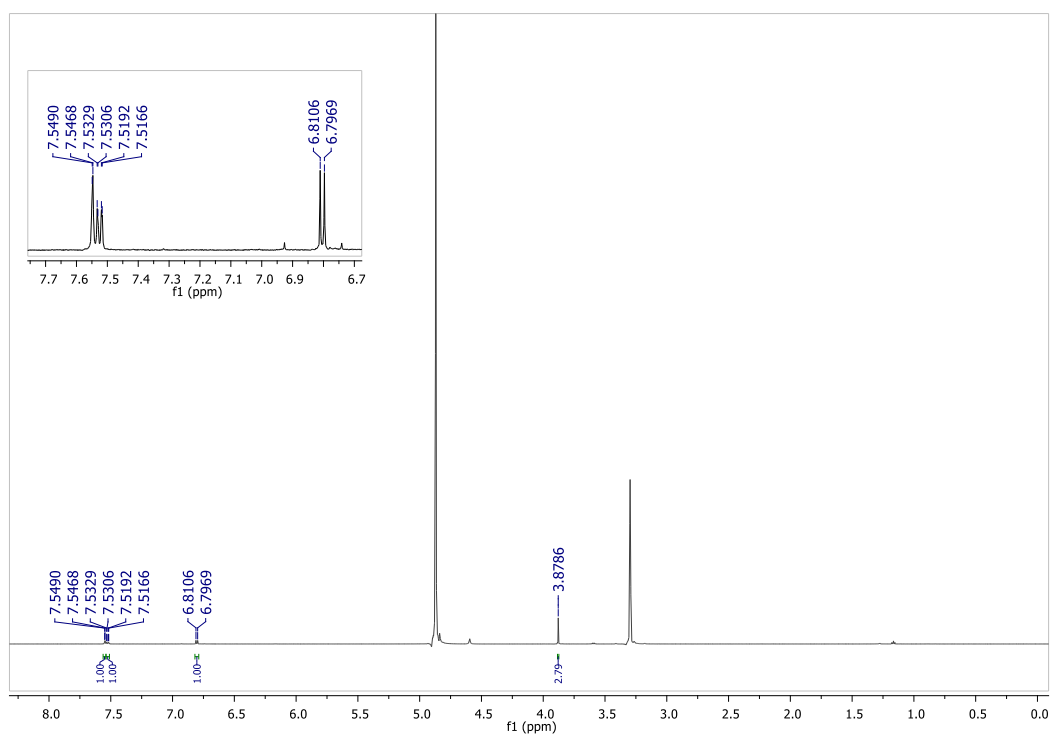
APÊNDICE 12 – Mapa de contornos HSQC das substâncias 4 e 5 (CD₃OD, 600 MHz)

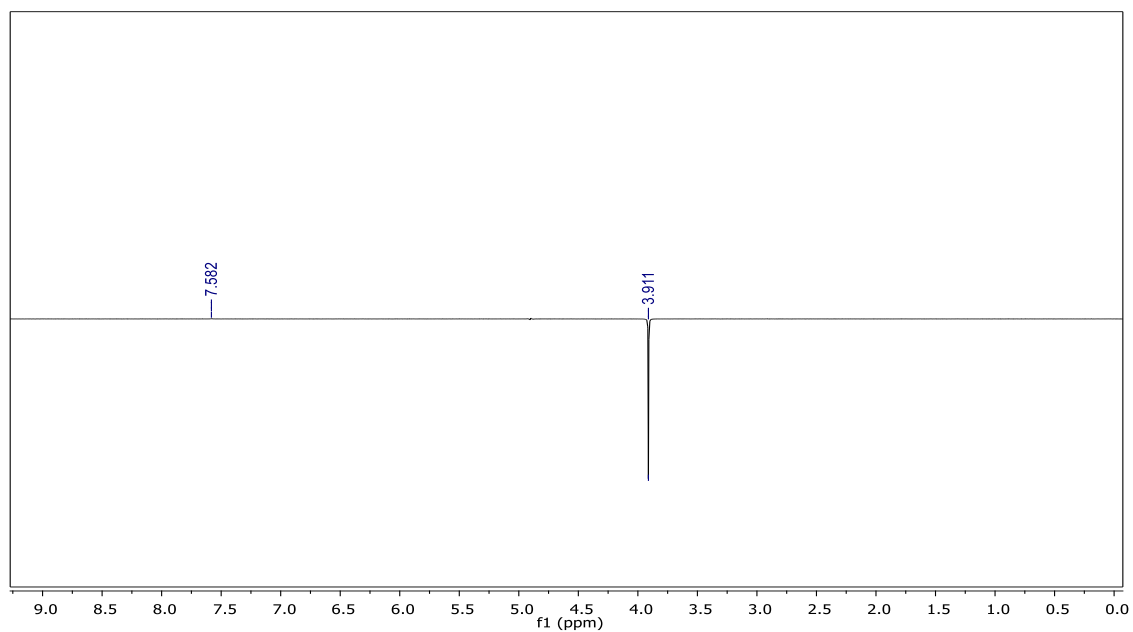
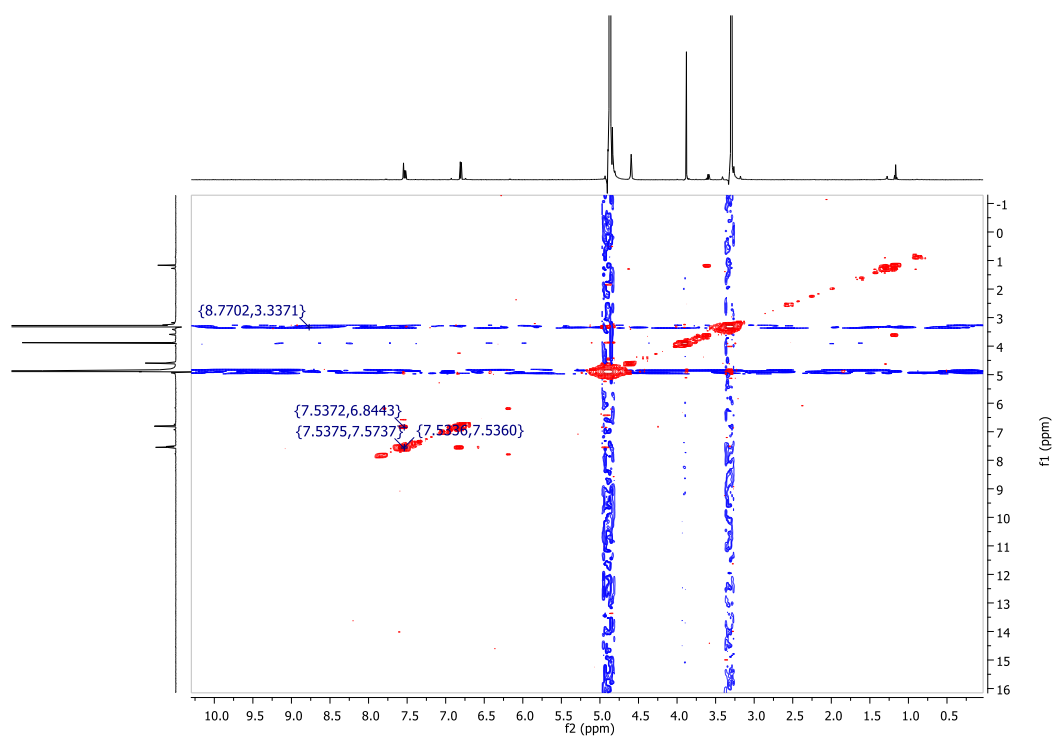


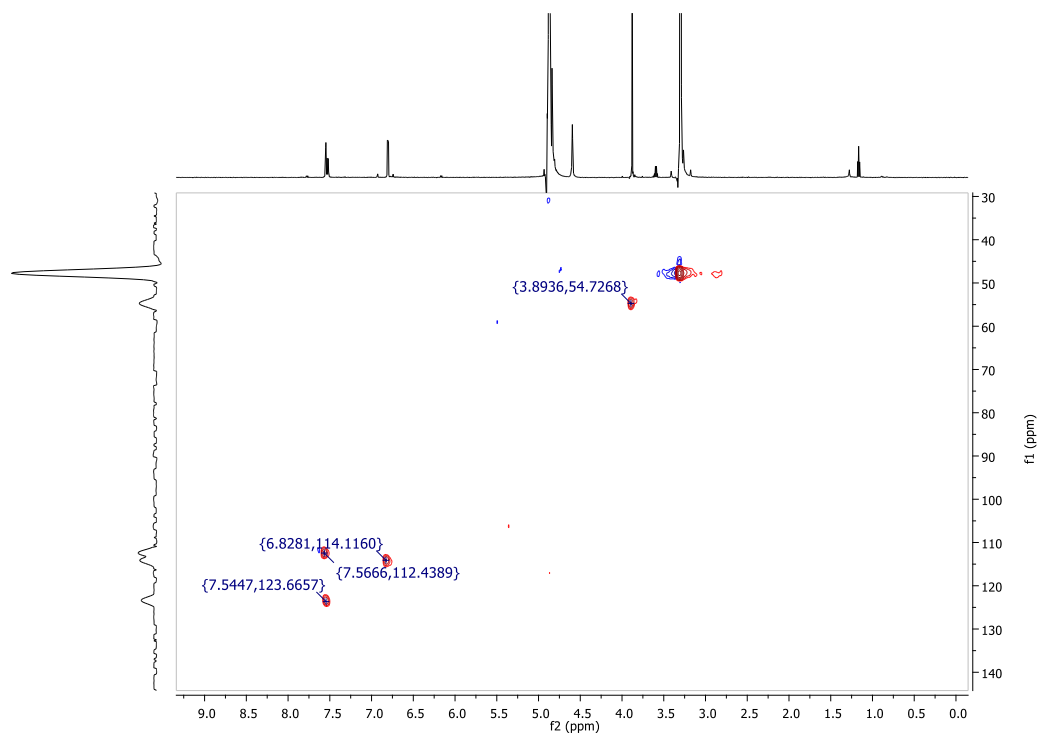
APÊNDICE 13 – Mapa de contornos HMBC das substâncias **4 e **5** (CD₃OD, 600 MHz)**



APÊNDICE 14 –Espectro RMN de ¹H da substância **6 (CD₃OD, 600 MHz)**



APÊNDICE 15 – NOESY 1D da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)**APÊNDICE 16 – Mapa de contornos COSY da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)**

APÊNDICE 17 – Mapa de contornos HSQC da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)**APÊNDICE 18 – Mapa de contornos HMBC da substância 6 (CD₃OD, 600 MHz)**