

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química de Araraquara

MAYRA FONSECA COSTA

Estudo fitoquímico e avaliação da influência de cádmio no
metabolismo secundário de *Pontederia crassipes*

Araraquara

2021

MAYRA FONSECA COSTA

Estudo fitoquímico e avaliação da influência de cádmio no
metabolismo secundário de *Pontederia crassipes*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

C837e Costa, Mayra Fonseca
Estudo fitoquímico e avaliação da influência de cádmio
no metabolismo secundário de *Pontederia crassipes* / Mayra
Fonseca Costa. – Araraquara-SP : [s.n.], 2021
160 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Isabele Rodrigues Nascimento

1. Plantas aquáticas. 2. Aguapé (Planta). 3. *Trypanosoma
cruzi*. 4. Fitorremediação. 5. Cádmio. I. Título.

MAYRA FONSECA COSTA

Estudo fitoquímico e avaliação da influência de cádmio no metabolismo
secundário de *Pontederia crassipes*

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em
Química.

Araraquara, 7 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Isabele R. Nascimento

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Isabele R. Nascimento

Profa. Dra. Mirian Sannomiya
Universidade de São Paulo / USP / São Paulo - SP

Isabele R. Nascimento

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Universidade Federal de São Carlos / UFSCar / São Carlos - SP

Isabele R. Nascimento

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Universidade Federal do ABC / UFABC / Santo André - SP

Isabele R. Nascimento

Profa. Dra. Edilene Cristina Ferreira
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Mayra Fonseca Costa

Nome em citações científicas: Costa, M. F.

e-mail: mayra.costa@unesp.br

Endereço Profissional

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP.

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP 14.800-060, Araraquara, SP, Brasil.

Formação Acadêmica

2014

Graduação: Bacharelado em Química Ambiental (2010 – 2014)

Instituição: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi – TO.

2015 – 2017

Mestrado: Química de Produtos Naturais

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP – Instituto de Química de Araraquara – SP.

Dissertação: Co-Cultivo dos endófitos *Botryosphaeria parva* e *Saccharicola* sp.: avaliação da influência na biossíntese de produtos naturais e bioatividade.

2017 – 2021

Doutorado: Química de Produtos Naturais

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP – Instituto de Química de Araraquara – SP.

Tese: Estudo fitoquímico e avaliação da influência de cádmio no metabolismo secundário de *Pontederia crassipes*.

Publicações em Revistas Científicas

Costa, M. F.; Luiz, M. M.; de Souza, L. C.; Tempone, A. G.; Lago, J. H. G.; Nascimento, I. R.

Phenylnaphthalic anhydrides from water hyacinth (*Pontederia crassipes* Mart.).

Phytochemistry Letters, v. 46, p. 1-5, 2021.

Borges, M. S.; Biasetto, C. R.; Chapla, V. M.; Ebrahimi, S. N.; Costa, M. F.; Bolzani, V. S.;

Araujo, A. R. Assessment of Novel C-4 Methylated Tetraketide by HPLC-SPE-TT in

Saccharicola sp., na Endophytic Fungus in *Eugenia jambolana* Lam. **Journal of the**

Brazilian Chemical Society, v. 30, n. 3, p. 522-527, 2018.

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, **Pedro e Eva***

*A quem devo todas as minhas conquistas, que nunca me negaram amor e cuidado, que
batalharam juntamente comigo para que eu pudesse trilhar esse caminho.*

Aos meus queridos irmãos por me concederem todo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proteger em todos os momentos e pelo fortalecimento diário para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, por todo esforço, amor, compreensão e carinho que sempre me proporcionaram para que eu atingisse meus objetivos. Hoje, só tenho a agradecer, agradecer pelas inúmeras vezes que abriram mão de tantas coisas para que eu chegasse até aqui, e pelas palavras de força “não desanime Mayra, nós estamos sempre com você”, tudo isso para me ver feliz. E, por mais difícil que tenha sido eu sempre serei eternamente grata por tudo, e declaro que sem meus pais eu não seria essa pessoa que hoje me tornei.

Aos meus irmãos, tios e primos que juntamente com meus pais sempre me apoiaram e me deram força para eu prosseguir.

À minha orientadora Profa. Dra. Isabele Nascimento pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

Aos meus amigos Guilherme, Brenda e Camila pela amizade nesses 10 anos que trilhamos juntos no mesmo caminho.

A todos os professores do Departamento de Química Orgânica.

Ao Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago pela parceria e realização dos ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto pela parceria e realização das análises Espectrométricas de Absorção Atômica.

A Dra. Denise Medeiros Selegato pela colaboração e realização das análises quimiométricas.

Ao Dr. Nivaldo Boralle pela disponibilidade, paciência, amizade e todo suporte na compreensão dos espectros de RMN.

A Juliana e João pela colaboração e disponibilidade técnica.

Às funcionárias da Biblioteca e da pós-graduação pela dedicação.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

À UNESP pelo acolhimento, oportunidade e todo suporte concedido.

Ao CNPq (processo: 143281/2017-8) pela bolsa concedida e a CAPES e FAPESP pelo financiamento.

Tudo posso naquele que me fortalece. . . .

Filipenses 4:13

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

1 Coríntios 13:1.2

A persistência é o menor caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

Em decorrência dos problemas ocasionados pela contaminação do meio ambiente, diferentes tecnologias sustentáveis e economicamente viáveis estão sendo utilizadas para contribuir na remoção desses poluentes. Uma das abordagens é a fitorremediação, que envolve o uso de plantas para descontaminação do solo, da água e do ar. Neste contexto, as macrófitas aquáticas tem se destacado por apresentarem alta capacidade de remoção e acúmulo de metais. Diante disso, visando entender a possível influência dos metais e suas interações no metabolismo secundário de macrófitas aquáticas, estudamos neste trabalho a espécie *Pontederia crassipes* Mart. [$\equiv$ *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] (Pontederiaceae). Espécimes de *P. crassipes* foram cultivadas na ausência e presença de cádmio (0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹) e monitoradas a cada 48 horas por um período de seis dias. Após os experimentos de absorção do metal pelos espécimes, a concentração de cádmio foi determinada por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) tanto na água de cultivo, quanto nos tecidos vegetais da planta. Os resultados indicaram alta eficiência de remoção de cádmio da água por *P. crassipes*, atingindo valores de 90% (5,0 mg.L⁻¹) a 66% (20,0 mg.L⁻¹) ao final do tratamento. Nos tecidos vegetais, as maiores concentrações de cádmio foram detectadas nas raízes, com concentração máxima de aproximadamente 12 vezes em relação às partes aéreas. Análise quimiométrica dos dados obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM) dos extratos brutos das partes aéreas e raízes sugere que o metabolismo secundário de *P. crassipes* pode ter sofrido influência pela exposição ao Cd²⁺. Os extratos etanólicos das partes aéreas e raízes de *P. crassipes*, obtidos em larga escala, foram submetidos a processos cromatográficos proporcionando o isolamento e identificação de 17 substâncias de diferentes classes de compostos aromáticos, incluindo dois anidridos fenilnaftálicos inéditos (4-hidroxi-5-fenil-1,8-naftálico e 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil)-1,8-naftálico). As estruturas das substâncias foram estabelecidas por análises espectrométricas (Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM), Ultravioleta (UV)) e físicas (rotação óptica (α_D) e Dicroísmo Circular (DC)). As substâncias 2-hidroxi-8-(4-hidroxifenil)-fenalen-1-ona e 2-hidroxi-8-(3,4-diidroxifenil)-fenalen-1-ona foram avaliadas contra parasitas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e se mostraram moderadamente ativas com EC₅₀ de 37,7 μ M e 66,6 μ M, respectivamente.

Palavras-chave: *Pontederia crassipes*, *Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae, Anidridos fenilnaftálicos, Fenilfenalenonas, Cádmio.

ABSTRACT

Due to the problems caused by environmental contamination, different sustainable and economically viable technologies have been used to contribute to the removal of these pollutants. One of these approaches is phytoremediation, which involves the use of plants to decontaminate soil, water and air. In this context, aquatic macrophytes have stood out for their high capacity for removing and accumulating metals. Therefore, in order to understand the possible influence of metals and their interactions in the secondary metabolism of aquatic macrophytes, we studied in this work the species *Pontederia crassipes* Mart. [$\equiv$ *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] (Pontederiaceae). Specimens of *P. crassipes* were cultivated in the absence and presence of cadmium (0.0, 5.0, 10.0, 15.0 and 20.0 mg.L⁻¹) and monitored every 48 hours for a period of six days. After the metal absorption experiments by the specimens, the cadmium concentration was determined by Atomic Absorption Spectrometry (AAS) both in the culture water and in the plant tissues. The results indicated high efficiency of cadmium removal from water by *P. crassipes*, reaching values from 90% (5.0 mg.L⁻¹) to 66% (20.0 mg.L⁻¹) at the end of the treatment. In plant tissues, the highest concentrations of cadmium were detected in the roots, with a maximum concentration of approximately 12 times in relation to the aerial parts. Chemometric analysis of data obtained by Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (UPLC-MS) of crude extracts from shoots and roots suggests that the secondary metabolism of *P. crassipes* may have been influenced by exposure to Cd²⁺. Ethanol extracts from aerial parts and roots of *P. crassipes*, obtained on a large scale, were subjected to chromatographic processes providing the isolation and identification of 17 compounds from different classes of aromatic compounds, including two new phenylnaphthalic anhydrides (4-hydroxy-5-phenyl-1,8-naphthalic anhydride and 4-hydroxy-5-(4-hydroxyphenyl)-1,8-naphthalic anhydride). The structures of the compounds were established by spectrometric (Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Mass Spectrometry (MS), Ultraviolet (UV) and physical analysis (optical rotation (α_D) and Circular Dichroism (CD)). The compounds 2-hydroxy-8-(4-hydroxyphenyl)-phenalen-1-one and 2-hydroxy-8-(3,4-dihydroxyphenyl)-phenalen-1-one were evaluated against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote parasites and showed moderate activity with EC₅₀ of 37.7 μ M and 66.6 μ M, respectively.

Keywords: *Pontederia crassipes*, *Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae, Phenylnaphthalic anhydrides, Phenylphenalenones, Cadmium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Pontederia crassipes</i>	19
Figura 2 – Estruturas químicas das substâncias isoladas e/ou identificadas de <i>Pontederia crassipes</i>	21
Figura 3 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico da parte aérea de <i>P. crassipes</i>	48
Figura 4 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico das raízes de <i>P. crassipes</i>	49
Figura 5 – Isolamento dos metabólitos secundários da parte aérea de <i>P. crassipes</i>	50
Figura 6 – Isolamento dos metabólitos secundários das raízes de <i>P. crassipes</i>	51
Figura 7 – Cultivo de <i>Pontederia crassipes</i> em diferentes concentrações de Cd^{2+}	54
Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico da parte aérea de <i>P. crassipes</i> (DMSO- d_6 , 14,1 T)	60
Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico das raízes de <i>P. crassipes</i> (CDCl_3 , 14,1 T)	60
Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias isoladas e identificadas de <i>P. crassipes</i>	61
Figura 11 – Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de I	63
Figura 12 – Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de II	64
Figura 13 – Espectros expandidos de RMN de ^1H dos compostos I , II , Ia e IIa (CD_3OD , 14,1 T)	65
Figura 14 – Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC de Ia	65
Figura 15 – Via hipotética da biossíntese de derivados de fenilfenalenona em <i>Pontederia crassipes</i> . (a) Biossíntese de diaril-heptanoides através da via fenilpropanoide. (b) Oxidação. (c) Cicloadição intramolecular 4 + 2 (ciclização de Diels-Alder) e redução. (d) Enolização e redução. (e) Enolização e redução. (f) Hidrogenação. (g) Oxidação para radical (abstração de hidrogênio em C-8). (h) migração 1,2-aril. (i) Hidroxilação em C-9. (j) Desidratação. (k) Enolização e redução. (l) Oxidação em C-5. (m) Oxidação catalisada por uma dioxigenase putativa. (n) Descarboxilação e desidrogenação. (o) Hidratação. (p) Desidrogenação	69
Figura 16 – Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de V	71
Figura 17 – Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de XV	81

Figura 18 – Cultivo de <i>Pontederia crassipes</i> na primeira hora e após 144 horas de exposição ao Cd^{2+}	86
Figura 19 – Monitoramento da concentração de Cd presente na água (mg.L^{-1}) de cultivo de <i>P. crassipes</i> a cada 48 horas por seis dias (144 horas)	87
Figura 20 – Cromatograma do gradiente exploratório do extrato etanólico das partes aéreas de <i>P. crassipes</i> cultivadas na presença de $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$	90
Figura 21 – Cromatograma do gradiente exploratório do extrato etanólico das raízes de <i>P. crassipes</i> cultivadas na presença de $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$	90
Figura 22 – Gráficos de escores de PCA dos dados CLUE-EM de 30 amostras dos extratos de <i>P. crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (PC1 x PC2, variância total de 34,53%). a) gráfico sem o código das amostras, b) gráfico com o código das amostras referente a cada triplicata e concentração de Cd^{2+}	92
Figura 23 – Gráfico de escores de PCA dos dados CLUE-EM de 30 amostras dos extratos de <i>P. crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (PC1 x PC2, variância total de 38,94%)	93
Figura 24 – Gráficos de escores PLSr dos dados CLUE-EM das 30 amostras dos extratos de <i>P. crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} : a) partes aéreas, b) raízes	94
Figura 25 – Gráficos de Hotelling T2 vs Q Residual da PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das partes aéreas e raízes de <i>P. crassipes</i> : a) partes aéreas, b) raízes	95
Figura 26 – Gráficos Hotelling T2 vs Q Residual da PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das raízes de <i>P. crassipes</i>	97
Figura 27 – Gráficos de escores de PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das raízes de <i>P. crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd^{2+}	99
Figura 28 – Gráfico de <i>loading</i> de PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM de 15 amostras dos extratos das raízes de <i>P. crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (classe 1 = 0,0, classe 2 = 5,0 e 10,0, classe 3 = 15,0 e 20,0 mg.L^{-1} de Cd^{2+})	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias isoladas e/ou identificadas de <i>Pontederia crassipes</i>	26
Tabela 2 – Bioatividade de extratos de <i>Pontederia crassipes</i>	35
Tabela 3 – Extratos obtidos de <i>Pontederia crassipes</i>	59
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de I , II , Ia e Ila (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)	63
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de III e IV (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)	67
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de V (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)	71
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de VI (J em Hz, CD_3OD , 14,1T).....	72
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de VII e X (J em Hz, CD_3OD , 14,1T).....	74
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de VIII (J em Hz, CD_3OD , 14,1T).....	75
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de IX (J em Hz, CD_3OD , 14,1T).....	76
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XI (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T).....	77
Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XII (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)	78
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XIII (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T).....	78
Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XIV (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T).....	79
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XV (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T).....	81
Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XVI (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T).....	82
Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de XVII (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)	83
Tabela 18 – Valores de concentração efetiva (EC_{50}) das fenilfenalenonas III e IV nas linhagens testadas	84
Tabela 19 – Eficiência de remoção de diferentes concentrações de Cd da água ao longo do tempo por <i>Pontederia crassipes</i>	88
Tabela 20 – Concentração de Cd nas partes aéreas e raízes de <i>Pontederia crassipes</i> , fator de bioconcentração (BCF) e fator de translocação (TF) após 6 dias de tratamento.....	89
Tabela 21 – Resultados estatísticos do modelo PLSr aplicado no conjunto de dados CL-EM	94
Tabela 22 – Resultados estatísticos do modelo PLS-DA aplicado no conjunto de dados CLUE-EM das partes aéreas e raízes	96
Tabela 23 – Resultados estatísticos do modelo PLS-DA aplicado no conjunto de dados CLUE-EM das raízes (classe 1 = 0,0, classe 2 = 5,0 e 10,0, classe 3 = 15,0 e 20,0 mg.L^{-1} de Cd^{2+})	98
Tabela 24 – Valores de m/z , VIP e t_R obtidos na PLS-DA do conjunto de dados CLUE-EM das raízes.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia de Absorção Atômica</i>
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BCF	Fator de Bioconcentração
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COSY	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia Correlacional Homonuclear</i>
C18	Adsorvente de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
CE	Concentração Efetiva
CI	Concentração Inibitória
δ_C	Deslocamento Químico de Carbono
δ_H	Deslocamento Químico de Hidrogênio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCE	Dicroísmo Circular Eletrônico
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dq</i>	Duplo quadrupletto
<i>dt</i>	Duplo triplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	Sigla em inglês para o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de Massas
ESI-qQ-TOF	Sigla em inglês para <i>Ionização por Eletrospray – Tempo de Voo</i>
FAAS	Sigla em inglês para <i>Espectrometria de Absorção Atômica em Chama</i>
Fr.	Fração
HMBC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear de Ligação Múltipla</i>
HOAc	Ácido acético
HSQC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear Quântica Única</i>

HR-CS FAAS	Sigla em inglês para <i>Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama de Alta Resolução com Fonte Contínua</i>
IV	Infravermelho
IS	Índice de Seletividade
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
<i>m</i>	Multipleto
min.	Minutos
<i>m/z</i>	Razão Massa-Carga
PA	Padrão Analítico
PC	Sigla em inglês para <i>Componentes Principais</i>
PCA	Sigla em inglês para <i>Análise de Componentes Principais</i>
PLS-DA	Sigla em inglês para <i>Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais</i>
PLSr	Sigla em inglês para <i>Regressão por Mínimos Quadrados Parciais</i>
PN	Produtos Naturais
ppm	Parte por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Singlete
<i>sl</i>	Singlete largo
T	Tesla
<i>t</i>	Tripleto
TF	Fator de Translocação
TFA	Ácido trifluoracético
TIC	Cromatograma de Íons Totais
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
VIP	Sigla em inglês para <i>Variáveis Importantes na Projeção</i>
λ	Comprimento de Onda
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Pontederia crassipes</i> : uma fonte de produtos naturais.....	18
1.1.1.	Metabólitos secundários de <i>Pontederia crassipes</i> e atividades biológicas	20
1.1.2.	Bioatividade de extratos orgânicos e aquosos de <i>Pontederia crassipes</i>	34
1.2	Fitorremediação de metais.....	39
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos.....	43
3	MATERIAIS E METODOLOGIA	44
3.1	Descrição de Equipamentos e Materiais.....	44
3.1.1.	Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e em Coluna (CC)	44
3.1.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
3.1.3.	Espectrômetros	45
3.2	Coleta da espécie vegetal <i>Pontederia crassipes</i>	46
3.3	Obtenção dos extratos de <i>Pontederia crassipes</i>	46
3.4	Triagem química dos extratos vegetais	46
3.5	Obtenção e fracionamento dos extratos etanólicos de <i>Pontederia crassipes</i>	47
3.6	Isolamento dos metabólitos secundários	49
3.7	Ensaio biológicos.....	52
3.7.1.	Atividade antileishmania.....	52
3.7.2.	Atividade tripanocida	52
3.7.3.	Avaliação da citotoxicidade	53
3.8	Cultivo de <i>Pontederia crassipes</i> na presença e ausência de cádmio (Cd^{2+}).....	53
3.9	Obtenção e triagem química dos extratos de <i>Pontederia crassipes</i> cultivadas na presença e ausência de Cd^{2+}	54
3.9.1.	Análise quimiométrica dos extratos de <i>Pontederia crassipes</i>	55
3.9.1.1	Processamento dos dados experimentais.....	55
3.10	Determinação de Cd por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Obtenção e triagem química dos extratos.....	59
4.2	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de <i>Pontederia crassipes</i>	61

4.2.1.	Anidridos fenilnaftálicos e derivados (I, Ia, II e IIa)	62
4.2.2.	Fenilfenalenonas III e IV	66
4.2.3.	Fenilfenalenos V e VI	70
4.2.4.	Derivados de C ₆ -C ₃ (VII, VIII, IX e X).....	73
4.2.5.	Derivados de C ₆ e C ₆ -C ₁ (XI, XII, XIII e XIV).....	77
4.2.6.	Derivados indólicos (XV e XVI).....	80
4.2.7.	Adenosina esterificada (XVII)	82
4.3	Ensaio biológico	84
4.4	Cultivo de <i>Pontederia crassipes</i> na presença e ausência de Cd ²⁺	86
4.5	Determinação de Cd nos tecidos vegetais de <i>Pontederia crassipes</i> e na solução de cultivo ...	87
4.6	Avaliação do perfil químico dos extratos de <i>Pontederia crassipes</i> após cultivo na presença e ausência de Cd ²⁺	89
4.7	Análise quimiométrica dos extratos de <i>Pontederia crassipes</i> cultivada na presença e ausência de Cd ²⁺	90
4.7.1	Análise de Componentes Principais (PCA).....	91
4.7.2	Análise supervisionada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	93
4.7.3	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	95
5	CONCLUSÃO	103
6	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Pontederia crassipes*: uma fonte de produtos naturais

Ao longo dos anos, a Química de Produtos Naturais tem desempenhado um importante papel e contribuído veementemente com o desenvolvimento e descoberta de uma gama de compostos úteis com diversas aplicações, favorecendo o avanço científico e tecnológico nas mais diversas áreas (KHAN, 2018).

Os produtos naturais são metabólitos derivados de plantas, insetos, micro-organismos ou animais que, em sua grande maioria, apresentam variabilidade química e biológica específica (LARAIA; ROBKE; WALDMANN, 2018; NIGAM et al., 2019). Os produtos naturais oriundos das plantas foram a base para o desenvolvimento da medicina tradicional. Devido às descobertas de vários compostos bioativos de grande relevância, como o Paclitaxol (Taxol®), fármaco anticancerígeno isolado inicialmente de plantas do gênero *Taxus* (NEWMAN; CRAGG, 2020a), o ácido acetilsalicílico originado naturalmente da salicina glicosilada, encontrada em espécies de plantas dos gêneros *Salix* e *Populus* (STROBEL; DAISY, 2003), a artemisinina, obtida de *Artemisia annua*, que apresenta atividade antimalárica (NEWMAN; CRAGG, 2020b), entre outros, foi possível o avanço em estudos científicos voltados para a Química de Produtos Naturais em todo o mundo.

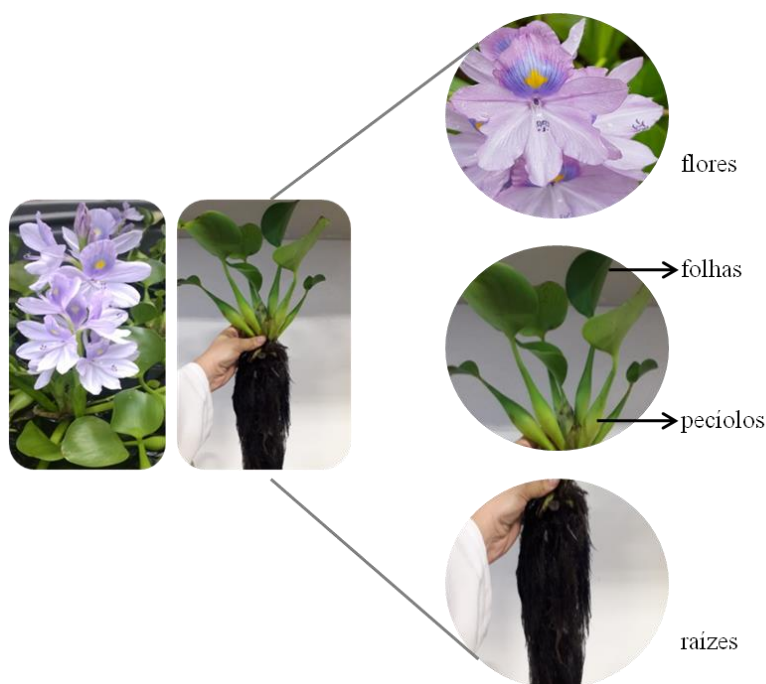
Atualmente, mesmo com a inserção de novos produtos sintéticos no mercado, as plantas e outras fontes naturais continuam sendo amplamente investigadas, graças aos avanços tecnológicos e ao desenvolvimento de diferentes ferramentas de pesquisa, como técnicas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas (NEWMAN; CRAGG, 2020b). Dentre os organismos naturais estudados, mais de 400 mil são compostos por plantas (CHEEK et al., 2020; LUGHADHA et al., 2016).

A espécie *Pontederia crassipes* pertence à Pontederiaceae, uma pequena família de plantas aquáticas ou palustres. Até 2018, esta família era classificada em quatro gêneros (*Eichhornia* Kunth, *Heteranthera* Ruiz & Pavón, *Monochoria* C. Presl e *Pontederia* L.), com aproximadamente 45 espécies (PELLEGRINI; HORN; ALMEIDA, 2018; LALITHA; SRIPATHI; JAYANTHI, 2012). Em 2018, Pellegrini e colaboradores, com base em estudos morfológicos e dados moleculares, reclassificaram a família em dois gêneros (*Heteranthera* Ruiz & Pavón e *Pontederia* L.) e 41 espécies. O gênero *Pontederia* L., com maior número de espécies, é dividido em cinco subgêneros (*Cabanisia* (Klotzsch ex Schldtl.) M.Pell. & C.N.Horn, *Eichhornia* (Kunth) M.Pell. & C.N.Horn, *Monochoria* (C.Presl) M.Pell. &

C.N.Horn, *Oshunae* M.Pell. & C.N.Horn, e *Pontederia*). Dentre os subgêneros, destaca-se *Oshunae* por ser monoespecífico, sendo composto somente por *Pontederia crassipes* Mart. [= *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] (PELLEGRINI; HORN; ALMEIDA, 2018). Como a reclassificação da família é recente (2018), a maioria dos trabalhos descritos na literatura e citados no corpo desta Tese utilizou a sinonímia *Eichhornia crassipes* para a espécie *Pontederia crassipes*.

Pontederia crassipes (Figura 1) é conhecida popularmente como aguapé, jacinto d'água, orelha-de-jegue e miriru, sendo originalmente nativa das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Possui uma distribuição cosmopolita, mas normalmente é encontrada em regiões quentes e úmidas (CORNELIUS et al., 2016; LALITHA; SRIPATHI; JAYANTHI, 2012; RAI; SINGH, 2016). É uma macrófita de flutuação livre, que se prolifera rapidamente e, portanto, pode causar efeitos negativos no meio ambiente e no desenvolvimento de atividades econômicas. Por outro lado, em virtude de sua elevada taxa de crescimento, fácil obtenção e baixo custo, é alvo de estudo por muitos pesquisadores para fins de fitorremediação (RAI; SINGH, 2016). Devido a essas características, principalmente à ação fitorremediadora, esta espécie pode atuar como um bioindicador da qualidade dos corpos hídricos, uma vez que sua reprodução está diretamente relacionada com a disponibilidade de nutrientes, temperatura e iluminação da água (CORNELIUS et al., 2016).

Figura 1– *Pontederia crassipes*



Fonte: Mayra F. Costa.

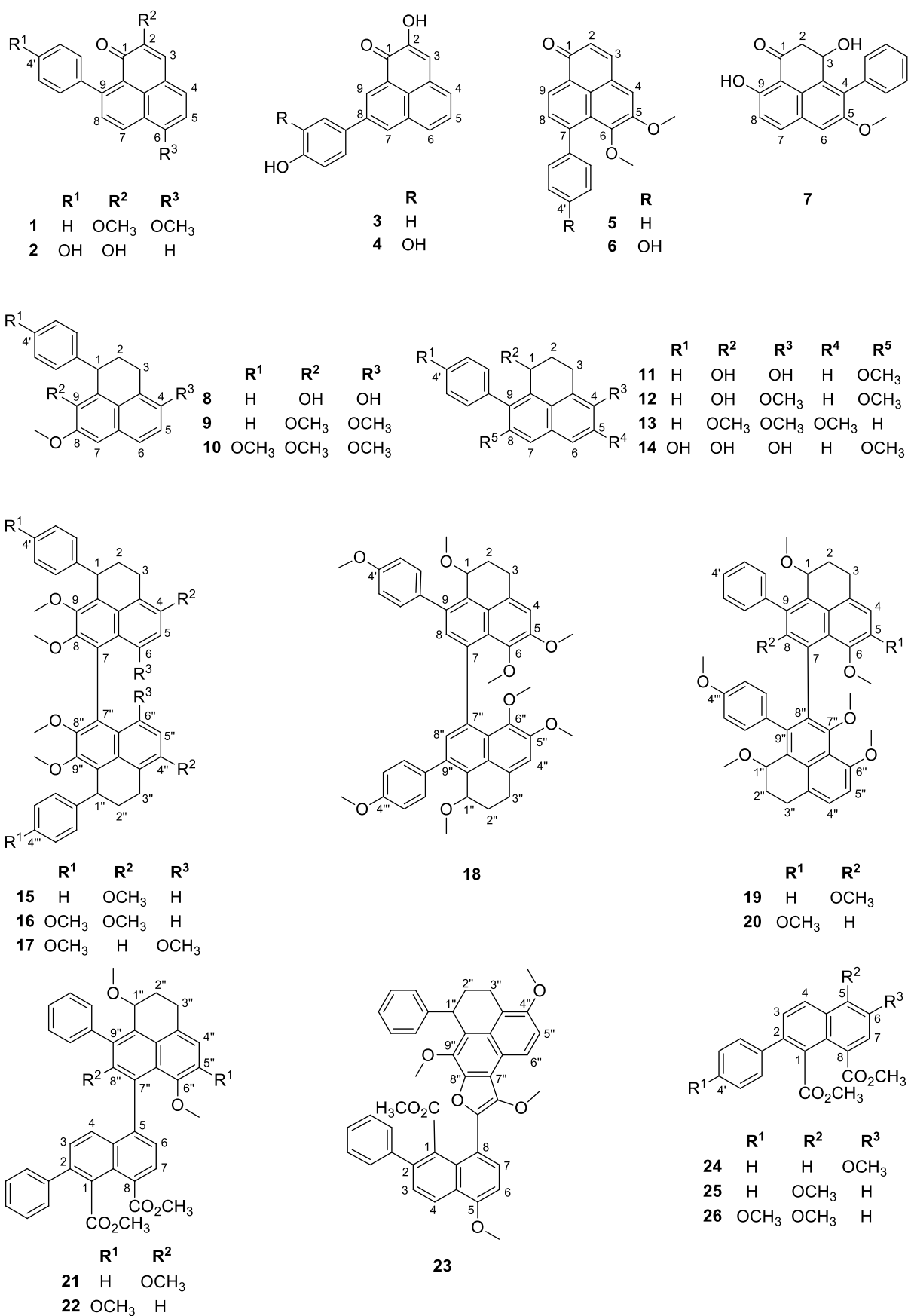
Por ser considerada uma planta invasora que atinge altas densidades (acima de 60 kg.m⁻²), biodegradável e com altos teores de celulose e hemicelulose, o aguapé tem se tornado uma matéria-prima alternativa na produção de bioenergia. Sua biomassa pode ser usada na agricultura como fertilizante, fonte de proteína para nutrição animal e fibra para ruminantes. Além disso, é usada na fabricação de borracha natural, em processos de adsorção, na preparação de combustível de alto valor calórico, cogeração de H₂ e CH₄ e combustíveis líquidos como o bioetanol. O uso do aguapé para produção do bioetanol, por exemplo, é uma alternativa promissora, pois além de agregar valor à biomassa ajuda no controle de sua rápida proliferação (KAYATHRI; KANIMOZHI; PANNEERSELVAM, 2015; LALITHA; SRIPATHI; JAYANTHI, 2012; MISHRA; MAITI, 2017; WANG; ZHENG; XUE, 2019).

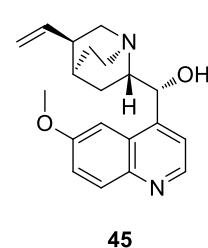
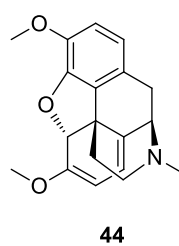
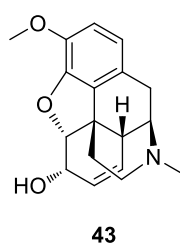
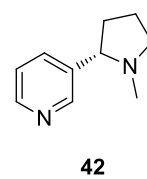
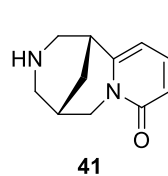
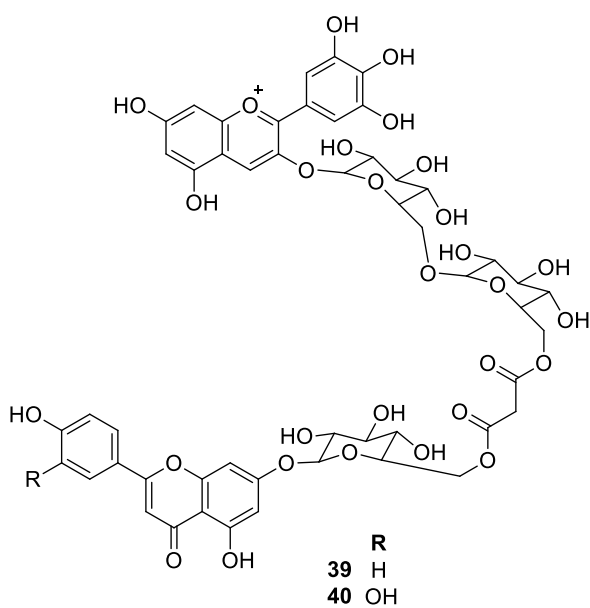
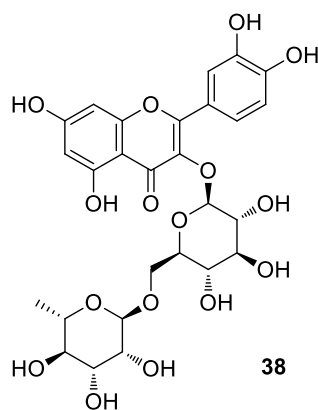
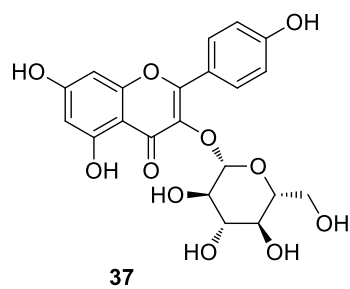
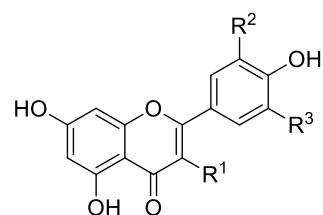
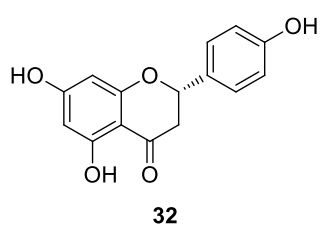
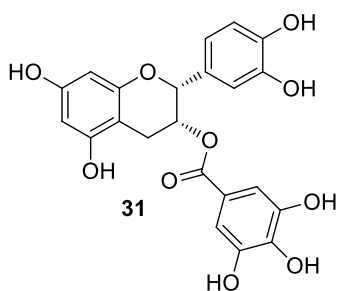
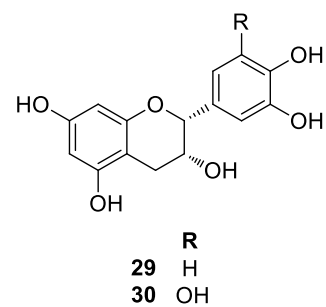
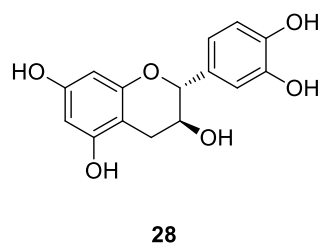
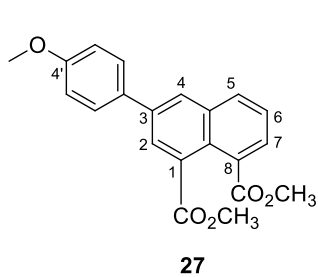
Estudos recentes revelam que o aguapé também pode ser usado na preparação de ecocatalisadores devido à alta capacidade de acumular metais em seus tecidos. Olszewski e colaboradores (2019) mostraram a utilização da biomassa do aguapé na preparação de catalisadores biológicos à base de cobre para serem empregados em reações mediadas por Cu, como reações de acoplamento, oxidação e redução. Essas reações são importantes na síntese de biomoléculas, derivados de produtos naturais e no desenvolvimento de fármacos (OLSZEWSKI; ADLER; GRISON, 2019).

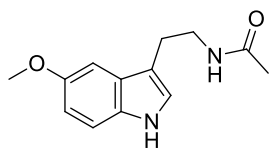
Tradicionalmente, *P. crassipes* é usada na medicina popular como sedativo, afrodisíaco, refrescante, febrífugo e diurético. Além disso, é comumente conhecida por seus efeitos alelopáticos sobre algas, outras espécies de plantas e possíveis ataques de patógenos (CORNELIUS et al., 2016; GUTIÉRREZ-MORALES et al., 2017; POTT, V. J; POTT, A., 2000).

1.1.1. Metabólitos secundários de *Pontederia crassipes* e atividades biológicas

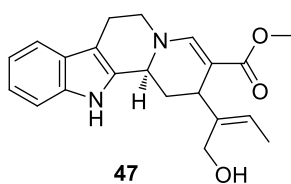
Estudos fitoquímicos mostram a diversidade de metabólitos derivados do fenaleno isolados de *P. crassipes* (DELLA GRECA et al., 1992a; DELLA GRECA; PREVITERA; ZARRELLI, 2008; RAI; SINGH, 2016). Além desses, foram identificados outros metabólitos (primários e secundários) pertencentes a diferentes classes como flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos, monossacarídeos, terpenoides, ácidos graxos, entre outros (Figura 2, Tabela 1).

Figura 2– Estruturas químicas das substâncias isoladas e/ou identificadas de *Pontederia crassipes*

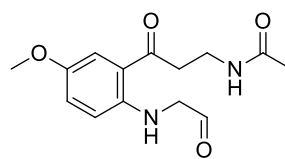




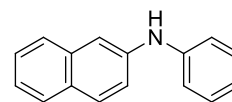
46



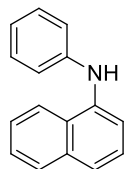
47



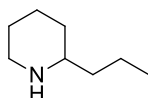
48



49



50



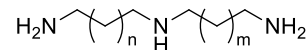
51



52 n = 1

53 n = 2

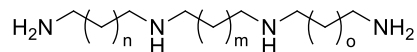
54 n = 3



55 n = 1, m = 1

56 n = 2, m = 2

57 n = 1, m = 2

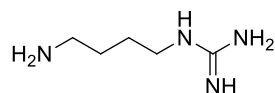


58 n = 1, m = 1, o = 1

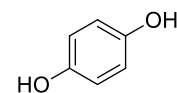
59 n = 2, m = 1, o = 1

60 n = 1, m = 2, o = 1

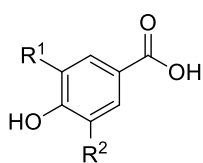
61 n = 2, m = 2, o = 2



62

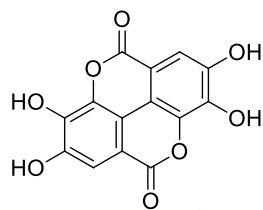


63

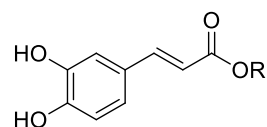
R¹ R²

64 OH H

65 OH OH

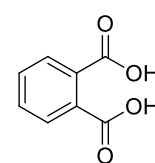
66 OCH₃ H

67

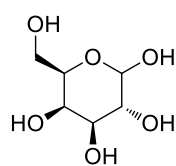


R

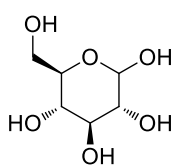
68 H

69 CH₃

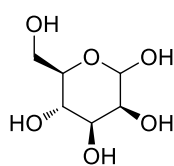
70



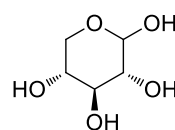
71



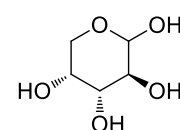
72



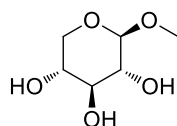
73



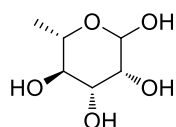
74



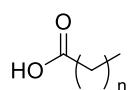
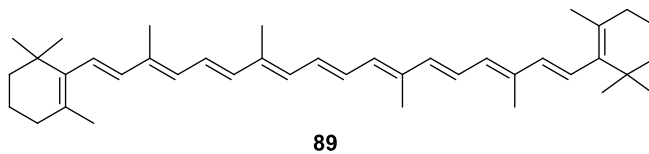
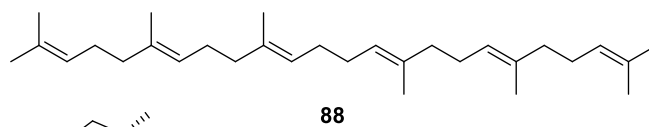
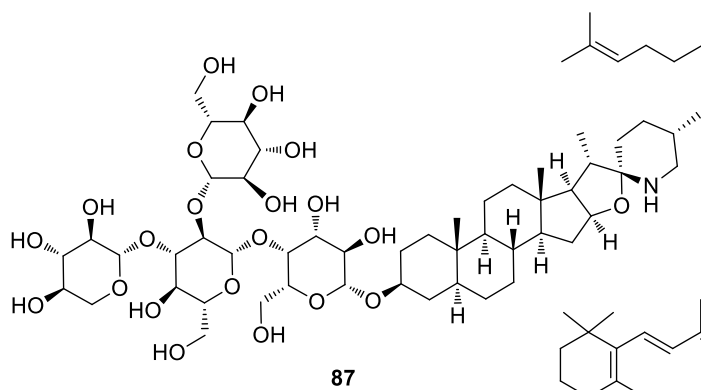
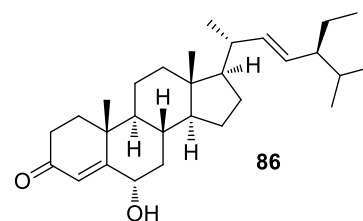
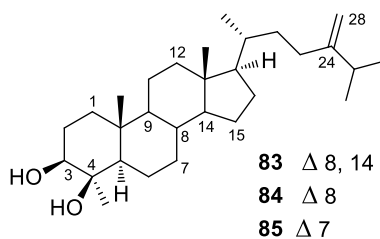
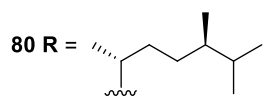
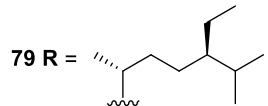
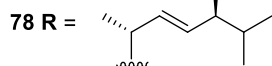
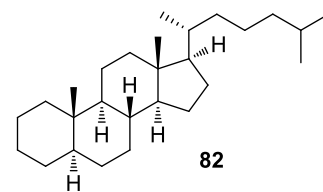
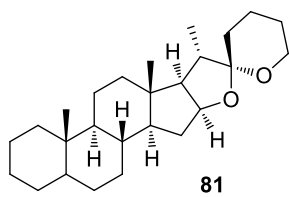
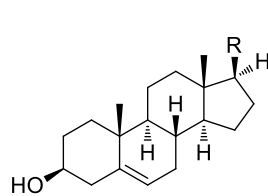
75



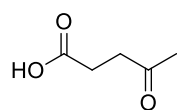
76



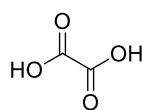
77



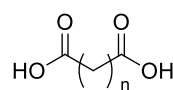
90 $n = 6$
91 $n = 7$
92 $n = 12$
93 $n = 10$
94 $n = 14$
95 $n = 13$
96 $n = 16$



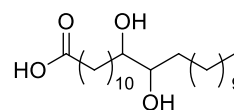
97



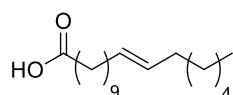
98



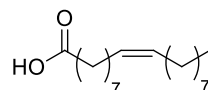
99 $n = 1$
100 $n = 2$
101 $n = 7$



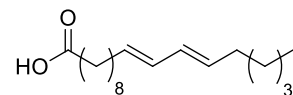
102



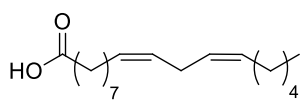
103



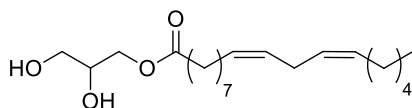
104



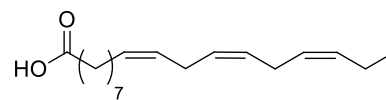
105



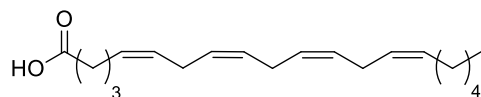
106



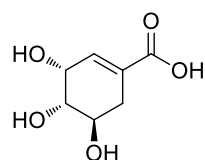
107



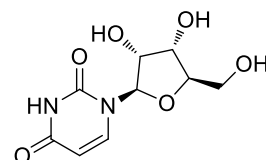
108



109



110



111

Fonte: Mayra F. Costa.

Tabela 1– Substâncias isoladas e/ou identificadas de *Pontederia crassipes*

Nº	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
1	2,6-dimetoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona* (= éter dimetílico de lacnanticarpona)	planta inteira	acetato de etila, metanol	(Della Greca et al., 1992b; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2009; Li et al., 2019; Wang; Cai; Luo, 2011)
2	2-hidroxi-9-(4-hidroxifenil)-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona (= hidroxianigorufona)	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
3	2-hidroxi-8-(4-hidroxifenil)-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona	planta inteira, folhas + raízes	acetona, metanol	(Holscher; Schneider, 2005; Wang; Cai; Luo, 2011)
4	2-hidroxi-8-(3,4-diidroxifenil)-fenalen-1-ona	folhas + raízes	acetona	(Holscher; Schneider, 2005)
5	5,6-dimetoxi-7-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
6	7-(4-hidroxifenil)-5,6-dimetoxi-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
7	2,3-diidro-3,9-diidroxi-5-metoxi-4-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-1-ona	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
8	2,3-diidro-8-metoxi-1-fenil-1 <i>H</i> -fenaleno-4,9-diol	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2009)
9	(1 <i>S</i>)-2,3-diidro-4,8,9-trimetoxi-1-fenil-1 <i>H</i> -fenaleno*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992b**; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2008)
10	2,3-diidro-4,8,9-trimetoxi-1-(4-metoxifenil)-1 <i>H</i> -fenaleno*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992b**; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2008)
11	2,3-diidro-8-metoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenaleno-1,4-diol	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
12	2,3-diidro-4,8-dimetoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-1-ol	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
13	2,3-diidro-1,4,5-trimetoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenaleno*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a**; Della Greca et al., 1992b)
14	2,3-diidro-9-(4-hidroxifenil)-8-metoxi-1 <i>H</i> -fenaleno-1,4-diol	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
15	4,4",8,8",9,9"-hexametoxi-1,1"-difetil-2,2",3,3"-tetraidro-7,7"-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a**; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2008)
16	4,4',4",4"',8,8",9,9"-octametoxi-1,1"-difetil-2,2",3,3"-tetraidro-7,7"-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a**; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2008)

N°	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
17	4',4'',6,6'',8,8'',9,9''-octametoxi-1,1''-difetil-2,2'',3,3''-tetraidro-7,7''-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a**; Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2008)
18	1,1'',4',4'',5,5'',6,6''-octametoxi-9,9''-difetil-2,2'',3,3''-tetraidro-7,7''-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a)
19	1,1'',4'',6,6'',7'',8-heptametoxi-9,9''-difetil-2,2'',3,3''-tetraidro-7,8''-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a)
20	1,1'',4'',5,6,6'',7''-heptametoxi-9,9''-difetil-2,2'',3,3''-tetraidro-7,8''-bi(1 <i>H</i> -fenaleno)*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1992a)
21	5-(2,3-diidro-1,6,8-trimetoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-7-il)-2-fenil-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1993)
22	5-(2,3-diidro-1,5,6-trimetoxi-9-fenil-1 <i>H</i> -fenalen-7-il)-2-fenil-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1993)
23	5-metoxi-2-fenil-8-(3,7,10-trimetoxi-6-fenil-5,6-diidro-4 <i>H</i> -fenaleno[2,1- <i>b</i>]furan-9-il)-1-naftoato de metila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2009)
24	6-metoxi-2-fenil-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1993)
25	5-metoxi-2-fenil-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila *	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1993)
26	5-metoxi-2-(4-metoxifenil)-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca et al., 1993)
27	3-(4-metoxifenil)-naftaleno-1,8-dicarboxilato de dimetila*	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Previtera; Zarrelli, 2009)
28	catequina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
29	epicatequina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
30	epigallocatequina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
31	galato de epicatequina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
32	naringenina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
33	kaempferol	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
34	quercetina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
35	miricetina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)

N°	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
36	apigenina	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
37	astragalina (= kaempferol 3- <i>O</i> - β -glicosídeo)	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
38	rutina = quercetina 3- <i>O</i> - α -ramnopiranosil(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glicopiranosídeo	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
39	(6'''- <i>O</i> -(delfinidina 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -(β -D-glicopiranosil)- β -D-glicopiranosil))) (6"- <i>O</i> -(apigenina 7- <i>O</i> -(β -D-glicopiranosil)))malonato (= antocianina A de <i>Eichhornia</i>)	flores	5% ácido acético	(Toki et al., 1994)
40	6'''- <i>O</i> -(delfinidina 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -(β -D-glicopiranosil)- β -D-glicopiranosil)) (6"- <i>O</i> -(luteolina 7- <i>O</i> -(β -D-glicopiranosil))) malonato (= antocianina B de <i>Eichhornia</i>)	flores	5% ácido acético	(Toki et al., 2004)
41	citisina	brotos, rizoma	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
42	nicotina	rizoma	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
43	codeína	brotos	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
44	tebaína	brotos	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
45	quinina	brotos	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
46	melatonina	folhas, flores	tampão fosfato	(Tan et al., 2007)
47	diidrovalesiachotamina	planta inteira	metanol	(Shanab et al., 2010)
48	<i>N</i> ¹ -acetil- <i>N</i> ² -formil-5-metoxiquinuramina (= AFMK)	folhas, flores	tampão fosfato	(Tan et al., 2007)
49	<i>N</i> -fenil-2-naftilamina	exsudado das raízes	acetona, methanol	(Pei et al., 2018; Sun et al 1993; Yang et al., 1992)
50	<i>N</i> -fenil-1-naftilamina	raízes	não relatado	(Sun et al., 1993)
51	2-propilpiperidina (= coniina)	raízes	acetona	(Usharani, 2010)
52	1,3-diaminopropano	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
53	putrescina	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
54	cadaverina	raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
55	norspermidina	folhas	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)

N°	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
56	homospermidina	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
57	espermidina	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
58	norspermina	folhas	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
59	termospermina	folhas	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
60	espermina	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
61	homospermina	folhas	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
62	agmatina	folhas, raízes	0,6 M HClO ₄	(Hamana et al., 1994)
63	1,4-benzenodiol (= 1,4-diidroxibenzeno = hidroquinona)	folhas	metanol	(Mtewa; Sesaaazi; Lampiao, 2020)
64	ácido protocatecuico (= ácido 3,4-diidroxibenzoico)	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
65	ácido gálico (= ácido 3,4,5-triidroxibenzoico)	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
66	ácido vanílico (= ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico)	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
67	ácido elágico	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
68	ácido cafeico	planta inteira	metanol/água	(Ganesh; Sharma, 2018)
69	ferulato de metila (= 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoato de metila)	planta inteira	metanol	(Wang; Cai; Luo, 2011)
70	ácido ftálico (= ácido <i>o</i> -benzenodicarboxílico)	brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
71	galactose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)
72	glicose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)
73	manose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)
74	xilose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)
75	arabinose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)
76	etil β-xilopiranosídeo	planta inteira	etanol	(Cardoso, 2013)
77	ramnose	planta inteira	clorofórmio, metanol	(Arifkhodzhaev; Shoyakubov, 1995)

N°	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
78	stigmasterol	planta inteira, raízes, brotos, folhas	benzeno e etanol/KOH, acetona, clorofórmio, hexano, metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015; Goswami et al., 1983; Pião; Lopes; Nascimento, 2010; Singh et al., 2015)
79	sitosterol	planta inteira, folhas, raízes, brotos	benzeno e etanol/KOH, acetona	(Goswami et al., 1983; Rai; Singh, 2016)
80	campesterol	planta inteira, folhas, raízes, brotos	benzeno e etanol/KOH, acetona	(Goswami et al., 1983; Pião; Lopes; Nascimento, 2010)
81	espirostana	raízes	acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
82	colestano	folhas	ciclohexano	(Fileto-Pérez et al., 2015)
83	(3 β ,4 β ,5 α)-4-metil-ergosta-8,14,24(28)-trieno-3,4-diol	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Monaco; Previtera, 1991)
84	(3 β ,4 β ,5 α)-4-metil-ergosta-8,24(28)-dieno-3,4-diol	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Monaco; Previtera, 1991)
85	(3 β ,4 β ,5 α)-4-metil-ergosta-7,24(28)-dieno-3,4-diol	planta inteira	acetato de etila	(Della Greca; Monaco; Previtera, 1991)
86	(6 α ,22E)-6-hidroxi-estigmasta-4,22-dien-3-ona	raízes	acetona	(Wu et al., 1991)
87	tomatina	brotos, rizoma	ácido acético/etanol	(Lata; Dubey, 2010)
88	esqualeno	folhas, brotos, raízes	ciclohexano, hexano, metanol, acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
89	β -caroteno	parte aérea, raízes	éter de petróleo	(Panchanadikar et al., 2005)
90	ácido caprílico (= ácido octanoico)	folhas, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
91	ácido pelargônico (= ácido nonanoico)	folhas, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
92	ácido mirístico (= ácido tetradecanoico)	folhas, brotos, raízes	ciclohexano, hexano, metanol, acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
93	ácido láurico (= ácido dodecanoico)	brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
94	ácido palmítico (= ácido hexadecanoico)	brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
95	ácido pentadecanoico	folhas, brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
96	ácido octadecanoico (= ácido esteárico)	folhas, brotos, raízes	metanol, hexano	(Fileto-Pérez et al., 2015)

N°	Nome	Parte da planta	Extrato (solvente)	Referência
97	ácido levulínico (= ácido 4-oxopentanoico)	raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
98	ácido oxálico (= ácido etanodioico)	brotos	metanol, hexano	(Fileto-Pérez et al., 2015)
99	ácido malônico (= ácido propanodioico)	folhas, brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
100	ácido succínico (= ácido butanodioico)	brotos, raízes	metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
101	ácido nonanodioico	raízes	metanol	(Mtewa; Sesaazi; Lampiao, 2020)
102	ácido tetracosânico (= ácido 12,13-diidroxitetracosanoico)	folhas, brotos	acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
103	ácido vacênico (= ácido (11 <i>E</i>)-11-octadecenoico)	folhas, brotos	hexano, metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
104	ácido oléico (= ácido (9 <i>Z</i>)-9-octadecenoico)	folhas, brotos	acetona, hexano	(Fileto-Pérez et al., 2015)
105	ácido 10,12-octadecadienoico	folhas, brotos, raízes	hexano, acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
106	ácido linoleico (= ácido (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-9,12-octadecadienoico)	folhas, brotos	metanol, hexano	(Fileto-Pérez et al., 2015)
107	octadecadienoato de (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-2,3-diidroxipropila (= linoleato de 1-glicerila)	raízes	acetona	(Yang et al, 1992)
108	ácido linolênico (= ácido (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-9,12,15-octadecatrienoico)	folhas, brotos, raízes	hexano, metanol	(Fileto-Pérez et al., 2015)
109	ácido araquidônico = (5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i>)-5,8,11,14- ácido eicosatetraenoico	folhas, brotos, raízes	ciclohexano, hexano, metanol, acetona	(Fileto-Pérez et al., 2015)
110	ácido chiquímico (= ácido (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4,5-triidroxiciclohex-1-eno-1-carboxílico)	parte aérea, folhas, raízes	metanol, água	(Cardoso; Lopes; Nascimento, 2014; Lenora et al., 2016)
111	uridina	planta inteira	etanol	(Pião; Lopes; Nascimento, 2010)

* Composto caracterizado como derivado metílico.

**Artigo original cuja estrutura foi revisada posteriormente.

Pontederia crassipes é rica em esteroides, ácidos orgânicos e polissacarídeos (ARIFKHODZHAEV; SHOYAKUBOV, 1995; FILETO-PÉREZ et al., 2015; JAYANTHI; LALITHA; AARTHI, 2012). Stigmasterol (**78**), β -sitosterol (**79**) e campesterol (**80**) são os esteroides mais comuns relatados nessa espécie. O stigmasterol (**78**) é de grande relevância, pois representa um dos principais precursores de esteroides usados no mundo, devido principalmente a possibilidade de conversão em outros esteroides biologicamente ativos (GOSWAMI et al., 1983). Os ácidos orgânicos são conhecidos por apresentarem atividades biológicas (antimicrobiana, nematicida, pesticida, anticancerígeno, entre outras) e desempenharem funções vitais no metabolismo das plantas, como tamponamento do pH dentro das células, controle da osmolaridade do citosol e quelação de cátions tóxicos para solubilizar grupos fosfato (FILETO-PÉREZ et al., 2015; PRABAKARAN; MANI, 2017).

Polissacarídeos solúveis em água (WSPSs), substâncias pectínicas (PCSs) e hemiceluloses (HCs) estão presentes nos tecidos vegetais de *P. crassipes* em altos teores. Todos os polissacarídeos encontrados contêm ácidos urônicos (UAs), bem como açúcares neutros. Em WSPSs, os açúcares predominantes incluem galactose (**71**), glicose (**72**), xilose (**74**) e arabinose (**75**). Galactose, glicose, arabinose, ramnose (**77**) e ácidos urônicos são predominantes nas pectinas (ARIFKHODZHAEV; SHOYAKUBOV, 1995).

Antocianinas derivadas da delfinidina (**39** e **40**) foram identificadas como os pigmentos responsáveis pela coloração roxa das flores de *P. crassipes* (TOKI et al., 1994, 2004). De acordo com Figueiredo et al. (1996) a forte coloração das flores é mantida devido a estabilidade das moléculas aciladas, causada por um fenômeno estrutural de copigmentação intramolecular que protege as formas coloridas contra ataque nucleofílico de água, bloqueando a formação de espécies hidratadas.

Em *P. crassipes*, uma classe de substância que tem se destacado é as fenilfenalenonas (**1-7**) e seus derivados. Fenilfenalenonas são constituídas de um núcleo fenaleno com uma unidade cetônica e substituído por um anel fenílico (NORMAN et al., 2019) (Figura 2). Na literatura, vários estudos relatam a importância dessas substâncias por atuarem no mecanismo de defesa das plantas e pelo papel como fitoalexinas e fitoanticipinas. Além disso, estudos recentes demonstram o potencial das fenilfenalenonas como agentes leishmanicidas (NORMAN et al., 2019).

Li e colaboradores (2019) relatam que a fenilfenalenona 2,6-dimetoxi-9-fenil-1*H*-fenalen-1-ona (**1**), conhecida também como éter dimetílico de lacnanticarpona, apresentou atividade antifúngica moderada contra *Candida albicans*. Já outros derivados de fenaleno, como (1*S*)-2,3-diidro-4,8,9-trimetoxi-1-fenil-1*H*-fenaleno (**9**), 2,3-diidro-4,8,9-trimetoxi-1-(4-

metoxifenil)-1*H*-fenaleno (**10**) e 2,3-diidro-1,4,5-trimetoxi-9-fenil-1*H*-fenaleno (**13**), mostraram efeitos inibitórios no crescimento da alga *Porphyridium aerugineum* (DELLA GRECA et al., 1992b; DELLA GRECA; PREVITERA; ZARRELLI, 2008).

Recentemente, Cheng e colaboradores (2021) realizaram uma investigação fitoquímica da fração AcOEt do extrato metanólico das raízes de aguapé, que resultou no isolamento e identificação de 56 compostos. Dentre estes, foram elucidados 11 novos derivados de fenalenos, incluindo fenilfenalenonas e anidridos naftálicos, e identificados 45 compostos conhecidos (19 fenilfenalenos, 22 compostos fenólicos e quatro esteróides). Três derivados de fenalenos e quatro compostos fenólicos apresentaram potente atividade na inibição do crescimento da alga *Microcystis aeruginosa* (CHENG et al., 2021).

Além dos derivados de fenaleno, *P. crassipes* possui uma gama de fitoconstituintes com propriedades biológicas incluindo atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antialga, aleloquímica, inseticida, entre outras (LALITHA; SRIPATHI; JAYANTHI, 2012; LI et al., 2019).

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa foi realizado o isolamento e identificação do ácido chiquímico (**110**) (CARDOSO; LOPES; NASCIMENTO, 2014). Este metabólito destaca-se por apresentar atividades antioxidante, anticoagulante, antibacteriana, anti-inflamatória e analgésica, e atuar como o precursor da síntese do medicamento fosfato de oseltamivir, conhecido comercialmente como Tamiflu®, um antiviral oral usado no tratamento de gripes humanas provocadas pelos vírus H1N1 (gripe suína) e H5N1 (gripe aviária) (CARDOSO; LOPES; NASCIMENTO, 2014; LENORA et al., 2016). De acordo com Lenora et al. (2016), a principal fonte de extração de ácido chiquímico são os frutos do anis estrelado chinês, *Illicium verum* Hook. f. Porém, o tempo de obtenção de seus frutos é de aproximadamente seis anos após o plantio. Análise quantitativa revelou que o extrato hexânico das folhas de *P. crassipes* apresentou maior concentração de ácido chiquímico (3,25%) do que em anis estrelado (1,77%), demonstrando o potencial de *P. crassipes* como fonte renovável para a extração deste metabólito (LENORA et al., 2016).

O composto **47**, isolado do extrato metanólico de *P. crassipes*, apresentou atividade alelopática/antialga (*Chlorella vulgaris*), antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) (SHANAB et al., 2010). Além desses, os esteróis (3 β ,4 β ,5 α)-4-metil-ergosta-8,14,24(28)-trieno-3,4-diol (**83**) e (3 β ,4 β ,5 α)-4-metil-ergosta-8,24(28)-dieno-3,4-diol (**84**) mostraram inibição de 40% e 30%, respectivamente, no alongamento das raízes de *Raphanus sativus* L. O (6 α ,22*E*)-6-hidroxi-estigmasta-4,22-dien-3-ona (**86**) atuou como algicida contra

Chlamydomonas reinhard com CI_{50} 10 $\mu\text{g}/\text{disco}^3$ (DELLA GRECA; MONACO; PREVITERA, 1991; WU et al., 1991).

Efeitos alelopáticos também foram exibidos pelos alcalóides *N*-fenil-2-naftilamina (49), com ação algicida sobre a alga verde *Scenedesmus quadricauda* e a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, e por *N*-fenil-1-naftilamina (50) sobre *Chlamydomonas reinhardtii*. Já o composto 2-propilpiperidina (51) apresentou atividade inseticida contra *Achaea janata* e *Spodoptera litura* (PEI et al., 2018; SUN et al., 1993; USHARANI et al., 2010).

1.1.2. Bioatividade de extratos orgânicos e aquosos de *Pontederia crassipes*

Além das atividades biológicas exercidas pelos metabólitos secundários puros isolados de *P. crassipes*, muitos pesquisadores relatam a potencialidade de seus extratos quanto às atividades aleloquímica, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiparasitária, larvicida, inseticida e antioxidante (Tabela 2).

A alelopatia ou atividade aleloquímica está dentre as atividades mais relatadas por *P. crassipes*. Efeitos alelopáticos foram observados nos extratos preparados com acetona, acetato de etila, clorofórmio, éter etílico, etanol e metanol sobre as algas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus obliquus* (JIN et al., 2003), *Chlorella vulgaris* (SHANAB et al., 2010) e *Microcystis aeruginosa* (EL-SHEEKH; HAROON; SABAE, 2017; WU et al., 2012). Wu et al. (2012) constataram que o efeito alelopático de *P. crassipes* sobre *M. aeruginosa* atingiu uma taxa de inibição de até 97,3% em relação à densidade de algas testada ($DO_{650} = 0,05$) (WU et al., 2012).

A fitotoxicidade do extrato aquoso das folhas de *P. crassipes* foi confirmada contra *Mimosa pigra* e *Vigna radiata* pela inibição da germinação de ambas as espécies, bem como o crescimento de suas raízes. Chai e colaboradores (2013) relatam que a germinação total de *M. pigra* diminuiu de 80% para 61% com o aumento das concentrações do extrato. Quando tratadas com 5% de extrato, o comprimento das raízes de mudas não pré-germinadas de *M. pigra* e *V. radiata* foi reduzido em 63% e 89%, respectivamente. Segundo os pesquisadores, essa redução pode ser explicada em função do aumento da atividade da peroxidase ligada à parede celular e pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos das raízes das plantas (CHAI; NGOI; WONG, 2013).

Tabela 2– Bioatividade de extratos de *Pontederia crassipes*

Parte da planta	Extrato (solvente)	Atividade biológica	Referência
raízes	acetona, acetato de etila	alelopatia/antialga (<i>Chlorella</i> sp., <i>Scendesmus obliquus</i>)	(Jin et al., 2003)
brotos	etanol, metanol, acetona, clorofórmio	alelopatia/antialga (<i>Microcystis aeruginosa</i>)	(El-Sheekh; Haroon; Sabae, 2017)
raízes	metanol	alelopatia/antialga (<i>Microcystis aeruginosa</i>)	(Wu et al., 2012)
planta inteira	metanol	alelopatia/antialga (<i>Chlorella vulgaris</i>), antifúngica (<i>Candida albicans</i>), antibacteriana (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	(Shanab et al., 2010)
folhas	água	alelopatia/herbicida (<i>Mimosa pigra</i> , <i>Vigna radiata</i>)	(Chai; Ngoi; Wong, 2013)
folhas	metanol	antiestafilococo (<i>Staphylococcus aureus</i>)	(Gutiérrez-Morales et al., 2017)
planta inteira	etanol, água, metanol	antibacteriana (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	(Saturno et al., 2019)
folhas	acetona	antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>), antifúngica (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton megnini</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)
folhas	etanol	antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>), antifúngica (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton megnini</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)
folhas	água	antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i>), antifúngica (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton megnini</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)
folhas	<i>n</i> -butanol	antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>), antifúngica (<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton megnini</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)
folhas	metanol	antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogene</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)

Parte da planta	Extrato (solvente)	Atividade biológica	Referência
planta inteira	<i>n</i> -hexano	antibacteriana (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), antifúngica (<i>Candida albicans</i>)	(Hussain et al., 2015)
folhas	acetato de etila	antibacteriana (<i>Streptococcus pyogenes</i>), antifúngica (<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Trichophyton megnini</i>)	(Kayathri; Kanimozhi; Panneerselvam, 2015)
folhas	água	antifúngica (<i>Alternaria solani</i>)	(Mahantesh et al., 2017)
folhas	acetona, etanol, metanol, butanol, água	antifúngica (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium solani</i>), antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	(Haggag; Abou El Ella; Abouziena, 2017)
folhas	água	antifúngica (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>)	(Hegde et al., 2017)
folhas, raízes	água, etanol, metanol	antimicrobiana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Brenneria nitrogriffneus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> 1020, <i>Bacillus cereus</i> 1080, <i>Erwinia carotovora</i> NCPPB 312, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Aspergillus Níger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium italicum</i>)	(Fareed; Haroon; Rabeh, 2008)
folhas, raízes	metanol:água:ácido acético	antioxidante	(Rui et al., 2015)
planta inteira	etanol	antioxidante	(Mohamed; Mansour; Salem, 2019)
folhas, brotos	etanol	antioxidante	(Lalitha; Jayanthi, 2012)
folhas	acetato de etila e diclorometano	antioxidante	(Cornelius et al., 2016)
folhas, pecíolos, raízes	metanol	antioxidante	(Tyagi and Agarwal, 2017a)
folhas	água	antioxidante, antimicrobiana (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i>), citotóxica (lungcancer NCI-H322) e hepatoprotetora	(Kumar et al., 2014)
folhas	água	antiparasitária (<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i>)	(Elagib, 2020)
partes aéreas	metanol, <i>n</i> -hexano	inseticida (<i>Spodoptera litura</i>)	(Lenora; Senthilkumar, 2017)

Parte da planta	Extrato (solvente)	Atividade biológica	Referência
raízes	água	larvicida (<i>Chironomus ramosus</i> Chaudhuri)	(Thorat; Nath, 2010)
folhas, raízes	Etanol, éter de petróleo	larvicida (<i>Culex pipiens</i>)	(Hasaballah, 2015)
folhas, brotos	acetona, acetato de etila, éter de petróleo, água, etanol, metanol	larvicida, pupicida (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	(Jayanthi; Lalitha; Aarthi, 2012)
planta inteira	metanol	atividade de reepitelização e cicatrização de feridas	(Ganesh; Sharma, 2018)

Além da atividade fitotóxica, o extrato aquoso das folhas exibe outras atividades como antioxidante, hepatoprotetora, citotóxica e antimicrobiana. A atividade antioxidante foi registrada pelo potencial de eliminação do radical DPPH (11% - 96%) e capacidade quelante de íons metálicos (42% - 93%). Além disso, o extrato forneceu proteção de 13% a 65% contra a peroxidação lipídica no homogenato de tecido de rato (fígado, rim e cérebro), exibiu 43% de citotoxicidade contra a linhagem celular de câncer de pulmão (NCI-H322) e demonstrou atividade antibacteriana considerável contra *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* e *Bordetella bronchiseptica* (KUMAR et al., 2014).

Extratos etanólico, metanólico e aquoso das folhas e raízes de *P. crassipes* mostraram atividade antimicrobiana contra diferentes fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Brenneria nitrogriffineus*, *Bacillus subtilis* 1020, *Bacillus cereus* 1080, *Erwinia carotovora* NCPPB 312, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*. O extrato aquoso mostrou a maior eficácia contra todos os microrganismos testados (FAREED; HAROON; RABEH, 2008; SHANAB et al., 2010). Atividades antibacteriana e antifúngica também foram exercidas pelo extrato *n*-butanólico contra *Streptococcus pyogenes* (KAYATHRI; KANIMOZHI; PANNEERSELVAM, 2015), *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* (HAGGAG; ABOU EL ELLA; ABOUZIENA, 2017).

A maioria dos estudos de extratos relatados na literatura que apresentam bioatividade é proveniente das folhas de *P. crassipes*. Vários pesquisadores mostraram que extratos das folhas em diferentes solventes orgânicos são altamente eficientes contra um amplo espectro de micro-organismos, incluindo parasitas. Elagib (2020) mostrou a alta atividade do extrato aquoso das folhas contra os parasitas *Plasmodium falciparum* CI_{50} ($49.92 \pm 1.029 \text{ g.mL}^{-1}$), *Trypanosoma brucei* CL_{100} ($209.63 \pm 2.231 \text{ g.mL}^{-1}$) e *Leishmania donovani* ($102.45 \pm 3.019 \text{ g.mL}^{-1}$). A atividade antiparasitária do extrato foi atribuída ao seu alto teor de esteroides, alcaloides, flavonoides, taninos e proteínas. Os esteroides podem penetrar e interagir com as membranas celulares dos parasitas, interferindo na biossíntese de sua membrana plasmática, levando-os à morte (ELAGIB, 2020).

Extratos aquosos, acetato de etila, acetona e éter de petróleo das folhas e brotos de *P. crassipes* apresentaram atividades larvicida e pupicida contra diferentes instares e pupas de *Culex quinquefasciatus*. A eficácia dos extratos foi constatada após 24 horas de tratamento com a mortalidade das larvas, conforme as doses aplicadas. Uma maior atividade larvicida e

pupicida contra *C. quinquefasciatus* foi detectada na fração etanólica com CL₅₀ 71,43, 94,68, 120,42, 152,15 e 173,35 ppm para estágios I, II, III, IV, respectivamente (JAYANTHI; LALITHA; AARTHI, 2012). Atividade larvicida também foi registrada no extrato aquoso das raízes de *P. crassipes* sobre ovos e larvas de *Chironomus ramosus*. Para concentrações de 2%, a mortalidade de 100% das larvas foi alcançada em 15 dias após o tratamento (THORAT; NATH, 2010). Segundo Jayanthi e colaboradores (2012), as atividades larvicida e pupicida dos extratos vegetais podem ser atribuídas à presença de metabólitos como flavonoides, alcaloides, antraquinonas e antocianinas.

Extratos de *P. crassipes*, em sua maioria, apresentam potentes atividades antioxidantes, principalmente frente a ensaios de eliminação de radicais livres DPPH (LALITHA; JAYANTHI, 2012; MOHAMED; MANSOUR; SALEM, 2019; RUI et al., 2015). Lalitha e Jayanthi (2012) mostraram que o extrato etanólico (29 µg.mL⁻¹) das folhas e brotos de *P. crassipes* apresenta uma atividade comparável à atividade de 400 µg.mL⁻¹ do antioxidante padrão ácido ascórbico, confirmando o potencial dessa espécie como fonte de antioxidantes naturais. Extratos alcoólicos (metanol) também são responsáveis por outras atividades como cicatrização e reepitelização de feridas (GANESH; SHARMA, 2018) e citotóxica contra linhagens celulares MCF-7, HeLa, Hep-G2 e EACC (ABOUL-ENEIN et al., 2014).

Diante desses estudos, podemos constatar a relevante contribuição de *P. crassipes* para a ciência, como uma fonte natural rica em metabólitos secundários com propriedades terapêuticas, atribuídas principalmente à presença de substâncias bioativas de diferentes classes (PRABAKARAN; MANI, 2017).

1.2 Fitorremediação de metais

Além da potencialidade de *P. crassipes* como fonte de produtos naturais, vários estudos demonstram a elevada capacidade desta espécie em acumular íons metálicos da água, incluindo As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb e Zn, bem como a eficiência na remoção de materiais orgânicos de águas residuais, efluentes domésticos e contaminantes orgânicos emergentes pelo processo de fitorremediação (RAI; SINGH, 2016; MELIGNANI; FAGGI; DE CABO, 2019).

A fitorremediação envolve o uso de plantas para descontaminação do solo, da água e do ar, e ocorre por meio de sequestro ou estabilização de contaminantes orgânicos e

inorgânicos incluindo os metais. É uma tecnologia alternativa ecológica com inúmeras vantagens em relação a abordagens físico-químicas. A abordagem físico-química requer a escavação do solo e processos químicos para imobilizar os metais, causando efeitos negativos que afetam as propriedades do solo e a biodiversidade, além do elevado custo. Já abordagens biológicas, como a fitorremediação, promovem a desintoxicação do solo através da inativação na rizosfera ou translocando-os para as partes aéreas (SEKOMO et al., 2012; THAKUR et al., 2016).

A fitorremediação é subdividida em diferentes categorias, incluindo fitoextração, fitodegradação, fitoestabilização, fitovolatilização e rizofiltração. As diferenças entre elas são dependentes dos mecanismos que envolvem a remediação. Na fitoextração, a absorção de íons do solo ou água ocorre por translocação direta para a biomassa da planta. Assim, os metais são extraídos por remoção subsequente das plantas. Na fitodegradação, as plantas potencializam as atividades microbianas na degradação de contaminantes orgânicos na rizosfera, contidos no solo e na água. A fitoestabilização promove a precipitação do contaminante dentro das raízes e na zona da raiz implícita no solo e na água, assim os íons metálicos ficam menos disponíveis. Na fitovolatilização, as plantas absorvem íons e hidrocarbonetos voláteis do solo e os emitem no ar de forma volátil através da transpiração. Na rizofiltração, os íons metálicos são retirados e removidos da água contaminada por raízes de plantas presentes na superfície da água (ANTONIADIS et al., 2017; PRAJAPATI, MERAVI, SINGH, 2012; THAKUR et al., 2016).

Várias espécies de plantas já foram identificadas e testadas para absorção e acúmulo de diferentes metais. No entanto, a capacidade de acumular contaminantes metálicos pode variar significativamente entre as espécies, uma vez que os mecanismos de captação de íons são inerentes de cada espécie baseados em suas características anatômicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas (LONE et al., 2008).

As plantas hiperacumuladoras têm ganhado destaque em fitorremediação por acumular elevadas concentrações de íons metálicos. O fenômeno de hiperacumulação tem evoluído ao longo dos anos entre diferentes espécies de plantas, e recebido um interesse considerável pela elevada eficiência no processo de remoção, particularmente de metais como Cd, Ni e Zn (VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009; YANG et al., 2004). De acordo com a literatura, mais de 450 espécies de plantas foram identificadas como hiperacumuladoras de metais (Zn, Ni, Mn, Cu, Co e Cd), metalóides (As) e não metálicos (Se), onde a maioria são hiperacumuladoras de Ni e Zn (CLEMENS, 2017; VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009; YANG et al., 2004).

As macrófitas hiperacumuladoras são plantas herbáceas ou lenhosas que podem tolerar e acumular altas concentrações de metais sem apresentar sintomas adversos visíveis. As plantas consideradas hiperacumuladoras possuem a capacidade de acumular de 0,1 a 1,0% da concentração de metais presente no meio, determinada no tecido vegetal seco (ROMERO-HERNÁNDEZ et al., 2017). O processo de retenção ocorre normalmente pelas raízes e folhas submersas (THOMAZ; CUNHA, 2010). Estudos revelam que *P. crassipes* não é considerada uma macrófita hiperacumuladora. No entanto, a mesma possui uma alta capacidade de acúmulo de nutrientes e metais em comparação a outras espécies (RAI; SINGH, 2016; ROMERO-HERNÁNDEZ et al., 2017).

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 macrófitas aquáticas *Typha latifolia*, *Lemna minor*, *Pontederia crassipes* e *Myriophyllum aquaticum* e obtiveram resultados promissores. A porcentagem de remoção, após cinco dias de exposição, para *P. 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 (ROMERO-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Outras pesquisas com macrófitas dos gêneros *Pontederia*, *Thypha* e *Myriophyllum* relataram o acúmulo de Cu e Zn nas raízes, e a translocação de Pb para as folhas (FAWZY et al., 2012). Estes estudos corroboram com resultados obtidos por Sricoth et al. (2018), através da avaliação do potencial de fitoremediação de Cd e Zn de várias espécies de plantas como *Thalia geniculata*, *Cyperus alternifolius*, *Canna indica*, *Pontederia crassipes* e *Pistia stratiotes* e uma espécie de grama *Vetiveria zizanioides*. As espécies *P. crassipes*, *P. stratiotes* e *V. zizanioides* diminuíram sua atividade de crescimento. No entanto, acumularam grandes quantidades de metais em seus tecidos, principalmente nas raízes. *P. crassipes* e *P. stratiotes* apresentaram fatores de bioconcentração > 1000 e fatores de translocação < 1 , caracterizando a ocorrência de alta fitoestabilização de Cd (SRICOTH et al., 2018).

Li et al. (2016) mostraram a ordem de remoção por *P. crassipes* para $\text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cu} > \text{Zn}$ em soluções aquosas. Os resultados também revelaram que a capacidade máxima de remoção de Zn, Cu e Cd foi alcançada em pH 5, e que a remoção do metal da solução envolve duas etapas, a adsorção e absorção. Neste estudo, a remoção dos metais ocorreu principalmente pelas raízes, através do processo de adsorção. As porcentagens de adsorção de Pb, Zn, Cu e Cd foram 75%, 43%, 29% e 61% na superfície das raízes, respectivamente. A eficiência na remoção de Cd e Cr por *P. crassipes* de águas contaminadas também foi relatada por Narain et al. (2011). Em seu estudo, a eficiência de remoção foi de 80,26% para Cr e 71,28%, para Cd, atingindo taxas médias de remoção diária de Cr ($0,10 \text{ } \mu\text{g/dia}$) e Cd ($0,12 \text{ } \mu\text{g/dia}$).

Pontederia crassipes tem se mostrado uma espécie com alto potencial no processo de fitorremediação de metais. A eficiência na remoção e tolerância a metais não essenciais e tóxicos como Cd^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} em meios contaminados a torna uma espécie promissora, porém, carente de estudos voltados para os aspectos fitoquímicos envolvidos nesse processo.

Poucos estudos relatam sobre a interação de metabólitos de *P. crassipes* com os metais. Em 2018, Zhang e colaboradores mostraram que a proteína WHLPH, isolada da folha de *P. crassipes*, possui capacidade quelante de metal de até 68,54%. Tan et al. (2007) mostraram também que as folhas de *P. crassipes* contêm altos níveis de melatonina e N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (48), que atuam como antioxidantes para proteger as células dos danos oxidativos, são potentes necrófagos de radicais livres e podem ajudar as plantas a lidar com agressões ambientais, incluindo poluentes do solo e da água. Logo, os altos teores de melatonina e AFMK em *P. crassipes* podem justificar a tolerância desta espécie aos poluentes ambientais mais facilmente, incluindo produtos químicos tóxicos e metais pesados (TAN et al., 2007).

Com base nestes estudos descritos na literatura sobre *P. crassipes* destacando sua potencialidade como fonte de produtos naturais e fitorremediação de metais, foram desenvolvidos estudos focados nesta espécie visando entender sua composição química e interações químicas planta-metal, por meio da avaliação da influência de Cd^{2+} no seu metabolismo secundário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da possível influência de cádmio no metabolismo secundário da espécie vegetal aquática *Pontederia crassipes*, contribuindo para uma melhor compreensão da interação química entre os metais e esta espécie vegetal.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos orgânicos de *P. crassipes* em larga escala;
- Submeter os extratos obtidos a processos de fracionamento e isolamento das substâncias por técnicas cromatográficas adequadas;
- Elucidar ou determinar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas de RMN uni e bidimensionais, EM, UV, IV e DC;
- Realizar ensaios biológicos das substâncias isoladas de *P. crassipes* para a avaliação da atividade antileishmania, atividade tripanocida e citotoxicidade;
- Realizar o cultivo da espécie *P. crassipes* em escala reduzida, na presença e ausência de cádmio para obtenção dos extratos orgânicos brutos;
- Determinar a concentração de cádmio incorporado por *P. crassipes* utilizando Espectrometria de Absorção Atômica (AAS);
- Realizar a triagem química dos extratos brutos obtidos por CCD, CLAE-DAD, CLAE-EM e RMN de ^1H ;
- Realizar análise quimiométrica dos extratos cultivados na presença e ausência de cádmio.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Descrição de Equipamentos e Materiais

Foram utilizados solventes graus PA e CLAE, como acetona, butanol, clorofórmio, acetonitrila, etanol e metanol, das marcas, Merck[®], Neon[®], Synth[®] e J.T. Baker[®]. A água destilada e deionizada foi obtida em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm a 25° C). Estes solventes foram usados nos processos de extração, fracionamento, obtenção do perfil químico dos extratos e isolamento dos compostos por Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os solventes deuterados (CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆ e D₂O) utilizados nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram das marcas Sigma-Aldrich[®] e CIL[®].

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 bombas 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).

A digestão ácida do material vegetal de *P. crassipes* foi realizada em um sistema digestor por micro-ondas de vaso fechado (MW) (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com um rotor de 48 vasos (PFA) de reação (volume interno de 50 mL, volume mínimo de ocupação de 6 mL, operados a temperatura máxima de 200 °C e pressão de 20 bar) e um vaso de referência com imersão do sensor de pressão/temperatura, empregado para comparação da eficiência da digestão.

3.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e em Coluna (CC)

Para a Cromatografia em Camada Delgada foram utilizadas cromatoplacas de sílica gel (Whatman[®] 20 x 20 cm x 0,2 mm) e as revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (254 e 365 nm) e vapores de iodo.

Para os fracionamentos cromatográficos em coluna aberta foi utilizada coluna de vidro com o diâmetro interno de 4,0 cm e fase estacionária Sephadex[™] LH-20 (100 g).

3.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo JASCO® com controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055, detectores de arranjo de diodos MD-2018 plus e de dicróismo circular CD-2095. Para a análise e o isolamento das substâncias foram utilizadas as seguintes colunas: coluna Zorbax RX C-18 ODS (Agilent®, 4,6 x 250 mm, 5 µm) no modo analítico; coluna Zorbax RX C-18 ODS (Agilent®, 9,6 x 250 mm, 5 µm) no modo semi-preparativo.

As amostras analisadas por CLAE-DAD foram previamente solubilizadas em metanol 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 µm, Exacta).

3.1.3. Espectrômetros

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 600 HD (14,1 T), utilizando as sondas BBFO-Z plus Smart Probe Broad band Observe e Triple Inverse TCI Cryo-probehead, ambas de 5 mm.

Os espectros de massas foram obtidos em dois espectrômetros de alta resolução das marcas Bruker Maxis Impact™ e Waters® Xevo G2-XS QToF (UPLC-QToF), ambos operando no modo positivo e negativo com fonte de ionização por electrospray (ESI). O Sistema UPLC-QTOF Waters® é composto por: a) sistema UPLC Acquity H-Class, com os seguintes módulos: Bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager), Detector de Arranjo de Diodos (PDA e λ Detector), forno de coluna e injetor automático (Sample Manager – FTN) e b) Espectrômetro de Massas Xevo G2-XS QToF com fonte de ionização eletrospray (ESI), analisador QToF (Quadrupole-Time-of-Flight). A faixa de aquisição foi de m/z 100-1500. Para controle, aquisição e processamento de dados foram utilizados os softwares Data Analysis Schorcut 4.2 (Bruker Baltonik®) e Waters Mass Lynx 4.1.

Os espectros de Dicroísmo Circular Eletrônico (DCE) foram obtidos em espectropolarímetro JASCO (J 815) em λ 190 a 500 nm, utilizando uma cubeta de 0,1 mm.

Os espectros de UV foram registrados em um espectrômetro JASCO (J 815) ou pelo Detector de Arranjo de Diodos durante análise por CLAE-DAD.

Para a determinação de Cd^{2+} em *P. crassipes* foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama de fonte contínua de alta resolução ContrAA 300 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com uma lâmpada de arco curto xenônio (XBO 301, 300 W,

GLE, Berlim, Alemanha) operando no modo hot-spot como fonte de radiação contínua. Mistura de Ar-acetileno de alta pureza (99,7%, Air Liquid, São Paulo, Brasil) foi utilizada como gases combustíveis e oxidantes.

3.2 Coleta da espécie vegetal *Pontederia crassipes*

As macrófitas *Pontederia crassipes* foram coletadas no Clube Náutico em Araraquara-SP (Rodovia Antônio Machado de Sant'anna, Km 63) em maio de 2018. As plantas coletadas foram lavadas em água corrente, transportadas até o laboratório, e em seguida armazenadas em caixas de conservação. A identificação desta 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.(= *Pontederia crassipes*). O código de cadastro no Sisgen é A4394A7.

3.3 Obtenção dos extratos de *Pontederia crassipes*

A parte aérea (folhas e pecíolos) e raízes de *P. crassipes* foram individualmente secadas em estufa a 30 °C, trituradas em moinho de facas e, posteriormente, submetidas a extrações com solventes orgânicos de diferentes polaridades (acetona, butanol, etanol e metanol).

Inicialmente foi realizada uma extração orgânica em escala reduzida, onde o material vegetal foi extraído três vezes com os solventes de polaridades diferentes (4 g de material vegetal em 80 mL de solvente), uma extração a cada três dias, em temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada. Após o processo de extração, o solvente foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo para a obtenção do extrato vegetal.

Os solventes recolhidos foram reutilizados nas extrações, e em seguida foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as normas gerais de gerenciamento de resíduos químicos do IQ/Unesp.

3.4 Triagem química dos extratos vegetais

Os extratos acetônico, butanólico, etanólico e metanólico foram analisados por CCD, CLAE-DAD e RMN de ¹H. Para as análises por CLAE-DAD em gradiente exploratório, as amostras foram previamente solubilizadas em MeOH (100%) e submetidas a um *clean up*

utilizando cartuchos de sílica C18 acoplado em microfiltro de PVDF (0,22 μm). Após este procedimento, as amostras (10 mg.mL^{-1}) foram armazenadas em frascos para injeção.

O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica C18 ODS (Zorbax RX-C18, $4,6 \times 250$ mm, 5 μm , Agilent®), com injeção de 40,0 μL e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (0,1% HOAc) 70:30 a 0:100 v/v por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo de 1,0 mL.min^{-1} e λ inicial de 200 nm até 510 nm.

Para os experimentos de RMN de ^1H , as amostras (5 mg.mL^{-1}) foram solubilizadas em solventes deuterados CDCl_3 (com pureza $\geq 99,8\%$ para D) e DMSO-d_6 (D, 99,9%).

3.5 Obtenção e fracionamento dos extratos etanólicos de *Pontederia crassipes*

Após a triagem química dos extratos brutos preparados em escala reduzida, optou-se por preparar o extrato etanólico em escala ampliada (Figuras 3 e 4).

O extrato da parte aérea foi submetido à partição líquido/líquido com hexanos obtendo-se o extrato hexânico e hidroalcoólico. O extrato hidroalcoólico solubilizado em MeOH foi centrifugado, e a fração solúvel submetida ao fracionamento por CC resultando em 61 frações (10 mL cada fração), as quais foram analisadas por CCD e reduzidas a 17 frações pela junção de acordo com o perfil químico (Figura 3).

Para o fracionamento do extrato hidroalcoólico das raízes foi aplicada a mesma metodologia usada para o extrato hidroalcoólico da parte aérea. O fracionamento resultou em 111 frações (10 mL cada fração), as quais foram analisadas por CCD e reduzidas a 18 frações pela junção de acordo perfil químico (Figura 4).

As frações de ambos os fracionamentos foram submetidas à análise por RMN de ^1H , CCD e CLAE-DAD para obtenção do perfil químico. As análises por CLAE-DAD foram realizadas em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (0,015% TFA) 95:05 a 0:100 v/v por 20 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo de 1,0 mL.min^{-1} e λ inicial de 200 até 510 nm.

Figura 3– Obtenção e fracionamento do extrato etanólico da parte aérea de *P. crassipes*

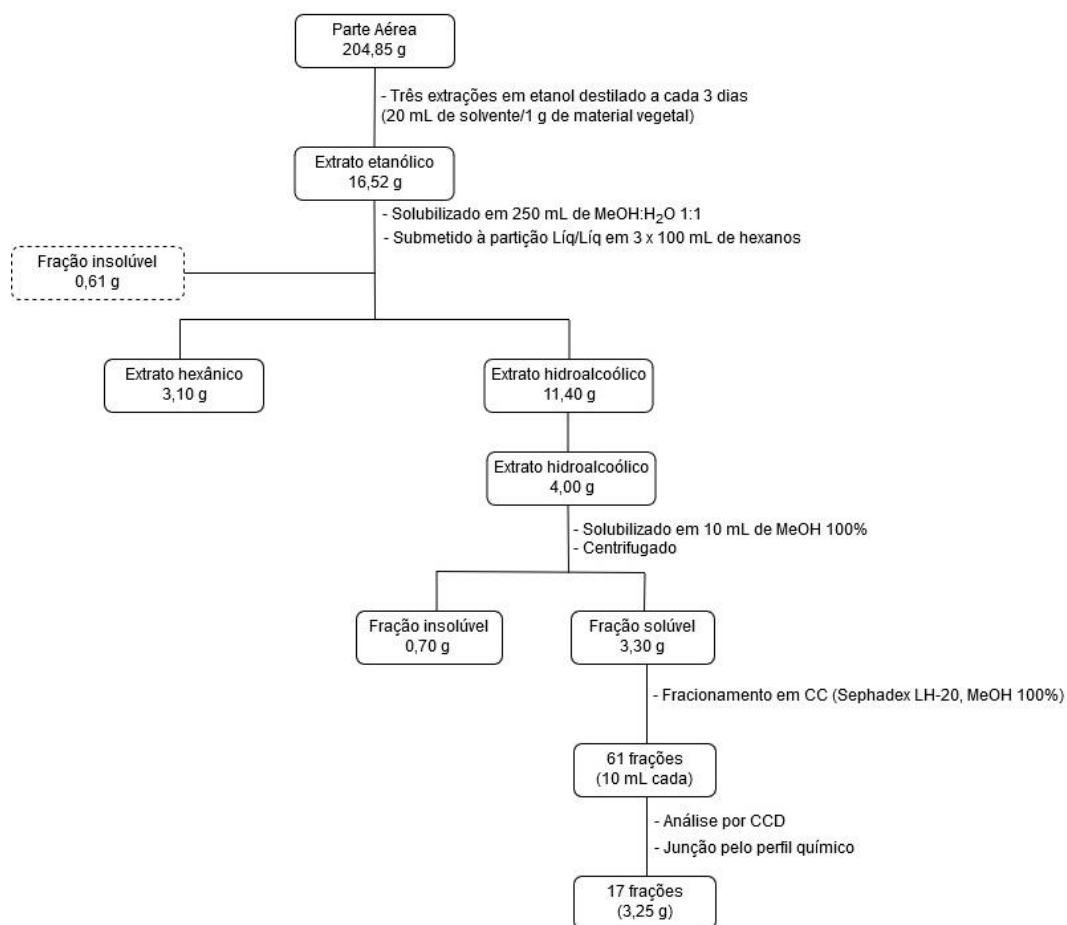
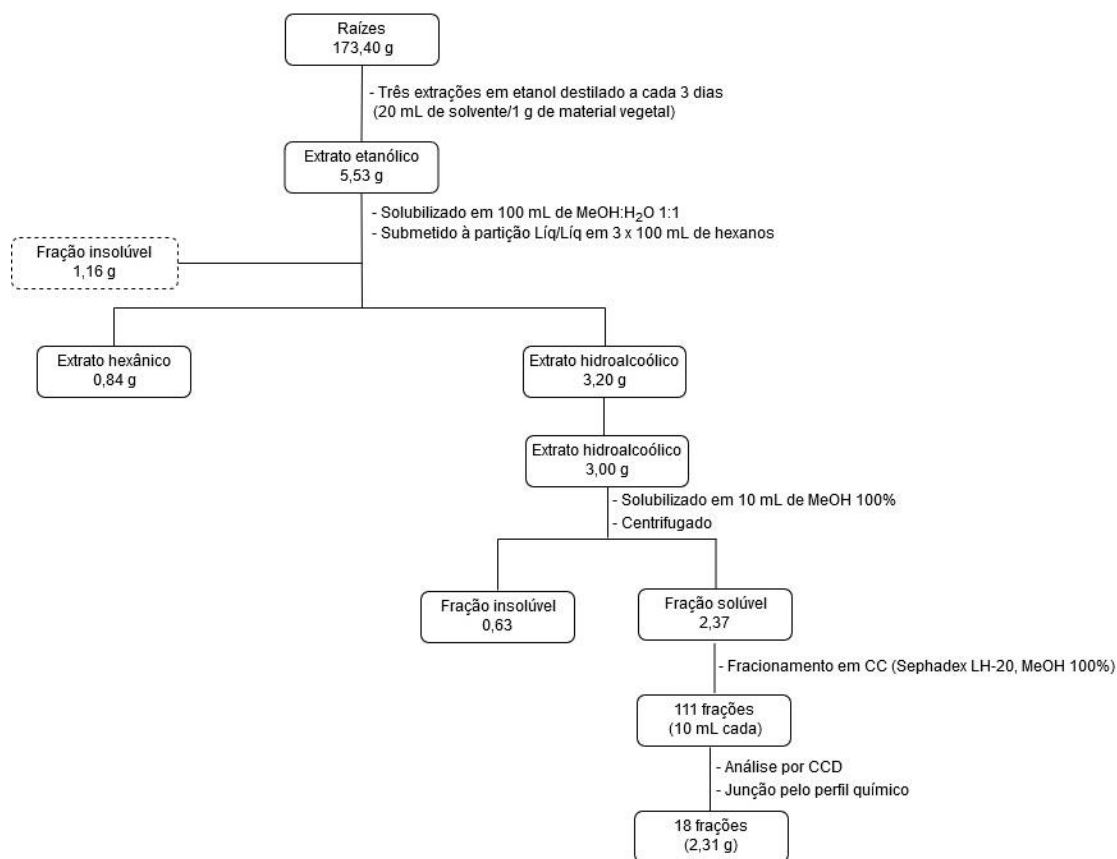


Figura 4— Obtenção e fracionamento do extrato etanólico das raízes de *P. crassipes*

3.6 Isolamento dos metabólitos secundários

O isolamento dos metabólitos secundários da parte aérea e das raízes de *P. crassipes* foi conduzido de acordo com as condições apresentadas nos fluxogramas a seguir (Figuras 5 e 6). A seleção inicial das frações submetidas ao isolamento foi realizada de acordo com o perfil químico obtido por RMN de ¹H e CLAE-DAD.

As substâncias isoladas (**I** - **XVII**) foram analisadas por RMN de ¹H e de ¹³C uni- e bidimensionais para a identificação estrutural.

Figura 5 – Isolamento dos metabólitos secundários da parte aérea de *P. crassipes*

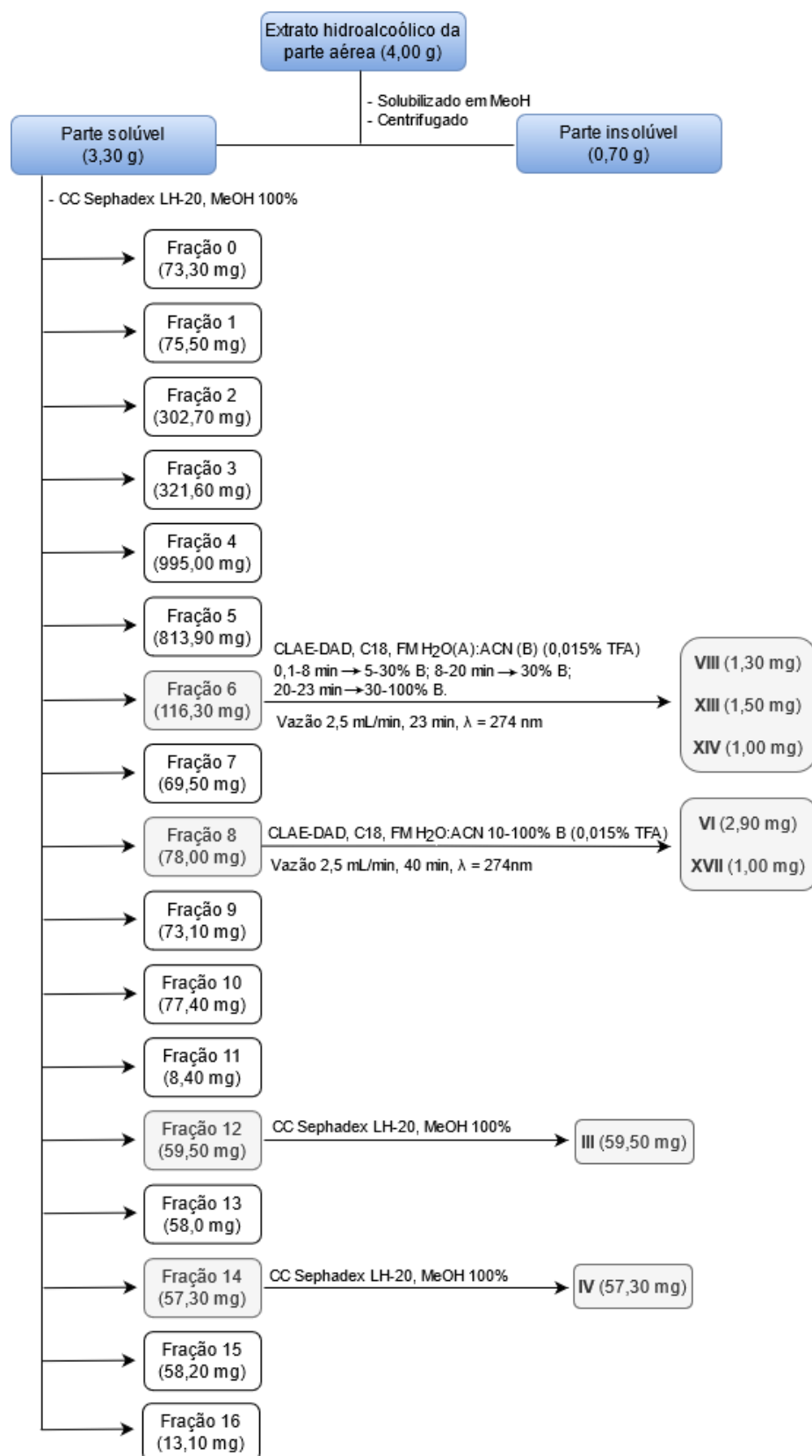
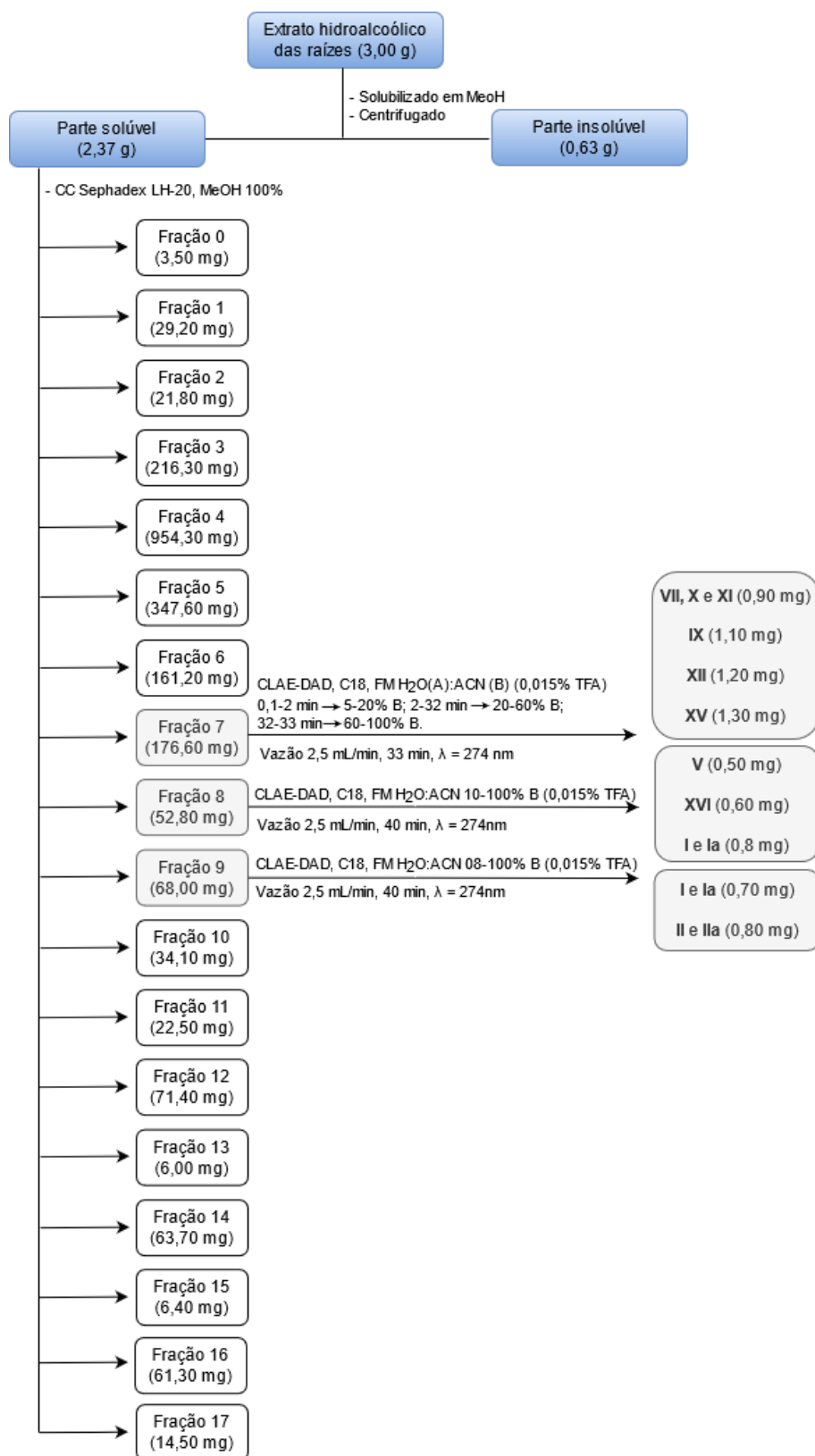


Figura 6– Isolamento dos metabólitos secundários das raízes de *P. crassipes*



3.7 Ensaios biológicos

Com o intuito de avaliar a bioatividade das substâncias isoladas de *P. crassipes*, foram realizados ensaios biológicos para a avaliação da atividade antileishmania, atividade tripanocida e citotoxicidade, na Universidade Federal do ABC em parceria com o Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago.

3.7.1. Atividade antileishmania

A atividade antileishmania foi determinada através de ensaios realizados com parasitas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD). Os parasitas foram cultivados em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina, a 24 °C, sem a adição de antibióticos. As substâncias submetidas ao ensaio foram dissolvidas em etanol, diluídas em meio de cultura e incubadas com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de determinar a concentração efetiva 50% (CE₅₀).

Para os ensaios *in vitro* com amastigotas de *Leishmania* foram retirados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e adicionados a 8×10^4 células em placas LabTek (NUNC) de 16 poços, permanecendo em estufa a 37 °C por 24 horas. Amastigotas de *Leishmania* extraídas de baço e separadas por centrifugação foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago) e incubadas com os compostos a 37 °C por um período de 120 horas. Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada através da contagem de 500 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados (BOU et al., 2014). O fármaco Glucantime foi usado como padrão.

3.7.2. Atividade tripanocida

Os ensaios *in vitro* foram realizados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) em células renais de macaco Rhesus (LLC-MK2-ATCC CCL 7) usando meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 2% de soro bovino a 37 °C em um Incubadora de 5% de CO₂ (TADA et al., 1986). As células conjuntivas murinas (NCTC clone 929, ATCC) e LLC-MK2 foram mantidas em RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram contadas em hemocitômetro Neubauer e depositadas em microplaca (96 poços; 1×10^6 células / poço). Posteriormente, os compostos **III**, **IV** e o benznidazol controle positivo foram adicionados às células em diferentes concentrações (200 - 1,56 μ M) e incubados por 24 h a 37 °C em 5% de CO₂. A atividade tripomastigota foi baseada na conversão do sal de tetrazólio solúvel brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) em formazana insolúvel por enzimas mitocondriais (BOU et al., 2014). A extração de formazana foi realizada por 18 h a 24 °C com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% v/v (100 mL / poço) (REA et al., 2013).

3.7.3. Avaliação da citotoxicidade

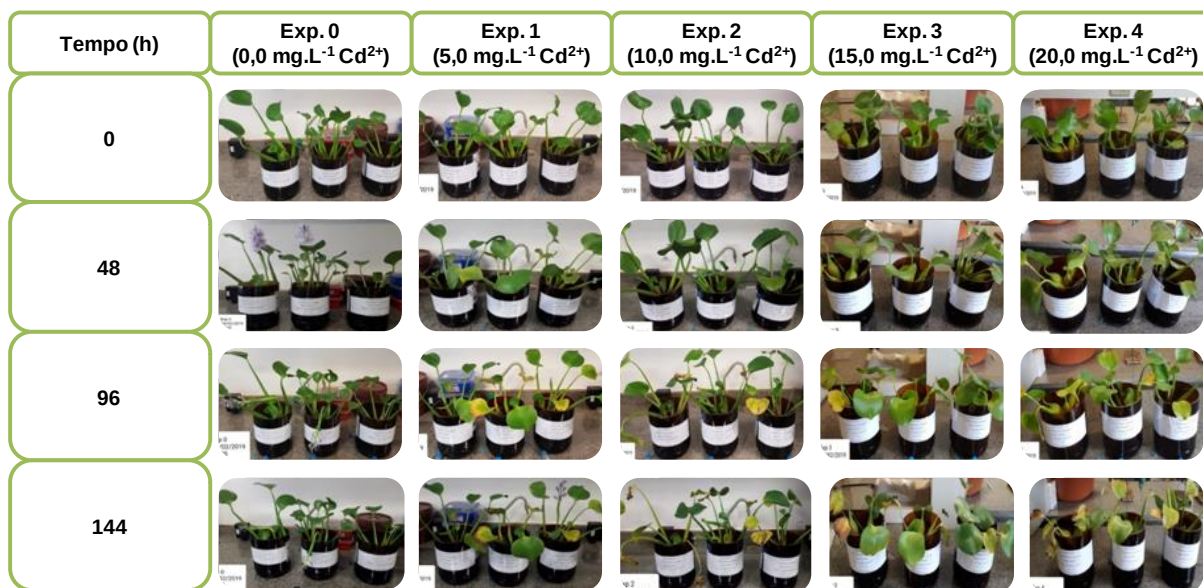
As concentrações citotóxicas *in vitro* de 50% (CC₅₀) foram determinadas usando células NCTC-clone L929, que foram semeadas a 6×10^4 / poço em microplacas de 96 poços e incubadas com os compostos **III**, **IV** e benznidazol (200 - 1,56 μ M) diluído em RPMI- 1640 por 48 h a 37° C em 5% de CO₂. A viabilidade das células foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT e a densidade óptica foi determinada no filtro máximo F5 (Molecular Devices) a 570 nm (BOU et al., 2014; REA et al., 2013). Os respectivos índices de seletividade (IS) foram determinados usando a seguinte equação: CC₅₀ contra células NCTC / CI₅₀ contra parasitas (TADA et al., 1986).

3.8 Cultivo de *Pontederia crassipes* na presença e ausência de cádmio (Cd²⁺)

As plantas coletadas foram transportadas até o laboratório e armazenadas em caixas de conservação. Após uma semana, as plantas foram recolhidas, lavadas em água corrente e cultivadas à temperatura e luz ambiente, em frascos âmbar (4 L) contendo solução de Cd(NO₃)₂.4H₂O nas concentrações de 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg de Cd²⁺ por litro de solução.

O experimento foi realizado em triplicatas (escala reduzida) com duração de seis dias (144 horas) e monitoramento diário (Figura 7). Durante o experimento foram coletadas alíquotas (15,0 mL) da água de cultivo de todos os frascos a cada 48 horas (tempo 0, 48, 96, 144 horas). Após o período de 144 horas, as plantas foram recolhidas, lavadas com água corrente, separadas em partes aéreas e raízes, secas em estufa a 30 °C por uma semana, pesadas, trituradas e, posteriormente, analisadas quanto à incorporação de cádmio.

Figura 7– Cultivo de *Pontederia crassipes* em diferentes concentrações de Cd^{2+}



3.9 Obtenção e triagem química dos extratos de *Pontederia crassipes* cultivadas na presença e ausência de Cd^{2+}

O material vegetal seco e moído das partes aéreas e raízes de *P. crassipes*, obtido de cada experimento (em triplicatas), foi submetido à extração orgânica com etanol (três extrações a cada três dias, 20 mL de solvente para 1 g de material vegetal) para obtenção dos extratos.

Os extratos brutos foram analisados por RMN de ^1H , CLAE-DAD para a avaliação do perfil químico e das possíveis alterações ocorridas no metabolismo secundário de *P. crassipes* cultivadas na presença Cd^{2+} .

Para as análises por CLAE-DAD, os extratos foram previamente solubilizados em MeOH e submetidos a um *clean up* conforme descrito no item 3.4. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em frascos para injeção na concentração de 10,0 mg.mL⁻¹.

O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica C18 ODS (Zorbax RX-C18, 4,6 × 250 mm, 5 μm, Agilent®), com injeção de 40,0 μL e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (0,015% TFA) 95:05 a 0:100 v/v por 60 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e λ inicial de 200 até 510 nm.

Para os experimentos de RMN de ^1H , as amostras (5,0 mg.mL⁻¹) foram solubilizadas em CDCl_3 (com pureza ≥ 99,8% para D).

3.9.1. Análise quimiométrica dos extratos de *Pontederia crassipes*

Com o intuito de verificar sistematicamente a influência de cádmio no metabolismo secundário de *P. crassipes*, após a triagem química por RMN de ^1H e CLAE-DAD, os extratos foram submetidos à análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Com isso, obteve-se um conjunto de dados (cromatogramas/espectros) a partir de 30 amostras dos extratos das partes aéreas e raízes de *P. crassipes*, cultivadas em triplicatas, na presença e ausência de cádmio. Em virtude da alta complexidade da matriz biológica estudada e do grande volume de dados obtidos experimentalmente, fez-se uso da ferramenta de pré-processamento dos dados analíticos MZMine 2, e técnicas quimiométricas de projeção de variáveis como a PCA (Análise de Componentes Principais) e regressão por PLS (Mínimos Quadrados Parciais) incluindo PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais).

Para as análises por CLUE-EM os extratos foram previamente solubilizados em MeOH e submetidos a um *clean up* conforme descrito no item 3.4. Posteriormente, as amostras (extratos) foram armazenadas em frascos para injeção na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para a detecção de possíveis interferentes, o branco da análise foi registrado com MeOH 100%.

Para a aquisição dos dados CL-EM das amostras, foi utilizado um sistema UPLC-QTOF Waters® Xevo G2-XS, coluna analítica (Acquity UPLC® HSS T3 $1.8 \mu\text{m}$), com injeção de $1,0 \mu\text{L}$ e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (90:10, 0,1% de ácido fórmico) por 12 min, λ 220 - 800 nm. A ionização das amostras foi por eletrospray (ESI) no modo positivo e negativo. Os parâmetros experimentais foram: voltagem do cone 30.000 V, temperatura de dessolvatação 650°C , fluxo do gás de dessolvatação 800 L/h e energia de colisão 6 eV. A faixa de aquisição foi de m/z 100-1500.

O tratamento dos dados para análise quimiométrica foi realizado em parceria com a Dra. Denise Medeiros Selegato da Fundación MEDINA, Granada – Espanha.

3.9.1.1 Processamento dos dados experimentais

Para as análises estatísticas, foram utilizados Cromatogramas de Íons Totais (TIC) das partes aéreas e raízes de *P. crassipes* cultivadas na presença e ausência (controle) de Cd^{2+} . A matriz final representou a intensidade de cada TIC. A matriz final foi automaticamente

convertida para arquivos ASCII e importada para o software MATLAB (Mathworks, Natick, MA). O pré-processamento de dados incluiu a remoção das bordas, correção de linha de base por Filtro Whittaker Automático (assimetria de 0,001 e λ 100), alinhamento variável por alinhamento de pico (deslocamento máximo de 10 e função de alinhamento linear de 1ª ordem), normalização da área total, armazenamento da região selecionada (25 caixas), transformação G-log (λ de 10^{-1}) e escalonamento automático.

O escalonamento automático foi feito pelos valores médios do centro dividido pelo desvio padrão de cada variável e foi realizado para garantir que todos os picos tenham o mesmo peso, ou seja, a mesma importância na análise. O pré-processamento foi otimizado com base em tentativa e erro de diferentes parâmetros e funções.

Após o pré-processamento, os compostos ionizáveis foram identificados e contabilizados anotando uma lista de pico de referência durante cada execução experimental. Para contabilizar o ruído do instrumento, foram excluídos os sinais que tinham uma relação sinal-ruído abaixo de cinco e reteve apenas os que ocorriam em um mínimo de 70% das repetições.

A Análise de Dados Multivariada (MDVA) foi realizada por métodos não supervisionados e supervisionados, e todas as análises foram calculadas usando o PLS Toolbox no ambiente MATLAB (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada como uma técnica exploratória para avaliar as relações entre as variáveis e visualizar a tendência dos dados de forma imparcial. O PCA foi realizado usando o algoritmo de decomposição de valor singular (SVD) aplicado a um intervalo de confiança de 95%.

Os métodos supervisionados incluíram a regressão parcial por mínimos quadrados (PLSr) e a análise discriminante PLS (PLS-DA). Para as análises PLS, a validação cruzada (CV) foi usada para determinar o número ideal de componentes principais (PCs) necessários para construir o modelo.

O número de PCs escolhido para o modelo baseou-se na comparação entre a distribuição de PCs e leva em consideração as tendências mais baixas do erro médio quadrático médio da calibração (RMSEC) e os valores do erro médio quadrático médio da validação cruzada (RMSECV). A capacidade de testar se o modelo poderia prever os rótulos de classe (também conhecido como precisão de predição) foi feita pela avaliação da soma dos quadrados capturados pelo modelo (R^2) e a validação cruzada (R^2 -CV ou Q^2). Um teste de permutação também foi aplicado para ambos os métodos supervisionados com 1000 interações para identificar o sobreajuste do modelo. Isso é feito verificando se o seu modelo é

significativamente diferente dos modelos nulos criados ao embaralhar aleatoriamente o rótulo da classe (vetor Y). Uma avaliação foi conduzida pelos valores de p empíricos, bem como o gráfico de Soma quadrada Y (SSQY) versus correlação do bloco Y e uma tabela de "Probabilidade de insignificância do modelo". Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

A Importância da Variável na Projeção (VIP) foi usada para estimar a importância de cada variável tanto no PLSr quanto no PLS-DA. Esse sistema de pontuação representa a soma ponderada das correlações quadradas entre os componentes e as variáveis originais, em que o peso corresponde ao percentual da variância explicada. Variáveis com pontuações VIP superiores a 1 podem ser consideradas importantes para o modelo, onde, por outro lado, as variáveis com pontuações VIP inferiores a 1 têm uma influência baixa.

Por fim, o desempenho dos modelos foi avaliado pela característica operacional do receptor (Curva OCR) e a área sob a curva (AUC). Para isso, a especificidade (taxa verdadeira negativa), sensibilidade (taxa verdadeira positiva) e o valor limite ideal foram comparados junto com as matrizes de confusão para cada grupo para visualizar o desempenho do modelo.

3.10 Determinação de Cd por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS)

A determinação de Cd presente na água e nos tecidos vegetais de *P. crassipes* foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS), empregando um espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte contínua de alta resolução (HR-CS FAAS). Mistura de Ar-acetileno (C_2H_2) (40 L/h) de alta pureza (99,7%, Air Liquid, São Paulo, Brasil) foi utilizada como gás combustível, com taxa de aspiração fixada em 5,0 mL.min⁻¹. A linha espectral selecionada para a determinação de Cd foi de 228,801 nm.

Para determinação de Cd presente na água, as alíquotas (15,0 mL) coletadas durante o experimento foram conservadas sob refrigeração com 10% de HNO_3 (v/v) em tubos Falcon e, posteriormente, analisadas por HR-CS FAAS.

Para a análise de Cd presente nos tecidos vegetais, as amostras (partes aéreas e raízes) secas e moídas, individualmente, foram previamente digeridas em HNO_3 (1,5 mL), H_2O_2 (1,5 mL) e H_2O (3,0 mL) em um sistema digestor por micro-ondas de frasco fechado (MW) (aquecimento de 25 a 200 °C em 15 min., permanência em 200 °C por 10 min. e 30 min. de resfriamento). Posteriormente, as amostras digeridas foram transferidas para tubos Falcon, diluídas em água deionizada a um volume final de 15 mL e analisadas por HR-CS FAAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e triagem química dos extratos

Os extratos de diferentes polaridades obtidos de *P. crassipes* (Tabela 3) foram testados quanto a solubilidade e analisados por RMN de ^1H , CLAE-DAD e CCD.

Tabela 3– Extratos obtidos de *Pontederia crassipes*

Material vegetal seco (g)	Extrato	Massa extrato (mg)	Rendimento (%)
Parte aérea (4,0)	acetônico	60,0	1,50
	butanólico	70,1	1,75
	etanólico	322,4	8,06
	metanólico	302,4	7,55
Raízes (4,0)	acetônico	31,1	0,77
	butanólico	32,3	0,80
	etanólico	127,6	3,19
	metanólico	110,2	2,75

A Tabela 3 mostra o rendimento dos extratos vegetais obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Os extratos etanólicos e metanólicos de ambas as partes (parte aérea e raízes) apresentaram os melhores rendimentos. Já as extrações realizadas com butanol e acetona obtiveram rendimentos menores, sugerindo neste caso, uma similaridade em massa no poder de extração desses solventes.

Após análise por CLAE-DAD e RMN de ^1H de todos os extratos, optou-se por estudar os extratos etanólicos, detalhadamente, considerando o perfil químico, maior rendimento de extração e menor periculosidade como solvente extrator.

Na análise e comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos etanólicos obtidos em escala ampliada (Figuras 8 e 9) observa-se uma maior predominância de sinais na região dos hidrogênios aromáticos no extrato da parte aérea, inferindo uma maior concentração de substâncias aromáticas presentes nesse extrato. Já no espectro do extrato das raízes, a maior predominância dos sinais é na região dos hidrogênios metílicos, metilênicos e carbinólicos. Estes resultados conduziram ao fracionamento de ambos os extratos por Sephadex LH-20, resultando na obtenção das frações do extrato hidroalcoólico (seção 3.5, Figuras 3 e 4).

Figura 8– Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico da parte aérea de *P. crassipes* ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T)

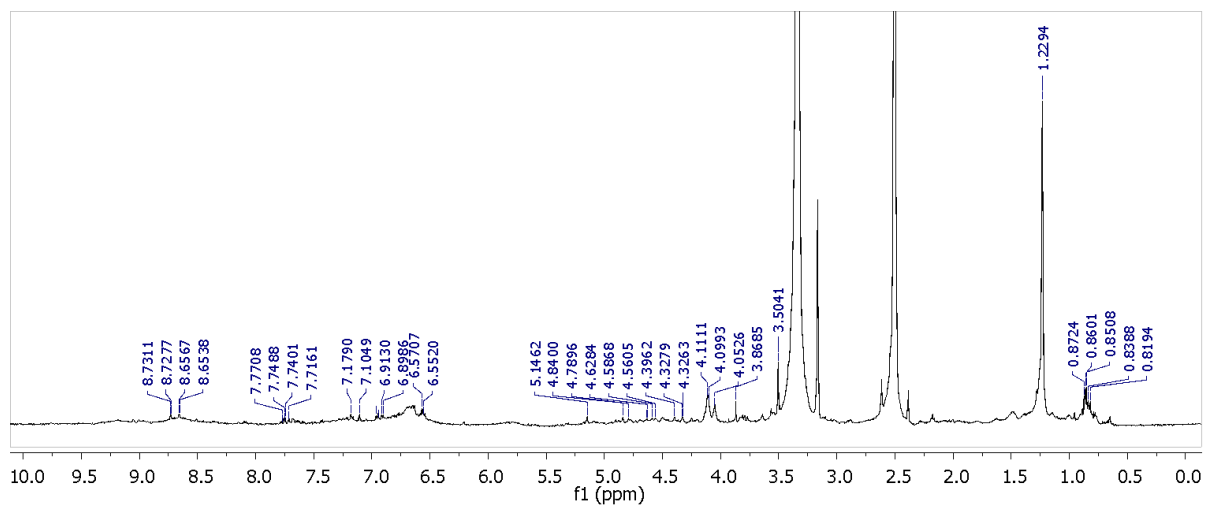
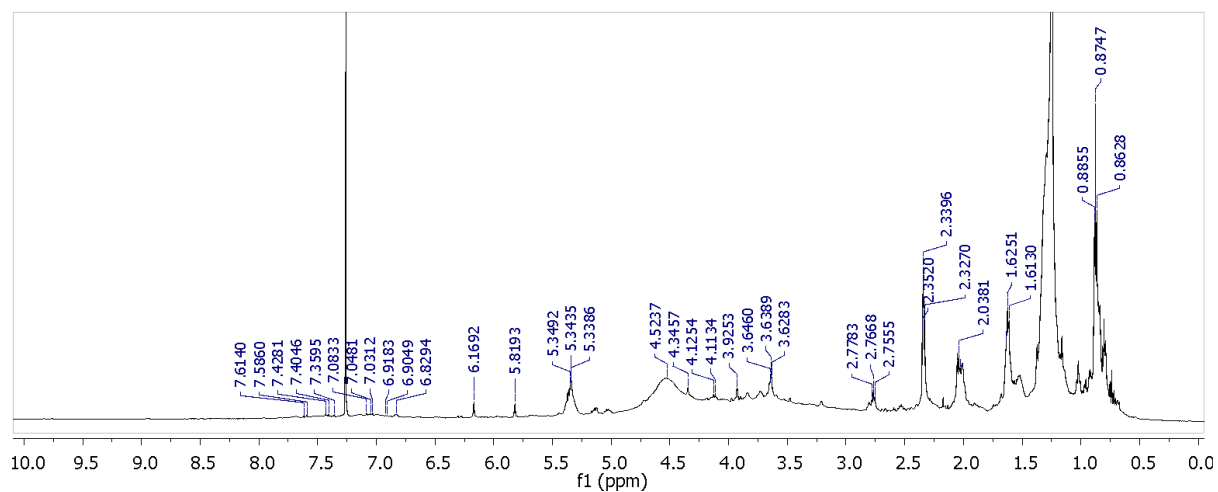


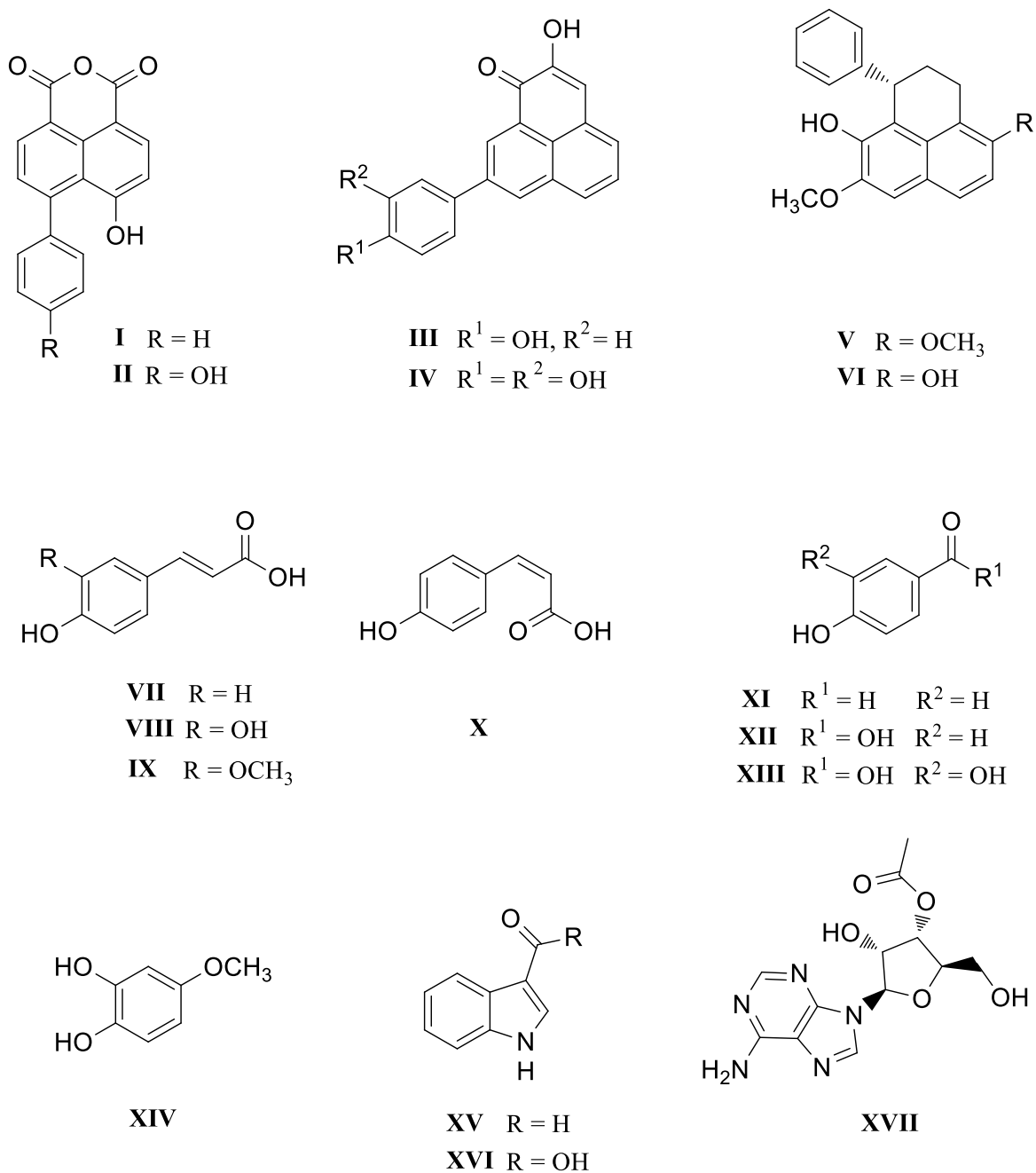
Figura 9– Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico das raízes de *P. crassipes* (CDCl_3 , 14,1 T)



4.2 Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de *Pontederia crassipes*

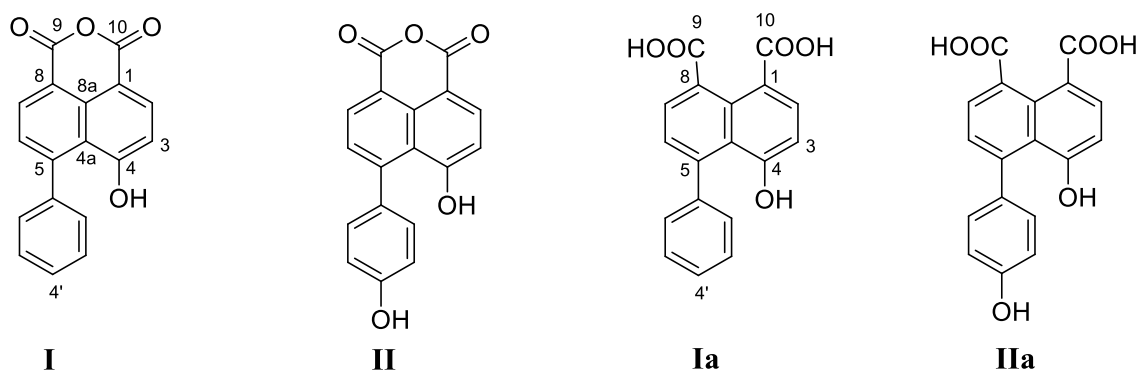
Na Figura 10 estão ilustradas as estruturas químicas das substâncias isoladas dos extratos etanólicos das partes aéreas e raízes de *P. crassipes*.

Figura 10– Estruturas químicas das substâncias isoladas e identificadas de *P. crassipes*



Fonte: Mayra F. Costa

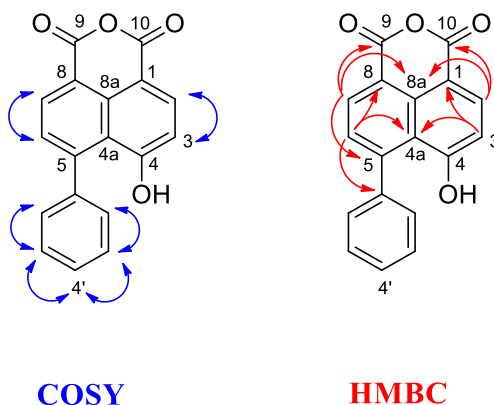
4.2.1. Anidridos fenilnaftálicos derivados (I, Ia, II e IIa)



As estruturas dos compostos **I**, **Ia**, **II** e **IIa** foram elucidadas com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , COSY, HSQC, HMBC, DEPTQ e espectrométricos EM ESI-Qq-TOF.

O composto **I** apresentou fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_4$ m/z 289,0502 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{O}_4$, 289,0501), estabelecida por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (Apêndice 1). O espectro de RMN de ^1H mostrou quatro dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos em δ 8,68 ($J = 8,5$ Hz, H-7), δ 8,49 ($J = 8,3$ Hz, H-2), δ 7,58 ($J = 8,5$ Hz, H-6) e δ 7,13 ($J = 8,3$ Hz, H-3), e um multipletto em δ 7,41-7,46 integrando pra cinco hidrogênios, indicando a presença de um fenil monossustituído (Apêndice 2, Tabela 4). As correlações ^1H - ^1H observadas no mapa de contornos COSY entre H-6 e H-7, H-2 e H-3, H-2'/6' e H-3'/5' permitiram confirmar a presença dos três sistemas de spins (Apêndice 3, Figura 11).

Análise das correlações 1J ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) por HSQC e 3J ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) por HMBC juntamente com os dados de DEPTQ (Apêndice 4-6) permitiram a atribuição dos carbonos e a conexão dos sistemas de spins da estrutura. As correlações de HMBC de H-7 com δ 163,3 (C-9), δ 133,2 (C-8a) e δ 150,3 (C-5), de H-2 com δ 162,4 (C-10) e δ 133,2 (C-8a), de H-6 com δ 115,0 (C-8), δ 122,7 (C-4a) e δ 141,3 (C-1'), e de H-3 com δ 108,3 (C-1) e δ 122,7 (C-4a) confirmaram a posição dos grupos acíclicos do anidrido e do substituinte 5-fenil (Apêndice 5, Figura 11). Assim, a estrutura de **I**, descrita pela primeira vez na literatura, foi elucidada como anidrido 4-hidroxi-5-fenil-1,8-naftálico.

Figura 11– Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de **I****Tabela 4**– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **I**, **II**, **Ia** e **IIa** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

Posição	I		II		Ia		IIa
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}
1		108,3	-	*		105,0	-
2	8,49 (<i>d</i> , 8,3)	136,2	8,37 (<i>d</i> , 8,5)	136,6	8,43 (<i>d</i> , 8,4)	136,6	8,26 (<i>d</i> , 8,5)
3	7,13 (<i>d</i> , 8,3)	110,0	6,91 (<i>d</i> , 8,5)	111,5	7,00 (<i>d</i> , 8,4)	111,1	6,68 (<i>d</i> , 8,5)
4	-	*	-	*	-	161,6	-
4a	-	122,7	-	123,8	-	123,7	-
5	-	150,3	-	150,6	-	150,1	-
6	7,58 (<i>d</i> , 8,5)	129,6	7,46 (<i>d</i> , 8,5)	128,8	7,49 (<i>d</i> , 8,5)	128,7	7,31 (<i>d</i> , 8,3)
7	8,68 (<i>d</i> , 8,5)	129,6	8,62(<i>d</i> , 8,5)	130,2	8,67 (<i>d</i> , 8,5)	130,1	8,60 (<i>d</i> , 8,3)
8	-	115,0	-	114,5	-	114,6	-
8a	-	133,2	-	134,7	-	134,0	-
9	-	163,3	-	*	-	167,4	-
10	-	162,4	-	162,0	-	167,1	-
1'	-	141,3	-	132,1	-	141,4	-
2'/6'	7,41 – 7,46 (<i>m</i>)	127,7	7,27 (<i>d</i> , 8,5)	129,9	7,42 – 7,46 (<i>m</i>)	127,7	7,23 (<i>d</i> , 8,6)
3'/5'	7,41 – 7,46 (<i>m</i>)	127,7	6,87 (<i>d</i> , 8,5)	114,6	7,42 – 7,46 (<i>m</i>)	127,7	6,84 (<i>d</i> , 8,5)
4'	7,41 – 7,46 (<i>m</i>)	127,7	-	157,3	-	127,3	-

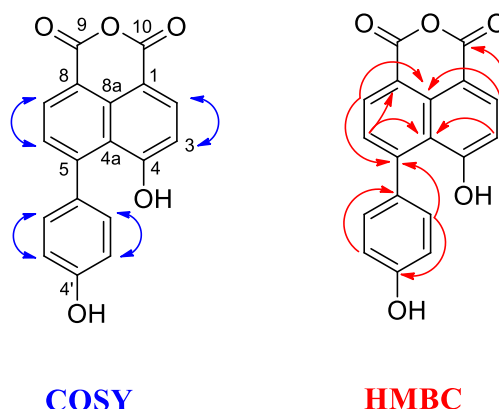
^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC. *sinal não observado.

O perfil espectral de RMN de ^1H do composto **II** foi semelhante ao de **I**, com exceção apenas para a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos do substituinte na posição 5. Dois dupletos em δ 7,27 (*d*, J = 8,5 Hz, H-2'/6') e δ 6,87 (*d*, J = 8,5 Hz, H-3'/5') sugeriram a presença de um grupo hidroxílico em C-4' (Apêndice 9, Figura 12).

A estrutura de **II** foi confirmada pelos dados de m/z 305,0466 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{O}_5$ 305,0450) obtido por EM ESI-Qq-TOF (Apêndice 8), e pelas correlações observadas

nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 10-12). Os dados de HMBC permitiram estabelecer as correlações 3J ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) de H-2 com δ 162,0 (C-10) e δ 134,7 (C-8a), de H-7 com δ 134,7 (C-8a) e δ 150,6 (C-5), de H-6 com δ 114,5 (C-8) e δ 123,8 (C-4a), de H-3 com δ 123,8 (C-4a), de H-2'/6' com δ 150,6 (C-5) e δ 157,3 (C-4'), e de H-3'/5' com δ 132,1 (C-1') (Figura 12, Tabela 4). Assim, a estrutura do composto **II**, relatada pela primeira vez na literatura, foi elucidada como anidrido 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil)-1,8-naftálico.

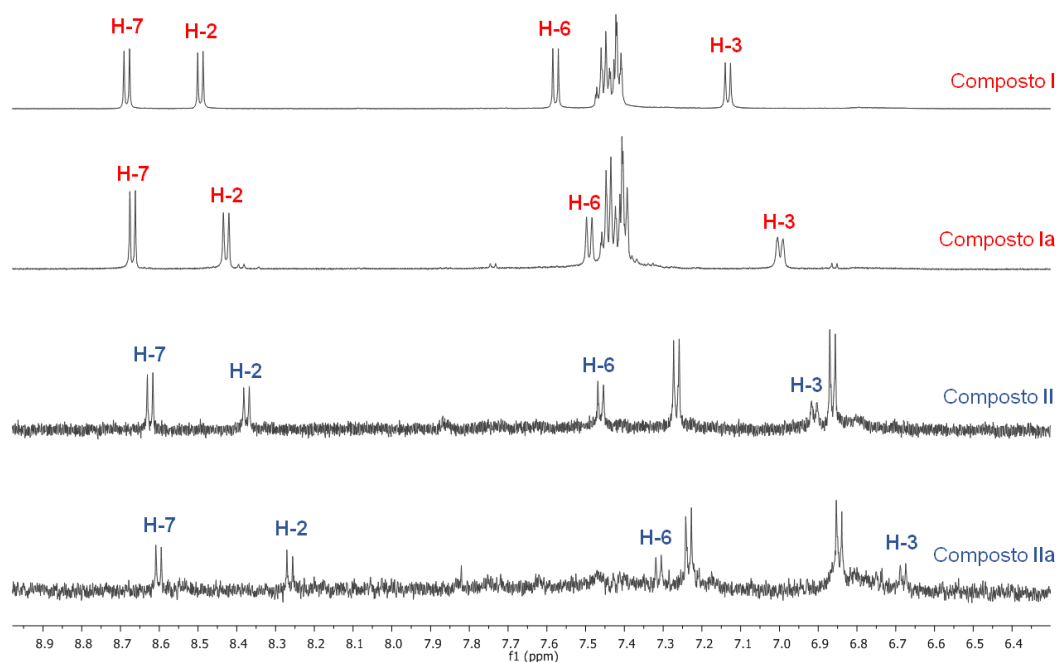
Figura 12– Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de **II**



Anidridos naftálicos foram relatados em espécies das famílias Haemodoraceae (CHEN; PAETZ; SCHNEIDER, 2019; NORMAN et al., 2019; OCAMPOS et al., 2017) e Musaceae (HIDALGO et al., 2016; JIANG et al., 2021; JITSANG; SCHNEIDER, 2010), e só recentemente relatados em aguapé (Pontederiaceae) (CHENG et al, 2021). Cheng e colaboradores (2021) descreveram três outros anidridos 2-fenil-1,8-naftálico diferentes em *P. crassipes*. A presença desses oxa-derivados de fenilfenalenonas em aguapé sugere que dioxigenases podem estar presentes na família Pontederiaceae, e que devem ser responsáveis pela conversão do esqueleto fenilfenalenona (C_{19}) em fenilbenzoisocromenonas (C_{18}O), como ocorre em *Xiphidium caeruleum* (Haemodoraceae) (CHEN; PAETZ; SCHNEIDER, 2019).

A adição de solventes próticos durante a caracterização química dos anidridos promoveu a hidrólise de **I** e **II**, produzindo os novos ácidos fenilnaftálicos **Ia** e **Ila**, respectivamente. As diferenças nos espectros de RMN de ^1H de **I** e **Ia**, e **II** e **Ila** foram evidentes (Figura 13, Tabela 4).

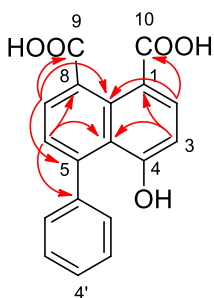
Figura 13– Espectros expandidos de RMN de ^1H dos compostos **I**, **II**, **Ia** e **IIa** (CD_3OD , 14,1 T)



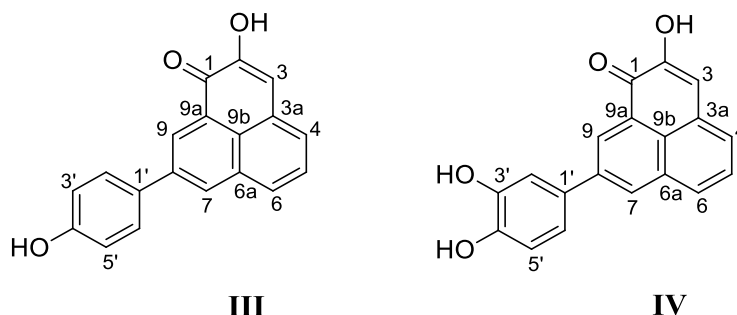
A comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos anidridos **I** e **II** com os dos ácidos fenilnaftálicos **Ia** e **IIa** mostrou uma diferença de deslocamento ($\Delta\delta_{\text{H}}$) na faixa de 0,01-0,032 ppm em direção à região de blindagem do espectro. As mudanças químicas observadas para H-3 e H-6 de **Ia** e **IIa** foram consistentes com as observadas na literatura para outros ácidos fenilnaftálicos semelhantes (KAMO et al., 1998).

Os dados de RMN de ^{13}C de C-9 (δ 167,4) e C-10 (δ 167,1) de **Ia**, bem como os outros carbonos, foram atribuídos com base nas interações observadas nos espectros de HSQC e HMBC (Apêndices 16 e 17, Figura 14, Tabela 4), confirmando a identificação de **Ia** e **IIa** como ácido 4-hidroxi-5-fenilnaftaleno-1,8-dicarboxílico e ácido 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil)naftaleno-1,8-dicarboxílico, respectivamente.

Figura 14– Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC de **Ia**



4.2.2. Fenilfenalenonas **III** e **IV**



As substâncias **III** e **IV** foram obtidas como sólidos de coloração amarela e laranja, respectivamente, e pertencem à classe das fenilfenalenonas (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005).

A determinação estrutural das substâncias **III** e **IV** foi estabelecida com base nos espectros de RMN de ^1H , COSY, HSQC, HMBC e DEPTQ (Apêndices 20-24, 26-30, Tabela 5). Os espectros de UV obtidos por CLAE-DAD das substâncias **III** e **IV** apresentaram três bandas com valores de máximos de absorção em 275,5, 339,5 e 415,0 nm, e em 275,5, 342,8 e 423,2 nm, respectivamente (Apêndices 25 e 31).

O espectro de RMN de ^1H da substância **III** (Apêndice 20) exibiu sinais em δ 7,14 (s, H-3), δ 7,61 (*dd*, $J = 8,2$ e $6,5$ Hz, H-5), δ 7,71 (*d*, $J = 6,5$ Hz, H-4), δ 8,03 (*d*, $J = 8,2$ Hz, H-6), δ 8,51 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-7) e δ 8,87 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-9), evidenciando a presença de um sistema aromático altamente conjugado, atribuído ao núcleo fenalenona. Além desses sinais, o espectro mostrou um sistema de spin em δ 6,69 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5') e δ 7,69 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-2'/6'), inferindo a presença de um substituinte aromático dissustituído. A observação desses sinais juntamente com as correlações ^1H - ^1H observadas no espectro de COSY (Apêndice 21), 1J ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) observadas em HSQC e as múltiplas correlações 3J ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) observadas em HMBC permitiram a determinação do núcleo estrutural da substância **III**. Uma importante correlação observada a múltiplas ligações, 3J , é dos hidrogênios em δ 7,14 e δ 8,87 com o carbono em δ 180,8, inferindo a presença de uma carbonila de cetona. Além disso, foi observada uma correlação 2J do hidrogênio em δ 7,14 com um carbono em δ 150,6, confirmando a presença de uma hidroxila vizinha a carbonila.

A estrutura da substância **IV** foi determinada seguindo o mesmo padrão da substância **III**, onde é possível observar uma grande semelhança nos sistemas de spins. Ao analisarmos os espectros de RMN de ^1H das duas substâncias, observamos nitidamente no espectro de **III** a presença de um duplete em δ 6,69 ($J = 8,5$ Hz) referente aos hidrogênios das posições 3'/5',

enquanto no espectro de **IV** nota-se a ausência desse duplete na posição C-3', inferindo a substituição do hidrogênio em C-3' por outro grupo. Essa observação foi confirmada pela correlação 2J do hidrogênio em δ 7,28 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-2') com o carbono C-3' (δ 145,5), indicando a presença de uma hidroxila como substituinte (Apêndices 20 e 26). Essas informações, juntamente com dados da literatura (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005), permitiram a identificação das substâncias como 2-hidroxi-8-(4-hidroxifenil)-fenalen-1-ona (**III**) e 2-hidroxi-8-(3,4-diidroxifenil)-fenalen-1-ona (**IV**) (Tabela 5).

As fenilfenalenonas são de ocorrência natural, comumente encontradas nas espécies vegetais pertencentes às famílias Musaceae, Haemodoraceae, Strelitziaceae e Pontederiaceae (CHEN et al., 2019; CHENG et al., 2021; DELLA GRECA; PREVITERA; ZARRELLI, 2008; HOLSCHER; SCHNEIDER, 2000; HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005). Estas substâncias são de especial interesse por atuarem como agentes leishmanicidas, e por desempenharem um importante papel como fitoalexinas e fitoanticipinas no mecanismo de defesa das plantas (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005; NORMAN et al., 2019).

Tabela 5– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **III** e **IV** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

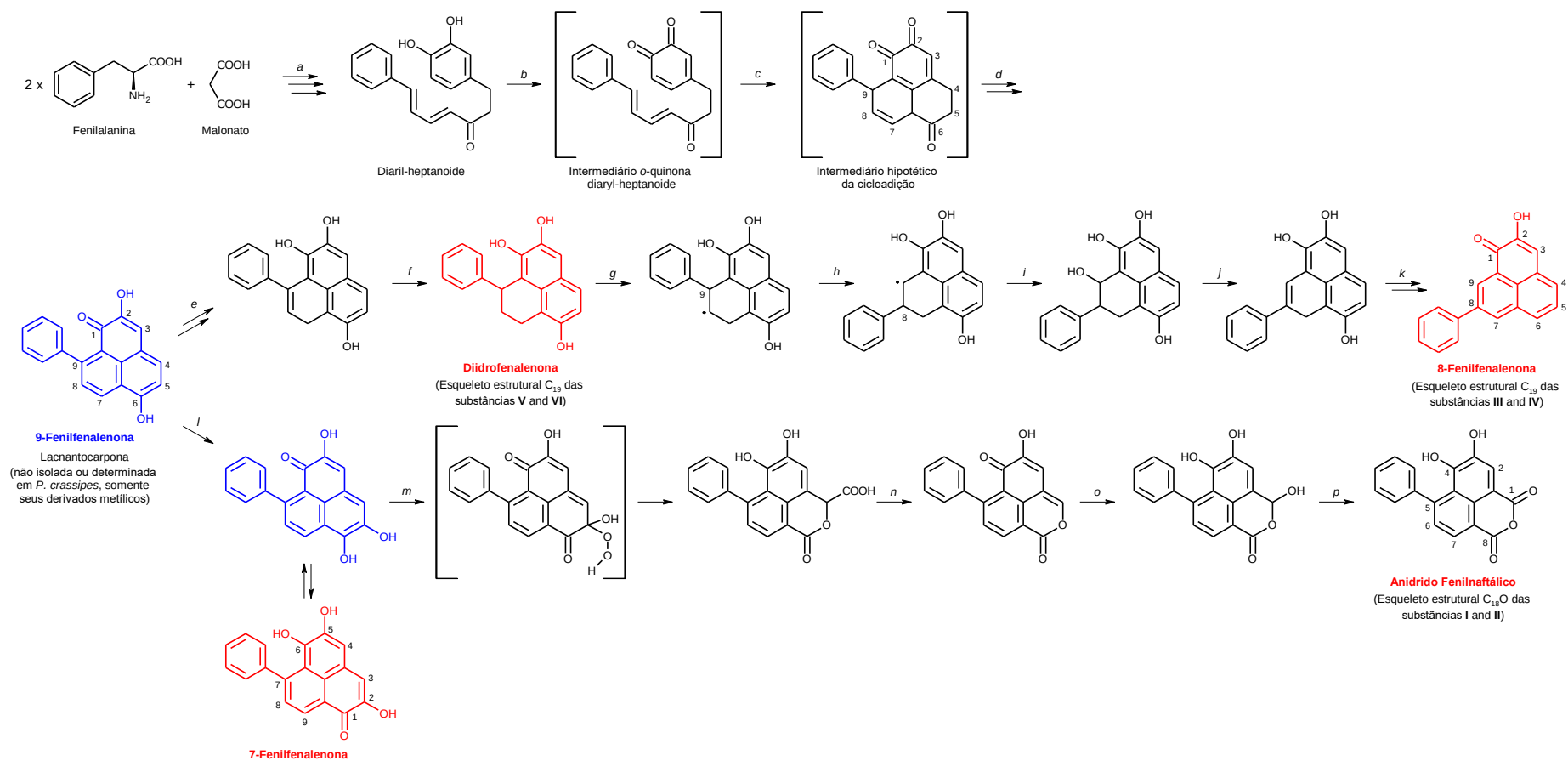
Posição	III		IV	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1	-	180,8	-	180,7
2	-	150,6	-	150,5
3	7,14 (<i>s</i>)	114,4	7,14 (<i>s</i>)	114,6
3a	-	128,9	-	128,8
4	7,71 (<i>d</i> , 6,5)	128,2	7,71 (<i>d</i> , 7,0)	129,3
5	7,61 (<i>dd</i> , 8,2; 6,5)	127,1	7,61 (<i>dd</i> , 8,2; 7,0)	127,3
6	8,03 (<i>d</i> , 8,2)	129,2	8,02 (<i>d</i> , 8,2)	129,3
6a	-	133,0	-	132,8
7	8,51 (<i>d</i> , 1,6)	132,3	8,48 (<i>d</i> , 1,8)	132,4
8	-	139,7	-	139,9
9	8,87 (<i>d</i> , 1,6)	128,5	8,84 (<i>d</i> , 1,8)	128,6
9a	-	132,9	-	132,1
9b	-	122,6	-	122,6
1'	-	130,4	-	131,1
2'	7,69 (<i>d</i> , 8,5)	128,2	7,28 (<i>d</i> , 2,2)	113,8
3'	6,96 (<i>d</i> , 8,5)	115,4	-	145,5
4'	-	157,9	-	145,6
5'	6,96 (<i>d</i> , 8,5)	115,4	6,94 (<i>d</i> , 8,2)	115,6
6'	7,69 (<i>d</i> , 8,5)	128,2	7,20 (<i>dd</i> , 8,2; 2,2)	118,6

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

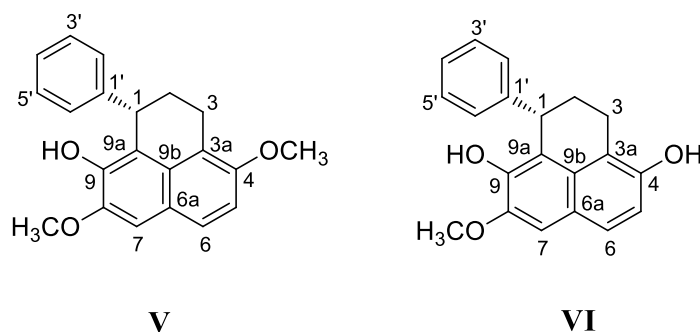
Os estudos biossintéticos de fenilfenalenonas, isoladas de espécies pertencentes às famílias Haemodoraceae e Musaceae, descrevem que fenilfenalenonas são derivadas de fenilpropanóides, em que o esqueleto polifenólico é formado pela condensação de dois fenilpropanóides e uma unidade de acetato ou malonato (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005; HÖLSCHER; SCHNEIDER, 1995a). O envolvimento de um diaril-heptanoide de cadeia aberta na biossíntese de fenilfenalenonas e o modo da cicloadição intramolecular 4 + 2 determinam a posição do grupo fenílico lateral no núcleo fenalenona (CHEN et al., 2019; HÖLSCHER; SCHNEIDER, 1995b; NORMAN et al., 2019). A posição da função cetona e do anel fenílico classifica as fenilfenalenonas nos subgrupos principais de 9- e 4-fenilfenalenonas e subgrupos menores de 7- e 6-fenilfenalenonas (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005).

As fenilfenalenonas isoladas de *P. crassipes* possui uma especificidade na posição ocupada pelo grupo fenílico. Enquanto as fenilfenalenonas isoladas de outras espécies vegetais possuem o grupo fenil na posição C-9, C-7, C-6 ou C-4, as fenilfenalenonas isoladas de *P. crassipes* o substituinte fenil ocupa também a posição C-8, considerada pouco comum. Biossinteticamente, essa especificidade pode ser explicada pelo rearranjo que provavelmente ocorre imediatamente após a ciclização, e não na etapa de formação dos diaril-heptanoídeos de cadeia aberta. O intermediário triceto é considerado um precursor de quase todas as fenilfenalenonas comuns e pode estar envolvido na formação das 8-fenilfenalenonas (HOLSCHER; SCHNEIDER, 2005) (Figura 15).

Figura 15– Via hipotética da biossíntese de derivados de fenilfenalenona em *Pontederia crassipes*. (a) Biossíntese de diaril-heptanoides através da via fenilpropanoide. (b) Oxidação. (c) Cicloadição intramolecular 4 + 2 (ciclicização de Diels-Alder) e redução. (d) Enolização e redução. (e) Enolização e redução. (f) Hidrogenação. (g) Oxidação para radical (abstração de hidrogênio em C-8). (h) migração 1,2-aril. (i) Hidroxilação em C-9. (j) Desidratação. (k) Enolização e redução. (l) Oxidação em C-5. (m) Oxidação catalisada por uma dioxigenase putativa. (n) Descarboxilação e desidrogenação. (o) Hidratação. (p) Desidrogenação



4.2.3. Fenilfenalenos V e VI



A elucidação estrutural da substância **V** foi estabelecida com base nos espectros de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 32-35).

O espectro de RMN de ^1H da substância **V** (Apêndice 32, Tabela 6) exibiu sinais em δ 7,13 (*d*, $J = 9,1$ Hz, H-5), δ 7,14 (*s*, H-7) e δ 7,60 (*d*, $J = 9,1$ Hz, H-6) atribuídos aos hidrogênios aromáticos do núcleo diidrofenaleno. Outros sinais, representando um único sistema de spins, foram observados em δ 6,88 (*dd*, $J = 7,1$ e $1,2$ Hz, H-2'/6'), δ 7,07 (*ddd*, $J = 7,6$, $7,1$ e $1,2$ Hz, H-4') e δ 7,13 (*dd*, $J = 7,6$ e $7,1$ Hz, H-3'/5'), referentes aos hidrogênios aromáticos do anel fenil monossustituído. Sinais de dois singletos intensos em δ 3,86 e 3,96 sugeriram a presença de duas metoxilas ligadas ao anel aromático, e os demais sinais localizados em δ 2,07 (*dddd*, $J = 13,1$, $13,1$, $4,5$ e $4,5$ Hz, H-2ax), δ 2,22 (*dddd*, $J = 13,1$, $4,5$, $2,3$ e $2,3$ Hz, H-2eq), δ 2,32 (*ddd*, $J = 17,2$, $12,6$ e $4,5$ Hz, H-3ax) e δ 3,04 (*m*, H-3eq) confirmaram a presença de dois grupos metilênicos vicinais, assim como do hidrogênio metínico em δ 4,77 (*m*, H-1). Os acoplamentos dos hidrogênios aromáticos, metínico e metilênicos foram confirmados pelas correlações observadas no mapa de contornos COSY (Apêndice 33, Figura 16).

A presença das metoxilas ligadas ao anel aromático em δ 3,86 na posição C-4 (δ 152,0) e em δ 3,96 na posição C-8 (δ 146,6) do núcleo fenaleno foi estabelecida a partir das correlações observadas no espectro de NOESY 1D e mapa de contornos HMBC (Apêndices 35 e 36, Figura 16).

A configuração absoluta de C-1 foi estabelecida com base no experimento de Dicroísmo Circular Eletrônico (DCE) (Apêndice 37) e por comparação com os dados da substância modelo descrita na literatura (HÖLSCHER et al., 2006). A curva de dicroísmo circular de **V** exhibe efeitos Cotton positivos em 221,6 e 247,0 nm, efeitos semelhantes aos observados para a substância (*S*)-monolaterol, e rotação específica $[\alpha]_D +26.6$ (*c* 0.03, MeOH), o que possibilita sugerir que o estereocentro em C-1 também apresenta configuração

^a Dados de ¹³C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.* sinal não observado

A determinação estrutural de **VI** foi estabelecida com base nos experimentos de RMN ^1H , COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 38-41) e por comparação com a literatura (DEL RÍO et al., 2006). A substância **VI** apresentou perfil espectroscópico semelhante ao da substância **I**. A principal diferença nos espectros de RMN de ^1H de **VI** e de **V** foi detectada na região entre δ 3,85-3,96, com a presença de somente um singlete em δ 3,95 (s) atribuído a uma metoxila ligada ao anel aromático. A atribuição dos demais sinais de hidrogênios e dos carbonos presentes na estrutura foi realizada com base nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Tabela 7).

Tabela 7– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **VI** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

VI			(1R)-2,3-diidro-4,9-diidroxi-8-metoxi-fenilfenaleno (CDCl_3, 11.75 T) (Del Río et al., 2006)	
Posição	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1	4,77 (<i>m</i>)	37,8	4,74 (<i>dd</i> , 4,0; 2,5)	37,84
2ax	2,07 (<i>dddd</i> , 13,4; 13,4; 4,5; 4,5)	28,9	2,12 (<i>dddd</i> , 13,0; 13,0; 4,0; 4,0)	28,95
2eq	2,22 (<i>dddd</i> , 13,4; 4,5; 2,4; 2,4)	28,9	2,23 (<i>dddd</i> , 13,0; 4,0; 2,5; 2,5)	28,95
3ax	2,32 (<i>ddd</i> , 15,6; 14,6; 4,0)	17,6	2,44 (<i>ddd</i> , 16,0; 13,0; 4,0)	17,99
3eq	2,98 (<i>m</i>)	17,6	2,84 (<i>ddd</i> , 16,0; 13,0; 4,0)	17,99
3a	-	115,8	-	116,08
4-OH	*	148,9	4,65 (<i>s</i>)	148,21
5	6,90 (<i>m</i>)	114,3	6,89 (<i>d</i> , 8,5)	114,91
6	7,45 (<i>d</i> , 8,6)	124,9	7,44 (<i>d</i> , 8,5)	125,68
6a	-	125,6	-	123,71
7	7,10 (<i>s</i>)	104,3	6,98 (<i>s</i>)	104,57
8	-	145,9	-	145,57
9-OH	*	142,4	5,80 (<i>s</i>)	142,24
9a	-	*	-	117,64
9b	-	127,3	-	125,37
1'	-	144,9	-	144,53
2'/6'	6,90 (<i>m</i>)	127,7	6,90 (<i>dd</i> , 7,0; 1,0)	127,88
3'/5'	7,14 (<i>t</i> , 7,4)	127,4	7,13 (<i>dd</i> , 7,0; 7,0)	128,11
4'	7,07 (<i>t</i> , 7,4)	125,2	7,08 (<i>ddd</i> , 7,0; 7,0; 1,0)	125,92
8-OCH₃	3,95 (<i>s</i>)	54,6	3,90 (<i>s</i>)	55,79

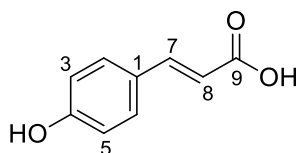
^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC. * sinal não observado

A posição da metoxila ligada ao carbono C-8 (δ 145,9) do núcleo diidrofenaleno foi estabelecida a partir da análise do mapa de contornos HMBC, e da correlação espacial da metoxila em δ 3,95 com o hidrogênio em δ 7,10 observada no espectro de NOESY 1D (Apêndice 42).

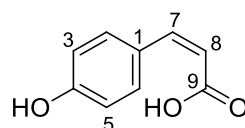
A configuração absoluta de C-1 foi estabelecida com base no experimento de Dicroísmo Circular Eletrônico (DCE) (Apêndice 43) e por comparação com os dados da substância modelo descrita na literatura (HÖLSCHER et al., 2006). A curva de dicroísmo circular da substância **VI** exibe efeitos Cotton positivos em 215,5 e 243,6 nm, efeitos semelhantes ao observados para a substância (S)-monolaterol, e rotação específica $[\alpha]_D +10$ (c 0.06, MeOH). Desta maneira, determinou-se **VI** como sendo (+)-(S)-2,3-diidro-4,9-diidroxi-8-metoxi-fenilfenaleno.

Fenilfenalenos são compostos encontrados comumente em espécies pertencentes às famílias Haemodoraceae, Musaceae e Pontederiaceae, como *Anigozanthos flavidus*, *Musa acuminata* e *P. crassipes*, respectivamente (DEL RÍO et al., 2006; DELLAGRECA; PREVITERA; ZARRELLI, 2008). Estruturalmente fenilfenalenos estão relacionados com as fenilfenalenonas. No entanto, até o momento, a rota biossintética desses compostos não foi estabelecida (HÖLSCHER; SCHNEIDER, 1999) (Figura 15).

4.2.4. Derivados de C₆-C₃(VII, VIII, IX e X)



VII



X

As substâncias **VII** e **X** foram identificadas em mistura com base nos experimentos de RMN ^1H , COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 44-47).

O espectro de RMN de ^1H da substância **VII** (Apêndice 44) apresentou dois dupletos em δ 6,29 ($J = 15,8$ Hz, H-8) e δ 7,57 ($J = 15,8$ Hz, H-7), referentes a hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamento de configuração *trans*. Além desses, outros dois sinais com acoplamentos *orto* foram observados em δ 6,80 (d , $J = 8,6$ Hz, H-3/5) e δ 7,44 (d , $J = 8,6$ Hz, H-2/6) sugerindo a presença de um anel aromático dissustituído (Tabela 8). Esses acoplamentos foram confirmados pelas correlações ^1H - ^1H observadas no mapa de contornos COSY entre os hidrogênios H-2/6 e H-3/5, e entre H-7 e H-8 (Apêndice 45).

A substância **X** apresentou sinais com multiplicidades semelhantes aos da substância **VII**. Para a substância **X** foram observados dois dupletos em δ 5,80 ($J = 12,8$ Hz, H-8) e δ

6,67 ($J = 12,8$ Hz, H-7) referentes a hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamento de configuração *cis*. Outro sistema de sinais foi observado em δ 6,73 (d , $J = 8,6$ Hz, H-3/5) e δ 7,55 (d , $J = 8,6$ Hz, H-2/6) indicando a presença de anel aromático dissustituído (Tabela 8). Novamente, os acoplamentos foram confirmados pelas correlações ^1H - ^1H observadas no mapa de contornos COSY entre os hidrogênios H-2/6 e H-3/5, e entre H-7 e H-8 (Apêndice 45).

A conexão dos sistemas de spins em ambas as substâncias foi realizada pelas correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Apêndice 47).

As correlações dos hidrogênios vinílicos em δ 6,29 (H-8) com o carbono em δ 125,9 (C-1) e do hidrogênio em δ 7,57 (H-7) com o carbono em δ 129,6 (C-2) foram importantes para estabelecer a junção do substituinte vinílico ao anel aromático da substância **VII**. A correlação entre o hidrogênio vinílico em δ 7,57 (H-7) com um carbono em δ 170,2 (C-9) permitiu confirmar a presença de um grupo acila, característico de ácido carboxílico (Apêndice 47).

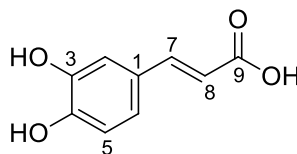
O mesmo padrão de correlação foi observado na identificação da substância **X**. As correlações dos hidrogênios aromáticos em δ 6,73 (H-3/5) e do hidrogênio vinílico em δ 5,80 (H-8) com o carbono quaternário em δ 126,7 (C-1) foram importantes para estabelecer a junção do substituinte vinílico ao anel aromático dissustituído da substância **X**. A presença do grupamento ácido carboxílico foi confirmada pela correlação do hidrogênio em δ 6,67 (H-7) com o carbono em δ 170,7 (C-9) (Apêndice 47).

Tabela 8– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **VII** e **X** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

Posição	VII		X	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1	-	125,9	-	126,7
2/6	7,44 (d , 8,6)	129,6	7,55 (d , 8,5)	131,5
3/5	6,80 (d , 8,6)	115,3	6,73 (d , 8,5)	114,4
4	-	159,5	-	157,6
7	7,57 (d , 15,8)	144,8	6,67 (d , 12,8)	139,4
8	6,29 (d , 15,8)	115,0	5,80 (d , 12,8)	118,0
9	-	170,2	-	170,7

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

A combinação desses dados em comparação com a literatura permitiu a identificação das substâncias como sendo o ácido *trans* *p*-coumárico (**VII**) e *cis* *p*-coumárico (**X**) (GOVINDAN et al., 2019; LI et al., 2015).

**VIII**

A substância **VIII** foi identificada em mistura com o ácido *p*-hidroxibenzoico (**XII**). O espectro de RMN de ^1H da substância **VIII** (Apêndice 48) apresentou dois dupletos em δ 6,27 ($J = 15,9$ Hz, H-8) e δ 7,56 ($J = 15,9$ Hz, H-7) referentes a hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamento de configuração *trans*. Além desses, foi observado um sistema de sinais em δ 6,77 (d , $J = 8,2$ Hz, H-5), δ 6,94 (dd , $J = 8,2$ Hz e $1,9$ Hz, H-6) e δ 7,04 (d , $J = 1,9$ Hz, H-2) característico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Em δ 6,81 (d , $J = 8,7$ Hz) e δ 7,87 (d , $J = 8,7$ Hz) foram observados dois dupletos intensos com acoplamento *orto/orto*, referentes a um sistema de sinais de anel aromático 1,4-dissubstituído atribuídos aos hidrogênios do ácido *p*-hidroxibenzoico (**XII**).

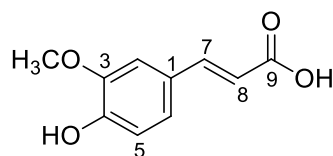
As correlações ^1H - ^1H observadas no mapa de contornos COSY (Apêndice 49) entre H-7 e H-8, H-2 e H-6, e H-5 e H-6 permitiram a confirmação dos acoplamentos obtidos nos sistemas de sinais no espectro de RMN de ^1H .

O mapa de contornos HMBC forneceu correlações (3J , $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) fundamentais, que permitiram atribuir estruturalmente a presença de uma carbonila em δ 167,9 (C-1) característica de ácido carboxílico, duas hidroxilas aromáticas em δ 145,7 (C-3') e δ 146,6 (C-4') (Tabela 9, Apêndice 51). Esses dados, em comparação com a literatura (TIAN et al., 2018), permitiram identificar a substância **VIII** como sendo o ácido cafeico.

Tabela 9– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **VIII** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

Posição	VIII		ácido cafeico (CD_3OD, 2,35 e 9,4 T) (Tian et al., 2018)	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	126,2	-	125,6
2	7,04 (d , 1,9)	113,5	7,06 (s)	115,9
3	-	145,7	-	144,9
4	-	146,6	-	148,6
5	6,77 (d , 8,2)	114,4	6,77 (d , 8,0)	114,7
6	6,94 (dd , 8,2; 1,9)	121,4	6,99 (d , 8,0)	121,4
7	7,56 (d , 15,9)	145,5	7,49 (d , 16,0)	145,7
8	6,27 (d , 15,9)	113,5	6,27 (d , 16,0)	114,7
CO	-	167,9	-	166,5

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

**IX**

O espectro de RMN de ^1H da substância **IX** (Apêndice 52) apresentou um singlete intenso em 3,88 (3H), referente a uma metoxila ligada ao anel aromático, dois dupletos em δ 6,31 ($J = 15,6$ Hz, H-8) e δ 7,52 ($J = 15,6$ Hz, H-7), atribuídos a hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamento de configuração *trans*, e um sistema de hidrogênios aromáticos em δ 6,79 (d , $J = 8,1$ Hz, H-5), δ 7,03 (dd , $J = 8,1$ e $1,5$ Hz, H-6) e δ 7,15 (d , $J = 1,5$ Hz, H-2) característico de anel trissubstituído.

A confirmação da estrutura de **IX**, identificada como *trans*-ácido ferúlico, foi estabelecida com base nas correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 53-55) e por comparação com a literatura (SALUM; ROBLES; ERRA-BALSELLS, 2010) (Tabela 10).

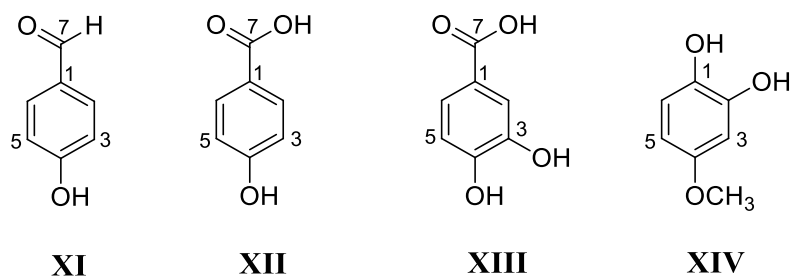
Tabela 10– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **IX** (J em Hz, CD_3OD , 14,1T)

IX			<i>trans</i>-ácido ferúlico (DMSO-d_6, 4,7 e 11,75 T) (Salum; Robles; Erra-Balsells, 2010)	
Posição	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	126,4	-	125,79
2	7,15 (d , 1,5)	110,0	7,28 (d , 1,8)	111,16
3	-	147,7	-	147,93
4	-	148,8	-	149,09
5	6,79 (d , 8,1)	114,7	6,80 (d , 8,2)	115,52
6	7,03 (dd , 8,1; 1,5)	122,9	7,09 (dd , 8,2; 1,8)	122,84
7	7,52 (d , 15,6)	144,3	7,49 (d , 16,0)	144,53
8	6,31 (d , 15,6)	*	6,37 (d , 16,0)	115,64
OCH3	3,88 (s)	54,9	3,82 (s)	55,70
CO	-	*	-	168,01

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC. *sinal não observado

4.2.5. Derivados de C₆ e C₆-C₁ (XI, XII, XIII e XIV)

As substâncias **XI**, **XII**, **XIII** e **XIV** foram identificadas com base nos espectros de RMN de ¹H, COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura.



O espectro de RMN de ¹H da substância **XI** (Apêndice 44) apresentou dois dupletos em δ 6,92 (*d*, *J* = 8,6 Hz, H-2/6) e em δ 7,78 (*dd*, *J* = 8,6 Hz, H-3/5), referentes aos hidrogênios de anel aromático dissustituído e um singlete de baixa intensidade em δ 9,76 característico de hidrogênio da função aldeído. Os deslocamentos químicos dos carbonos de **XI** foram estabelecidos com base nos mapas de contornos HSQC e HMBC (Apêndices 46 e 47). Por meio dos dados obtidos (Tabela 11) e comparação com a literatura (GOVINDAN et al., 2019) foi possível identificar a substância **XI** como sendo o 4-hidroxibenzaldeído.

Tabela 11– Dados de RMN de ¹H e ¹³C de **XI** (*J* em Hz, CD₃OD, 14,1 T)

Posição	XI		4-hidroxibenzaldeído (CD₃OD, 9,4 T) (Govindan et al., 2019)	
	δ_H	δ_C^a	δ_H	δ_C
1	-	128,8	-	129,6
2/6	6,92 (<i>d</i> , 8,6)	115,2	7,02(<i>d</i> , 8,4)	116,2
3/5	7,78 (<i>d</i> , 8,6)	132,1	7,82 (<i>d</i> , 8,4)	132,8
4	-	163,0	-	162,7
7	9,76 (<i>s</i>)	*	9,83 (<i>s</i>)	192,0

^a Dados de ¹³C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.* sinal não observado

A substância **XII** apresentou no espectro de RMN de ¹H (Apêndice 56) dois dupletos em δ 6,80 (*J* = 8,6 Hz) e δ 7,86 (*J* = 8,6 Hz) com valores de constantes de acoplamento *orto*, inferindo a presença de um anel aromático *para*-sustituído (Tabela 12). As correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndice 57-59) permitiram sugerir a estrutura de **XII** e identificá-la como sendo o ácido *p*-hidroxibenzoico (REN et al., 2012).

Tabela 12– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XII** (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

Posição	XII		ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico (DMSO-d_6, 9,4 T) (Ren et al., 2012)	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	122,3	-	122,3
2/6	7,86 (<i>d</i> , 8,6)	131,5	7,79 (<i>d</i> , 8,0)	131,6
3/5	6,80 (<i>d</i> , 8,6)	114,5	6,82 (<i>d</i> , 8,0)	115,1
4	-	161,5	-	161,4
7	-	169,6	-	167,8

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H da substância **XIII** (Apêndice 60) apresentou um duplete em δ 6,79 ($J = 8,2$ Hz, H-5), um duplo duplete em δ 7,42 ($J = 8,2$ e 1,7 Hz, H-6) e um singlete largo em δ 7,43 (1H), referentes aos hidrogênios do anel aromático trissubstituído. No mapa de contorno COSY foram observadas as correlações entre H-5 e H-6 (Apêndice 61). Os dados de RMN de ^{13}C foram obtidos através dos mapas de contornos HSQC e HMBC (Apêndices 62 e 63). Por meio dos dados obtidos (Tabela 13) e comparação com a literatura (NGUYEN et al., 2013) foi possível identificar a substância **XIII** como sendo o ácido 3,4-diidroxibenzoico.

Tabela 13– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XIII** (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

Posição	XIII		ácido 3,4-diidroxibenzoico (CD_3OD , 11,75 T) (Nguyen et al., 2013)	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	122,0	-	123,9
2	7,43 (<i>sl</i>)	116,2	7,43 (<i>s</i>)	117,9
3	-	144,5	-	146,2
4	-	149,9	-	151,5
5	6,79 (<i>d</i> , 8,2)	114,2	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	115,8
6	7,42 (<i>dd</i> , 8,2; 1,7)	122,4	7,42 (<i>d</i> , 8,4)	123,8
7	-	168,9	-	171,0

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H da substância **XIV** (Apêndice 64) apresentou um singlete intenso em δ 3,89 (3H) referente a uma metoxila aromática, dois dupletos em δ 6,81 ($J = 8,2$ Hz, H-6) e δ 7,56 ($J = 1,6$ Hz, H-3), e um duplo duplete em δ 7,53 ($J = 8,2$ e 1,6 Hz, H-5) com constantes de acoplamento que configuram a estrutura de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído.

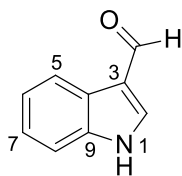
A posição da metoxila aromática no carbono C-4 foi atribuída pela correlação observada no espectro de NOESY 1D (Apêndice 68) com o hidrogênio em δ 7,56. As demais correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 65-67) e comparação com a literatura (CHENG et al., 2021) (Tabela 14) permitiram identificar a substância **XIV** como 1,2-diidroxibenzeno-4-metoxibenzeno.

Tabela 14– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XIV** (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

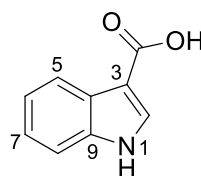
Posição	XIV		1,2-diidroxibenzeno-4-metoxibenzeno (CDCl_3 , 9,4 T) (Cheng et al., 2021)
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}
1	-	146,9	-
2	-	147,0	-
3	7,56 (<i>d</i> , 1,6)	112,4	7,43 (<i>d</i> , 1,8)
4	-	150,7	-
5	7,53 (<i>dd</i> , 8,2; 1,6)	123,4	7,31 (<i>dd</i> , 8,0; 1,8)
6	6,81 (<i>d</i> , 8,2)	114,1	6,95 (<i>d</i> , 8,0)
4-OCH₃	3,89 (<i>s</i>)	54,7	3,90 (<i>s</i>)

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

4.2.6. Derivados indólicos (XV e XVI)



XV



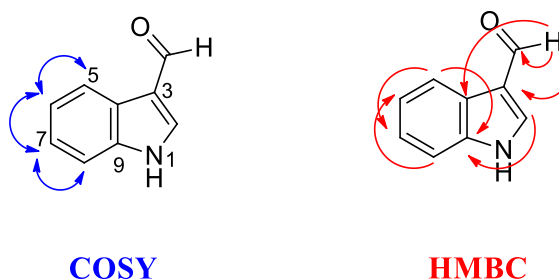
XVI

A elucidação estrutural das substâncias **XV** e **XVI** foi estabelecida com base nos experimentos de RMN ^1H , COSY, HSQC e HMBC e de EM ESI-Qq-TOF.

O espectro de massas de alta resolução da substância **XV** (Apêndice 69) apresenta, em modo positivo, um pico m/z 146,0604 $[\text{M}+\text{H}]^+$ compatível com a fórmula $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$ (calc. para $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}$, 146,0606). Para a substância **XVI** (Apêndice 74) observa-se, em modo negativo, um pico de m/z 160,0403 $[\text{M}-\text{H}]^-$ que resulta na fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$ (calc. para $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_2$, 160,0511).

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 70) da substância **XV** exibiu sinais com deslocamentos químicos na região de alta frequência, sugerindo a presença de um anel heterocíclico aromático. Em δ 7,23 (*ddd*, $J = 7,8$, 7,1 e 1,2 Hz, H-6), δ 7,28 (*ddd*, $J = 8,1$, 7,1 e 1,2 Hz, H-7), δ 7,47 (*d*, $J = 8,1$ Hz, H-8) e δ 8,15 (*dl*, $J = 7,8$ Hz, H-5) são observados sinais com multiplicidades que evidenciam a presença de um sistema aromático dissustituído. A exibição de dois singletos intensos em δ 8,10 (H-2) e em δ 9,89 sugere a presença de um hidrogênio pertencente a um núcleo indólico, e um hidrogênio de uma função aldeído, respectivamente (Tabela 15).

Por meio das correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 71-73, Figura 17), juntamente com os sinais obtidos no espectro de EM ESI-Qq-TOF (Apêndice 69) e comparação com a literatura (AL-QUDAH et al., 2020), foi possível identificar a substância **XV** como sendo 1*H*-indol-3-carboxaldeído.

Figura 17– Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC de **XV****Tabela 15**– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XV** (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

Posição	XV		indol-3-carboxaldeído (DMSO, 9,4 T) (Al-Qudah et al., 2020)	
	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	*	-	12,15(bs)	-
2	8,10 (s)	138,1	8,29 (s)	138,5
3	-	118,7	-	118,1
4	-	124,1	-	124,0
5	8,15 (d, 7,8)	120,9	8,07 (d,8,9)	120,8
6	7,23 (ddd, 7,8; 7,1; 1,2)	122,5	7,21-7,26 (m)	122,1
7	7,28 (ddd, 8,1; 7,1; 1,2)	123,2	7,21-7,26 (m)	123,4
8	7,47(d, 8,1)	111,7	7,52(d, 8,0)	112,4
9	-	137,6	-	137,0
HCO	9,89 (s)	186,2	9,93 (s)	185,0

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.* sinal não observado

A substância **XVI** apresenta perfil espectroscópico semelhante ao da substância **XV**. O espectro de RMN de ^1H da substância **XVI** (Apêndice 75, Tabela 16) exibiu sinais com deslocamentos químicos na região de alta frequência, sugerindo a presença de um anel heterocíclico aromático. Em δ 7,16 (ddd, $J = 7,8, 7,1, 1,4$ Hz, H-6) e δ 7,19 (ddd, $J = 7,8, 7,5$ e 1,2 Hz, H-7) foram observados sinais com o mesmo perfil de multiplicidades que os de **XV**, atribuídos aos hidrogênios com acoplamentos *orto/orto/meta* em relação aos hidrogênios δ 7,43 (dl, $J = 7,5$ Hz, H-8) e δ 8,06 (dl, $J = 7,1$ Hz, H-5), evidenciando a presença de um sistema aromático dissustituído. A presença do singlete com deslocamento em δ 7,94 (H-2), atribuído ao hidrogênio na posição C-2 do núcleo indólico, e a ausência do singlete em δ 9,89 demonstraram que a principal diferença entre **XV** e **XVI** estava no grupo funcional presente em C-3 do núcleo indólico.

A atribuição do grupo carboxílico de **XVI** na posição C-3 foi atribuída com base nos dados de RMN de ^1H , que juntamente com o sinal m/z 160,0403 $[\text{M}-\text{H}]^-$ obtido por Espectrometria de Massas (Apêndice 74) e a simulação do núcleo estrutural por ChemBio

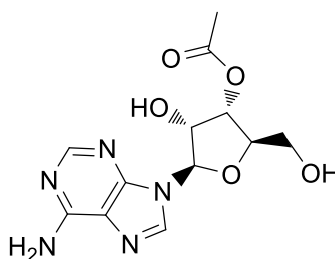
Draw Ultra (versão 12.0), sugeriram à substância **XVI** a fórmula molecular $C_9H_7NO_2$, já descrita na literatura como 1*H*-indol-3-ácido carboxílico (WANG et al., 2010).

Tabela 16– Dados de RMN de 1H e ^{13}C de **XVI** (*J* em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

Posição	XVI		1 <i>H</i> -indol-3-ácido carboxílico ($CDCl_3$, 7,05 T) (Wang et al., 2010)	
	δ_H	δ_C^a	δ_H	δ_C
1	-	-	11,85-11,97 (<i>m</i>)	-
2	7,94 (<i>s</i>)	131,9	7,46-7,50 (<i>m</i>)	133,3
3	-	107,2	-	108,4
4	-	126,0	-	127,0
5	8,06 (<i>dl</i> , 7,1)	120,7	8,0-8,06 (<i>m</i>)	121,6
6	7,16 (<i>ddd</i> , 7,8; 7,1; 1,4)	121,7	7,14-7,33 (<i>m</i>)	122,0
7	7,19 (<i>ddd</i> , 7,8; 7,5; 1,2)	121,7	7,14-7,33 (<i>m</i>)	122,0
8	7,43 (<i>dl</i> , 7,5)	111,6	8,0-8,06 (<i>m</i>)	113,2
9	-	136,6	-	137,5
-COOH	*	*	11,85-11,97 (<i>m</i>)	167,0

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC. * sinal não observado

4.2.7. Adenosina esterificada (XVII)



XVII

A substância **XVII** foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua estrutura foi determinada com base nos experimentos de RMN de 1H , COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 79-82).

O espectro de RMN de 1H da substância **XVII** (Apêndice 79) exibiu singletos intensos em δ 8,18 e δ 8,31, sugerindo a presença de hidrogênios de sistema aromático heterocíclico, e em δ 1,89 atribuído a hidrogênios metílicos desprotegidos. Outro sistema de sinais mostra um duplete em δ 5,97 ($J = 6,4$ Hz), característico de hidrogênio de unidade glicosídica, e sinais com deslocamentos químicos no intervalo entre δ 3,74 - 4,73 com multiplicidades de duplo dupletos e quadrupeto, pertencentes aos hidrogênios do glicosídeo (Tabela 17).

Com base nas correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (Apêndices 80-82), e comparação com a literatura (CIUFFREDA; CASATI; MANZOCCHI, 2007; CIUFFREDA; CASATI; SANTANIELLO, 2000), constatou-se que a substância **XVII** se tratava da adenosina esterificada na posição 3' do glicosídeo, confirmada pela correlação 2J da metila em δ 1,89 com a carbonila de éster em δ 178,9. A substância **XVII** foi identificada como sendo a 3'-O-acetil-adenosina.

Tabela 17– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XVII** (J em Hz, CD_3OD , 14,1 T)

Posição	XVII		3'-O-acetil-adenosina (DMSO- d_6 , 11,75 T) (Ciuffreda; Casati; Santaniello, 2000)	
	δ_H	δ_C^a	δ_H	δ_C
2	8,18 (s)	152,0	8,29 (s)	152,1
4	-	148,8	-	148,8
5	-	119,5	-	119,7
6	-	156,0	-	156,2
8	8,31 (s)	140,2	8,18 (s)	140,3
1'	5,97 (d, 6,4)	89,6	5,96 (d, 7,0)	89,8
2'	4,73 (dd, 6,4; 5,2)	74,0	4,97 (dd, 7,0; 5,6)	74,0
3'	4,32 (dd, 5,2; 2,6)	70,9	5,40 (dd, 5,6; 2,0)	71,1
4'	4,17 (q, 2,6)	86,7	4,26 (ddd, 2,0; 2,0; 2,0)	86,8
5'a	3,88 (dd, 12,6; 2,6)	61,7	3,87 (dd, 12,6; 2,0)	61,8
5'b	3,74 (dd, 12,6; 2,6)	61,7	3,77 (dd, 12,6; 2,0)	61,8
CO	-	178,9	-	178,8
CH ₃ (CO)	1,89 (s)	22,5	2,16 (s)	22,4

^a Dados de ^{13}C atribuídos por experimentos de HSQC e HMBC.

4.3 Ensaios biológicos

Doença de Chagas e Leishmaniose são doenças infecciosas causadas pelos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp., respectivamente, e consideradas doenças negligenciadas que causam alta taxa de mortalidade, principalmente nos países subdesenvolvidos (BOU et al., 2014).

Considerando a grande demanda por novos medicamentos que auxiliem na cura ou tratamentos dessas doenças, associado aos relatos na literatura do potencial biológico de fenilfenalenonas frente aos parasitas causadores de leishmaniose (DEL RÍO et al., 2006), optou-se pela investigação da bioatividade das substâncias **III** e **IV**, submetendo-as aos ensaios antileishmania, tripanocida e citotóxico.

Conforme apresentado na Tabela 18, ambas as fenilfenalenonas (**III** e **IV**) apresentaram valores de EC₅₀ moderados para *T. cruzi* tripomastigotas em comparação com o fármaco padrão benznidazol, e não exibiram citotoxicidade contra as células NCTC na concentração mais alta testada (200 µM). Os valores do índice de seletividade foram calculados como 5,3 e 3,0 para **III** e **IV**, respectivamente.

Os valores de EC₅₀ para as linhagens *T. cruzi* amastigotas e *L. infantum* amastigotas indicaram que as substâncias não foram ativas para essas linhagens, quando comparadas com o fármaco padrão benznidazol e glucantime, respectivamente.

Tabela 18– Valores de concentração efetiva (EC₅₀) das fenilfenalenonas **III** e **IV** nas linhagens testadas

Substância	EC ₅₀ (µM) <i>T. cruzi</i> tripomastigotas	EC ₅₀ (µM) <i>T. cruzi</i> amastigotas	EC ₅₀ (µM) <i>L. infantum</i> amastigotas	Toxicidade CC ₅₀ (µM) NCTC	Índice de Seletividade (IS)
III	37,7 ± 6,6	Na	Na	>200	5,30
IV	66,6 ± 14,4	Na	Na	>200	3,00
Benznidazol	16,2 ± 0,4	5,5 ± 1,0	-	> 200	12,34

Na: Não-ativo

EC₅₀: resposta inibitória por 50% da população quando exposta a uma determinada concentração da substância testada.

CC₅₀:concentração citotóxica

Os valores comparáveis de EC₅₀ da fenilfenalenona **III** e benznidazol sugerem uma eficácia promissora contra *T. cruzi* tripomastigotas. No entanto, o composto **IV** exibiu atividade reduzida. Os resultados obtidos sugerem que a presença do grupo 4-hidroxifenil em **III** desempenha um papel importante na atividade, diferentemente observado para o composto

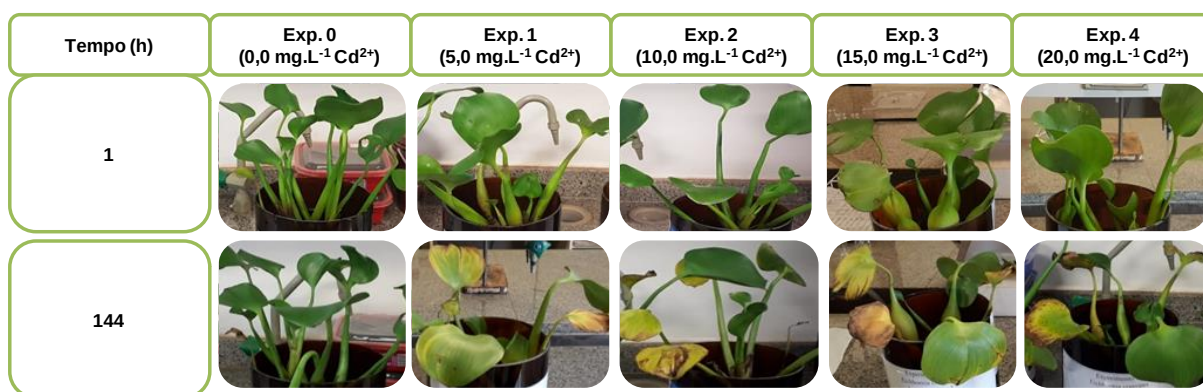
IV, que apresentou unidade catecol (3,4-diidroxifenil). Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a atividade antitripanossômica é relatada para derivados de 8-fenilfenalenonas.

De acordo com a literatura (LUQUE-ORTEGA et al., 2004; NORMAN et al., 2019, GUTIÉRREZ et al., 2013), fenilfenalenonas com o substituinte fenil na posição 9 do núcleo fenaleno apresentam atividade antileishmania contra promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *L. infantum*, bem como a atividade antiplasmódica contra uma cepa de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina. O fato das 8-fenilfenalenonas (**III** e **IV**) não apresentarem atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. infantum* pode estar relacionado com a posição do substituinte fenil no núcleo fenaleno, bem como com as propriedades eletrônicas dos demais substituintes (NORMAN et al., 2019).

4.4 Cultivo de *Pontederia crassipes* na presença e ausência de Cd^{2+}

A exposição de *P. crassipes* a diferentes concentrações de Cd^{2+} mostrou sinais adversos visíveis nos espécimes cultivados durante os seis dias de experimento (144 horas). A Figura 18 mostra o aspecto físico das plantas cultivadas na presença e ausência de cádmio na primeira hora e após 144 horas de tratamento.

Figura 18– Cultivo de *Pontederia crassipes* na primeira hora e após 144 horas de exposição ao Cd^{2+}



A partir do terceiro dia de experimento (Figura 7, pág. 54), folhas e pecíolos de todos os espécimes cultivados na presença de Cd^{2+} mostraram perda de turgor, inibição no crescimento e clorose. No quinto dia, os espécimes cultivados em 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Cd^{2+} apresentaram folhas secas como resposta ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo sofrido pelas plantas pode ser resultado da absorção intracelular do metal através de transportadores que ativam a via de captação de sulfato e enzimas associadas à produção de cisteína, glutatona e oligopeptídeos não protéicos (PAL et al., 2019).

Em todos os tratamentos, o cádmio comprometeu expressivamente a fisiologia de *P. crassipes*, interferindo no crescimento, nutrição e floração dos espécimes. Os efeitos adversos observados podem estar relacionados com a toxicidade do cádmio e por ser um elemento considerado não essencial às plantas (MELIGNANI; FAGGI; DE CABO, 2019). Como consequência, o cádmio provoca uma alteração no crescimento e desenvolvimento das plantas por interferência na absorção e transporte de elementos essenciais como Ca, Mg, P e K, reduz a captação e o transporte de nitratos da raiz para a parte aérea e afeta o balanço hídrico da planta interferindo no metabolismo de fotossíntese (MELIGNANI; FAGGI; DE CABO, 2019).

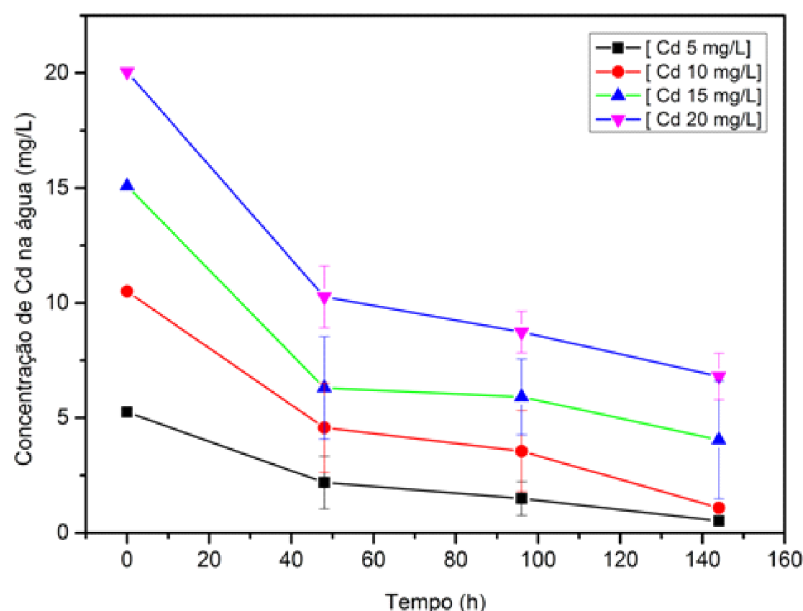
Apesar dos sintomas de toxicidade observados, os espécimes cultivados em $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ sofreram visivelmente os efeitos negativos com menor intensidade, e efeitos mais intensos foram observados no tratamento com $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de cádmio.

4.5 Determinação de Cd nos tecidos vegetais de *Pontederia crassipes* e na solução de cultivo

A concentração de cádmio presente na água e nos tecidos vegetais de *P. crassipes* foi determinada por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS).

A Figura 19 mostra a variação da concentração de Cd presente nas soluções de cultivo durante as 144 horas dos experimentos. Analisando individualmente cada experimento, podemos observar que a tendência de redução da concentração do metal na água ao longo do tempo foi semelhante em todos os tratamentos.

Figura 19– Monitoramento da concentração de Cd presente na água (mg.L^{-1}) de cultivo de *P. crassipes* a cada 48 horas por seis dias (144 horas)



Durante as primeiras 48 horas de tratamento (dois dias) é possível observar uma redução em mais de 50% na concentração de Cd presente na água para os tratamentos de $5,0$, $10,0$ e $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Notavelmente, após o terceiro dia de experimento (entre 48-144 horas) houve uma estabilidade na redução de Cd da água em todos os tratamentos, sugerindo uma

menor atividade no metabolismo de *P. crassipes* em função da toxicidade provocada pelo cádmio após esse período.

A eficiência de remoção de cádmio da água por *P. crassipes* foi consideravelmente alta, atingindo valores de 90% (5,0 mg.L⁻¹) a 66% (20,0 mg.L⁻¹) ao final do tratamento (144 horas, 6 dias) (Tabela 19).

Tabela 19– Eficiência de remoção de diferentes concentrações de Cd da água ao longo do tempo por *Pontederia crassipes*

Tempo (h)	Eficiência de remoção de Cd da água (%)			
	[5,0 mg.L ⁻¹]	[10,0 mg.L ⁻¹]	[15,0 mg.L ⁻¹]	[20,0 mg.L ⁻¹]
48	58%	56%	58%	49%
96	72%	66%	61%	56%
144	90%	90%	73%	66%

A concentração do metal também foi medida nos tecidos vegetais de *P. crassipes*. A Tabela 20 mostra a concentração de cádmio nas raízes e nas partes aéreas do aguapé, o fator de bioconcentração (BCF) e o fator de translocação (TF), calculados utilizando as Equações 1 e 2 (EID et al., 2019).

O fator de bioconcentração (BCF) foi calculado para determinar a eficiência de *P. crassipes* no acúmulo de cádmio em relação à água. O fator de translocação foi calculado para determinar a capacidade de *P. crassipes* em translocar o cádmio do sistema radicular para o sistema de brotação (folhas e pecíolos) (EID et al., 2019).

$$BCF = \frac{C_r}{C_a} \quad \text{Equação 1}$$

$$TF = \frac{C_{pa}}{C_r} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: Cr = Concentração de Cd nas raízes (mg/kg peso seco)

Cpa = Concentração de Cd na parte aérea (mg/kg peso seco)

Ca = Concentração de Cd na água (mg/kg)

Tabela 20– Concentração de Cd nas partes aéreas e raízes de *Pontederia crassipes*, fator de bioconcentração (BCF) e fator de translocação (TF) após 6 dias de tratamento

Tratamentos Cd (mg/L)	Concentração de Cd nas raízes (mg/Kg peso seco)	Concentração de Cd na parte aérea (mg/Kg peso seco)	BCF	TF
0,0 (controle)	*	*	*	*
5,0	2145,0 ± 720,2	173,8 ± 79,2	4531,3 ± 1828,7	0,080 ± 0,026
10,0	3409,9 ± 469,3	264,5 ± 18,5	3184,0 ± 734,5	0,079 ± 0,018
15,0	5559,1 ± 598,1	405,9 ± 44,9	1678,5 ± 749,3	0,074 ± 0,015
20,0	7117,8 ± 528,7	626,8 ± 138,1	1055,7 ± 105,1	0,089 ± 0,025

Valores expressos como média (n = 3) ± Desvio Padrão. * Não detectado

Os dados obtidos evidenciaram maiores valores de absorção de Cd por *P. crassipes* com o aumento da concentração do metal na água de cultivo. As maiores concentrações de cádmio foram detectadas nas raízes, com concentração máxima de aproximadamente 12 vezes em relação às partes aéreas (Tabela 20).

Para todos os experimentos os valores de TF obtidos foram < 1, o que significa inferir que, embora a *P. crassipes* possua uma alta capacidade de translocação de metais através dos seus tecidos, a mesma não é considerada uma espécie hiperacumuladora de Cd, uma vez que, para isso o TF deve atingir valor > 1 (THAKUR et al., 2016). Por outro lado, os altos valores de BCF obtidos demonstram a alta capacidade de *P. crassipes* no processo de fitorremediação de cádmio da água.

4.6 Avaliação do perfil químico dos extratos de *Pontederia crassipes* após cultivo na presença e ausência de Cd²⁺

Os extratos etanólicos brutos de *P. crassipes* obtidos após o cultivo, na presença e ausência de Cd²⁺ (seção 3.9, p. 54), foram analisados por CLAE-DAD (Apêndices 83 e 84) e RMN de ¹H (Apêndices 85 e 86).

As análises dos cromatogramas e espectros de RMN de ¹H evidenciaram a presença dos metabólitos produzidos majoritariamente por *P. crassipes*, como as fenilfenalenonas e derivados de C₆-C₁ e C₆-C₃ (Figuras 20 e 21).

Figura 20– Cromatograma do gradiente exploratório do extrato etanólico das partes aéreas de *P. crassipes* cultivadas na presença de $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$

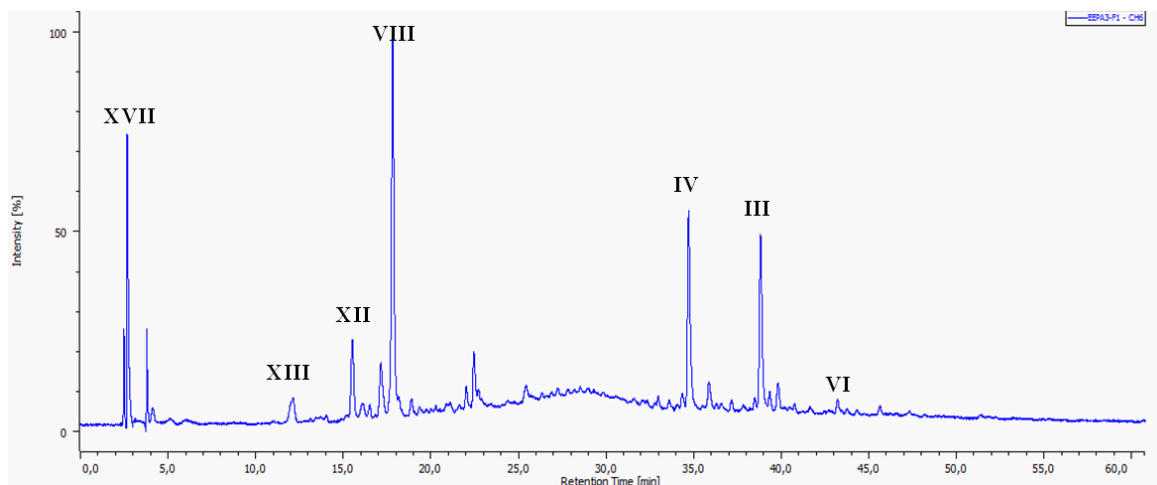
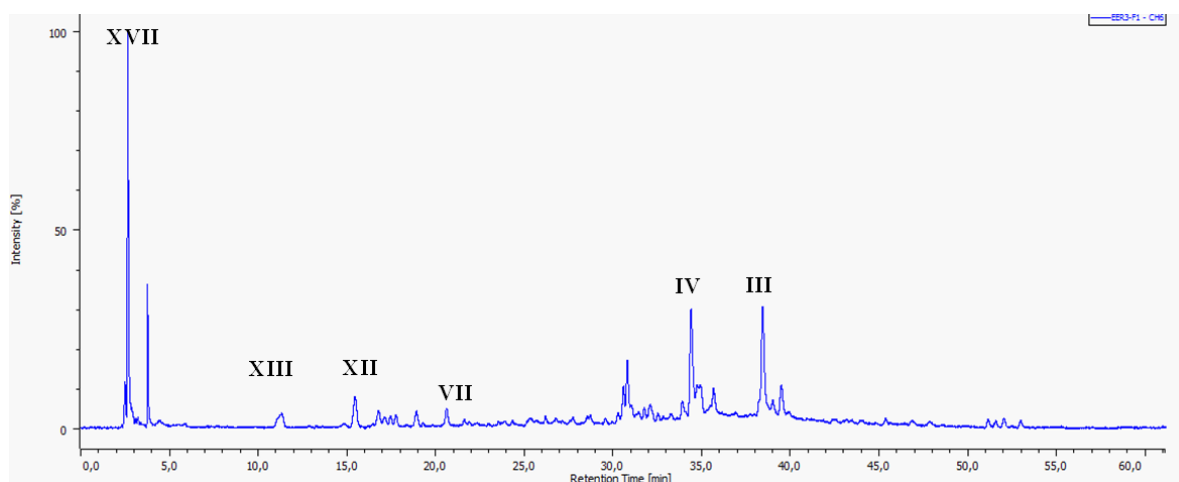


Figura 21– Cromatograma do gradiente exploratório do extrato etanólico das raízes de *P. crassipes* cultivadas na presença de $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$



Para análise mais detalhada, os extratos das partes aéreas e raízes foram analisados por CLUE-EM a fim de detectar qualquer alteração na produção metabólica de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} .

4.7 Análise quimiométrica dos extratos de *Pontederia crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+}

A interpretação de Cromatogramas de Íons Totais (TIC) de amostras biológicas como extratos de plantas pode ser uma tarefa muito complexa. Em muitos casos, a inspeção visual dos perfis químicos das amostras revela apenas uma pequena quantidade de informação. Por

isso, nesse estudo, foi realizada análise quimiométrica do conjunto de dados obtidos dos extratos, utilizando métodos estatísticos para extrair o máximo de informações fornecidas pela técnica CLUE-EM. Para essa análise, o método utilizado foi o de reconhecimento de padrões, que se destina a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais. Desse modo, empregou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e análise discriminante (PLS-DA) e regressão (PLSr) por mínimos quadrados parciais.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método não-supervisionado aplicado na exploração dos dados, que visa o entendimento de sua natureza e a detecção de tendências, padrões ou agrupamentos. A PCA reduz a dimensão da matriz de dados através da combinação linear das variáveis originais. Com isso, é formado um novo sistema de eixos ortogonais entre si, denominado de componentes principais (PCs). A maior quantidade de informação possível é conservada nas PCs. Portanto, o papel da PCA é agrupar variáveis que estão altamente correlacionadas em novas variáveis, criando um conjunto que contém apenas as informações importantes (PILON et al., 2020).

PLS-DA e PLSR são métodos supervisionados que buscam uma correlação entre as variáveis químicas e um conjunto de dados (modelo) usado como base para prever os resultados. Durante a análise supervisionada, a exploração das variáveis do sistema visa forçar a separação dos dados em grupos experimentais baseado no modelo (PILON et al., 2020; FERNANDES, 2016).

O método de PLS-DA consiste em um vetor Y que representa os valores das classes em relação ao vetor X (conjunto de dados). Para a discriminação, classificação ou regressão, o modelo aplicado em PLS deve se ajustar aos parâmetros de validação cruzada (R^2), teste de permutação (valor de p), seletividade e especificidade (PILON et al., 2020; FERNANDES, 2016).

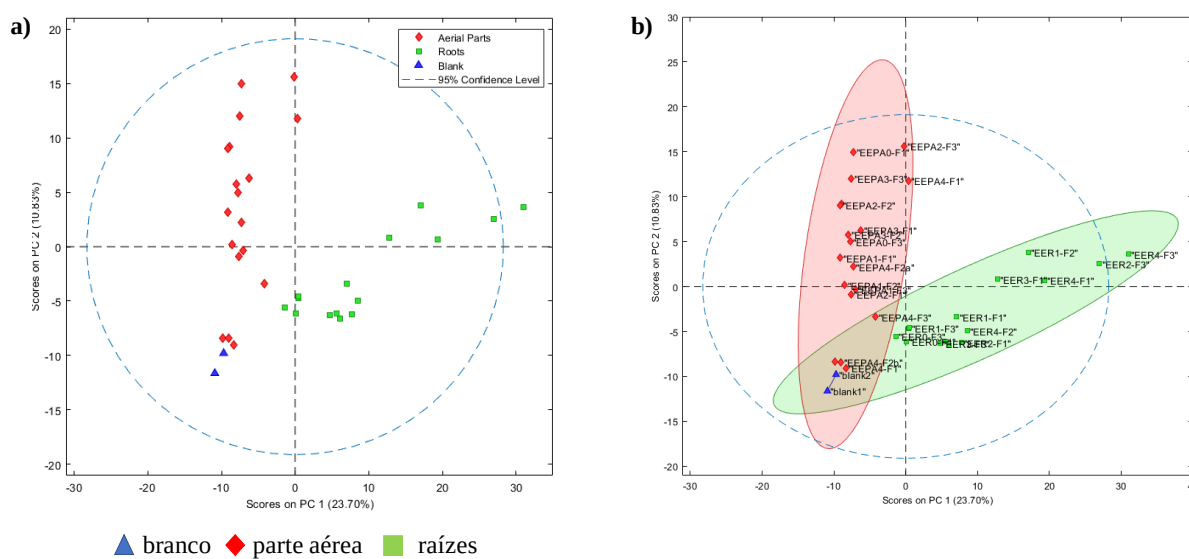
4.7.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise exploratória dos dados obtidos em CLUE-EM foi realizada por PCA, com o intuito de detectar a tendência das amostras de forma não supervisionada da composição química dos extratos orgânicos de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹). Na Figura 22 são apresentados os gráficos denominados matriz de escores de PCA com as componentes PC 1 (variância explicada de 23,70%) versus PC 2 (variância explicada de 10,83%) com variância total de 34,53%. Os gráficos (a e b) mostram o agrupamento das amostras baseado na semelhança dos perfis químicos metabólicos. Com

relação às amostras, dois agrupamentos podem ser observados: o primeiro (em vermelho) referente aos compostos presentes nas partes aéreas, situados nas partes positiva da PC 2 e negativa da PC 1 e PC 2, e o segundo (em verde) atribuído aos compostos das raízes, distribuídos nas partes positiva da PC 1 e PC 2. A separação desses grupos de acordo com os órgãos das plantas indica alta variabilidade entre as amostras da parte aérea e raiz e que, possivelmente, compostos presentes nas raízes, independente da exposição ao Cd^{2+} , são majoritariamente diferentes dos metabólitos presentes nas partes aéreas.

Além disso, o agrupamento das triplicatas das partes aéreas referentes aos metabólitos produzidos na concentração de $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , agrupadas próximas as réplicas do branco (em azul), mostra que a atividade metabólica de *P. crassipes* pode ter sido comprometida com a exposição a altas concentrações de cádmio, em função da sua toxicidade. Esses resultados corroboram com os aspectos fisiológicos observados em *P. crassipes* (Figura 18, p. 87).

Figura 22– Gráficos de escores de PCA dos dados CLUE-EM de 30 amostras dos extratos de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (PC1 x PC2, variância total de 34,53%). a) gráfico sem o código das amostras, b) gráfico com o código das amostras referente a cada triplicata e concentração de Cd^{2+}



EEPAx-Fn = extrato etanólico das partes aéreas; EERx-Fn = extrato etanólico das raízes.

x = 0, 1, 2, 3, 4 referente às concentrações 0,0, 5,0, 10,0, 15,0, $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , respectivamente.

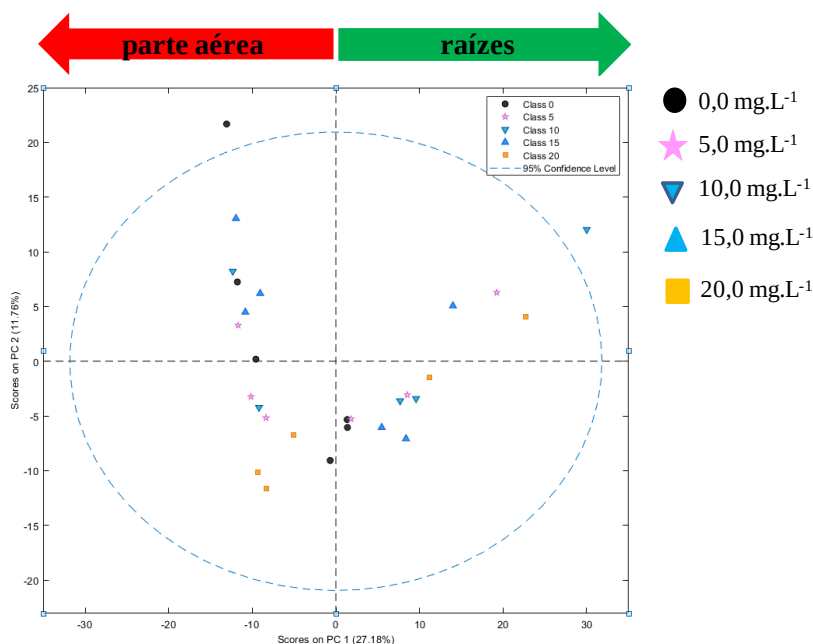
F = frasco de cultivo

n = número de identificação das triplicatas (1, 2, 3)

Nesse estudo, a PCA distinguiu claramente os metabólitos presentes nas partes aéreas e raízes de *P. crassipes*. No entanto, a aplicação não supervisionada da PCA no conjunto de dados mostrou uma alta variação entre as triplicatas das amostras em relação às concentrações

de Cd^{2+} de 0,0 – 20,0 mg.L^{-1} , como visto no gráfico de escores (Figura 23). Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de modelos baseados em métodos supervisionados (PLS) para uma melhor classificação e discriminação dos dados experimentais.

Figura 23– Gráfico de escores de PCA dos dados CLUE-EM de 30 amostras dos extratos de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (PC1 x PC2, variância total de 38,94%)



4.7.2 Análise supervisionada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Métodos supervisionados PLS foram aplicados no conjunto de amostras com o objetivo de analisar se a produção metabólica de *P. crassipes* ocorre seguindo uma tendência em função da exposição às diferentes concentrações de cádmio (0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L^{-1}). Em PLS, o desempenho do modelo aplicado é mostrado em termos dos valores de validação cruzada, teste de permutação, especificidade e sensibilidade.

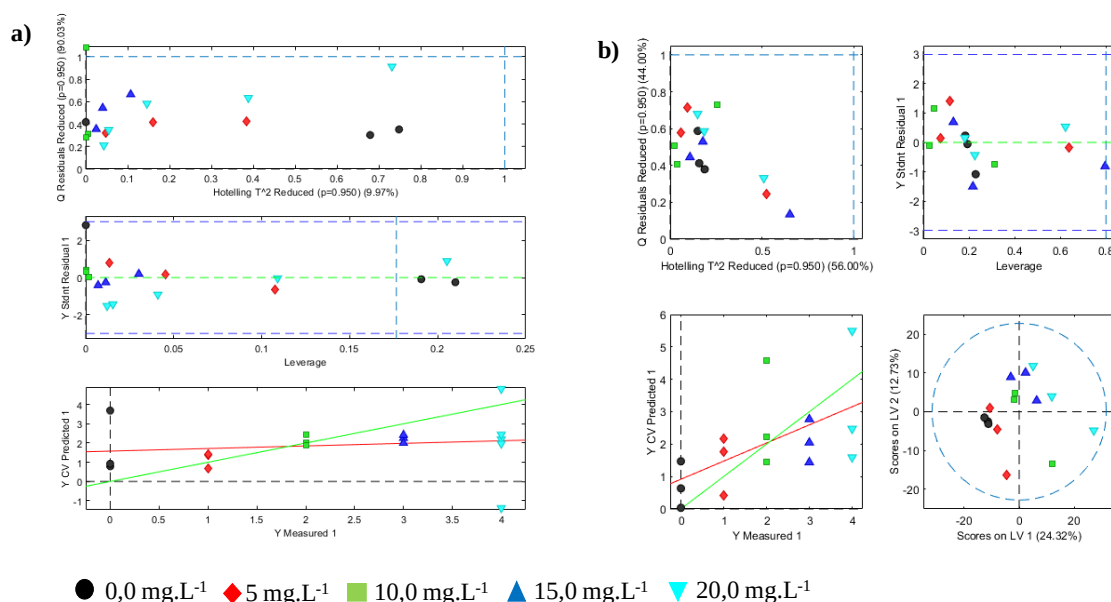
A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSr) foi o primeiro modelo aplicado para o conjunto de dados das partes aéreas e raízes de *P. crassipes*. Esse modelo visa uma relação com a regressão de componentes principais (PCs). A Tabela 21 mostra o desempenho do modelo aplicado para ambas as partes.

Tabela 21– Resultados estatísticos do modelo PLSr aplicado no conjunto de dados CL-EM

Modelo PLSr (Y = 0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Cd²⁺)			
	Parte Aérea	Raízes	Valor ideal para validação
Número de amostras	15	15	
Validação cruzada (R²)	0,024	0,322	≈ 0,99
Teste de permutação (p)	0,081*; 0,138**; 0,600***	0,114*; 0,228**; 0,188***	< 0,05

*Valores de Wilcoxon; **SignTest; ***Rand t-Test

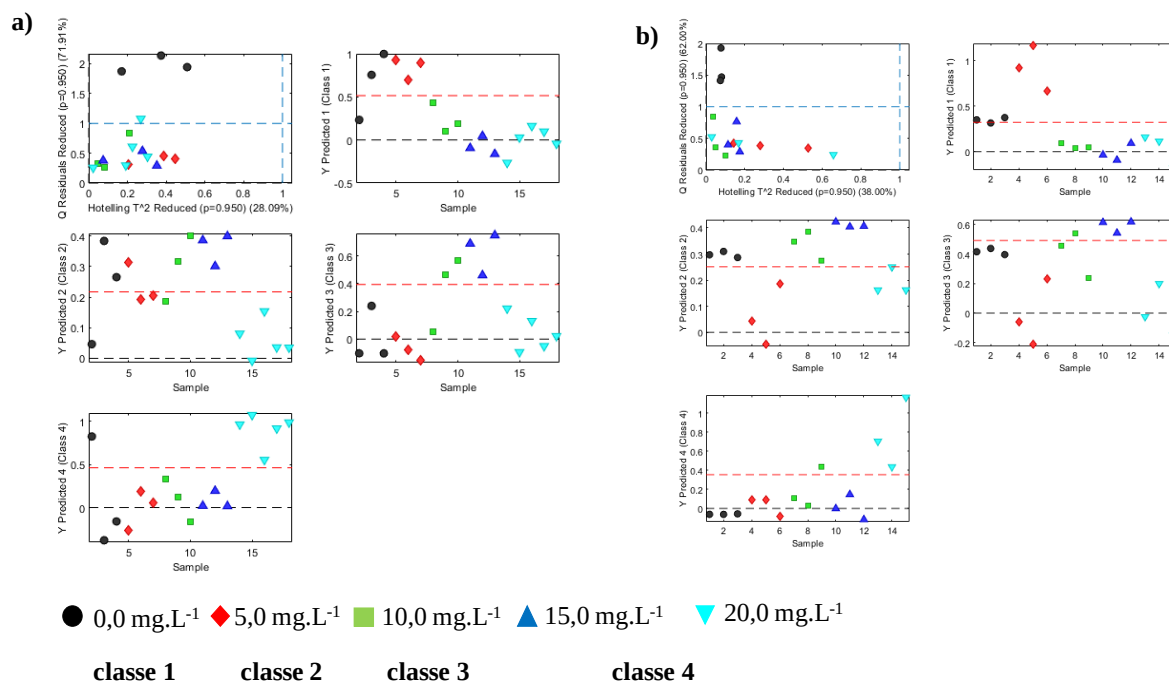
Os dados não se ajustaram ao modelo PLSr, pois os resultados experimentais obtidos, primordiais para o ajuste, não foram aproximados ou compatíveis com valores teóricos ideais de R² na validação cruzada e valor de p no teste de permutação (Tabela 21). Os gráficos de PLSr das partes aéreas e raízes (Figura 24) mostram a disposição espacial das amostras e a ausência de linearidade da regressão, confirmando a falta de ajuste dos dados ao modelo. Diante disso, podemos afirmar que, apesar da tendência das amostras, o modelo aplicado não forneceu a resposta esperada para o conjunto de dados, uma vez que o agrupamento/separação das amostras, levando em consideração a concentração de Cd²⁺, não foi estabelecido. Portanto, uma nova análise supervisionada foi realizada.

Figura 24– Gráficos de escores PLSr dos dados CLUE-EM das 30 amostras dos extratos de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd²⁺: a) partes aéreas, b) raízes

4.7.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Com o intuito de verificar a existência de metabólitos específicos produzidos com a exposição de *P. crassipes* às diferentes concentrações de Cd^{2+} , os conjuntos de dados das partes aéreas e raízes foram submetidos à análise discriminatória PLS-DA. Um modelo PLS-DA subdividido em classes foi proposto para os conjuntos de ambas as partes levando em consideração a concentração de cádmio: classe 1 ($0,0 \text{ mg.L}^{-1}$); classe 2 ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$); classe 3 ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$); classe 4 ($15,0$ e $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Os gráficos Hotelling T2 vs Q Residual da PLS-DA (Figura 25) mostram o comportamento das amostras na matriz.

Figura 25– Gráficos de Hotelling T2 vs Q Residual da PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das parte aéreas e raízes de *P. crassipes*: a) partes aéreas, b) raízes



A Tabela 22 mostra o desempenho do modelo aplicado para os dados de ambas as partes da planta, em termos dos valores de validação cruzada, teste de permutação, especificidade e sensibilidade.

Tabela 22– Resultados estatísticos do modelo PLS-DA aplicado no conjunto de dados CLUE-EM das partes aéreas e raízes

Modelo PLS-DA (Y = 0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Cd²⁺)				
		Parte aérea	Raízes	Valor ideal para validação
Validação cruzada (R²)	Classe 1	0,039	0,081	≈ 0,99
	Classe 2	0,053	0,117	
	Classe 3	0,010	0,009	
	Classe 4	0,014	0,051	
Teste de permutação (valor de p)	Classe 1	(0,275*; 0,372**; 0,881***)	(0,097*; 0,236**; 0,120***)	< 0,05
	Classe 2	(0,626*; 0,699**; 0,584***)	(0,479*; 0,598**; 0,520***)	
	Classe 3	(0,427*; 0,400**; 0,730***)	(0,402*; 0,468**; 0,471***)	
	Classe 4	(0, 108*; 0,174**; 0,682***)	(0,179*; 0,332**; 0,375***)	
Sensibilidade	Classe 1	0,333	0,667	1,00
	Classe 2	0,333	0,333	
	Classe 3	0,667	0,333	
	Classe 4	0,400	0,667	
Especificidade	Classe 1	1,000	1,000	1,00
	Classe 2	0,455	0,444	
	Classe 3	0,636	0,889	
	Classe 4	0,889	0,778	

* Valores de Wilcoxon; **signtest; ***rand t-test

Nessa análise PLS-DA, novamente não houve o ajuste dos dados ao modelo empregado, uma vez que os resultados estatísticos dos dados experimentais não foram coerentes com os valores teóricos ideais para o ajuste tanto das partes aéreas, quanto das raízes (Tabela 22). Visualmente, a ausência do ajuste pode ser observada nos gráficos de PLS-DA subdivididos em classes (Figura 25). Em todos os gráficos, é possível observar o agrupamento das amostras de acordo com a classe. No entanto, esse agrupamento não atingiu a separação esperada nas regiões específicas do gráfico.

É importante ressaltar que, mesmo sem o ajuste dos dados ao modelo, ao compararmos os resultados obtidos das partes aéreas e raízes, vemos claramente que as amostras das raízes possuem uma melhor classificação dos metabólitos em relação as amostras das partes aéreas. Essa resposta pode estar relacionada a maior concentração de cádmio detectada nas raízes como mostrado na Tabela 20 (p. 90).

Com isso, um novo modelo PLS-DA foi proposto para o conjunto de dados envolvendo somente as raízes, a fim de verificar se existem metabólitos específicos produzidos para cada concentração de cádmio utilizada. O modelo levou em consideração a concentração de cádmio em três ordens: Y = controle (0,0 mg.L⁻¹); Y = moderado (5,0 e 10,0 mg.L⁻¹); Y = alto (15,0 e 20,0 mg.L⁻¹). Os gráficos Hotelling T2 vs Q Residual do PLS-DA mostram o comportamento das amostras na matriz, subdivididas em três classes (Figura 26).

A Tabela 23 mostra o desempenho do modelo aplicado para os dados das raízes em termos dos valores de validação cruzada, teste de permutação, especificidade e sensibilidade.

Figura 26– Gráficos Hotelling T2 vs Q Residual da PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das raízes de *P. crassipes*

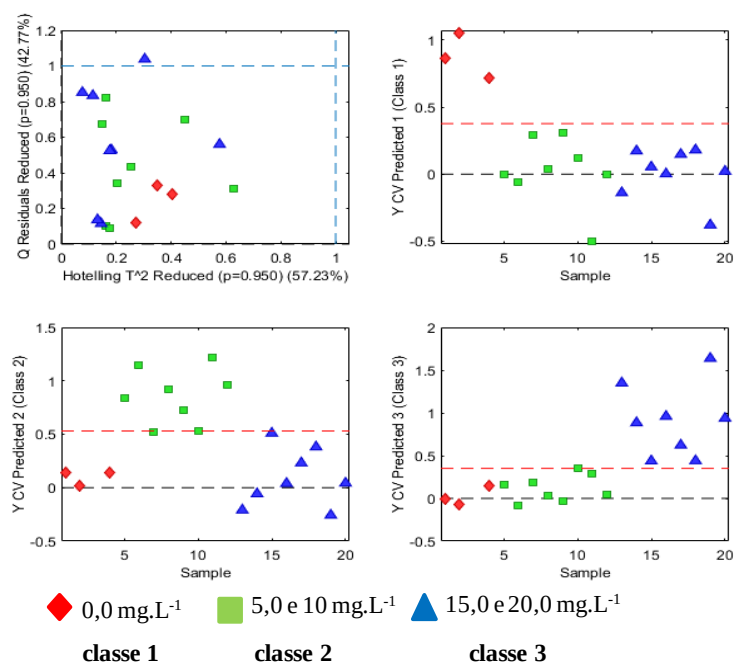


Tabela 23– Resultados estatísticos do modelo PLS-DA aplicado no conjunto de dados CLUE-EM das raízes (classe 1 = 0,0, classe 2 = 5,0 e 10,0, classe 3 = 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Cd²⁺)

Modelo PLS-DA (Y = 0; 5 e 10; 15 e 20 mg.L⁻¹ de Cd²⁺)			
	Valores experimentais		Valor ideal para validação
Número de amostras	15		
Validação cruzada (R²)	Classe 1	0,725	≈ 0,99
	Classe 2	0,772	
	Classe 3	0,741	
Teste de permutação (valor de p)	Classe 1	(0,045*; 0,164**; 0,045***)	< 0,05
	Classe 2	(0,002*; 0,016**; 0,007***)	
	Classe 3	(0,004*; 0,024**; 0,011***)	
Sensibilidade	Classe 1	1,00	1,00
	Classe 2	1,00	
	Classe 3	1,00	
Especificidade	Classe 1	1,00	1,00
	Classe 2	1,00	
	Classe 3	1,00	

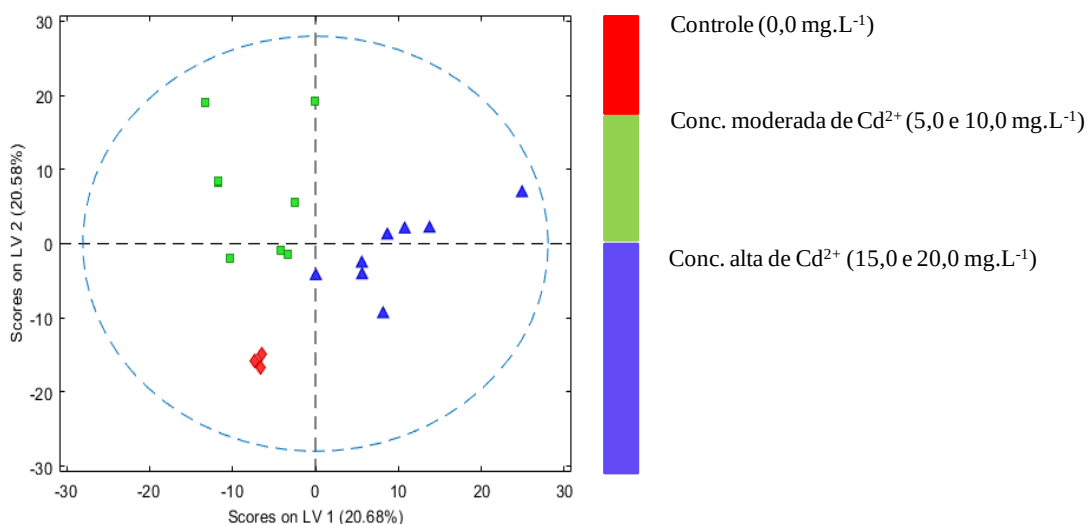
* Valores de Wilcoxon; ** signtest; *** rand t-test

A análise PLS-DA forneceu o ajuste dos dados para esse novo modelo de classificação. Observando os gráficos de Hotelling T² vs Q Residual do PLS-DA (Figura 26), pode-se notar que houve uma excelente classificação das amostras de acordo com a concentração de cádmio. Para a classe 1, somente as amostras controle se encontram agrupadas acima da linha de separação (vermelha). Para a classe 2, somente as amostras correspondentes às concentrações 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹ de Cd²⁺ se encontram agrupadas, assim como para a classe 3 referente às amostras com concentrações 15,0 e 20,0 mg. L⁻¹ de Cd²⁺. Além disso, o desempenho do modelo, apresentado na Tabela 23, confirma o ajuste dos dados com valores satisfatórios de R², valor de p, especificidade e sensibilidade.

Por meio dessas informações podemos inferir que, possivelmente, os metabólitos (íons) responsáveis pela classificação e discriminação das amostras nas três classes podem apresentar diferenças relacionadas à concentração ou até mesmo diferenças químicas estruturais. O padrão de agrupamento observado na PCA foi repetido na PLS-DA, com três

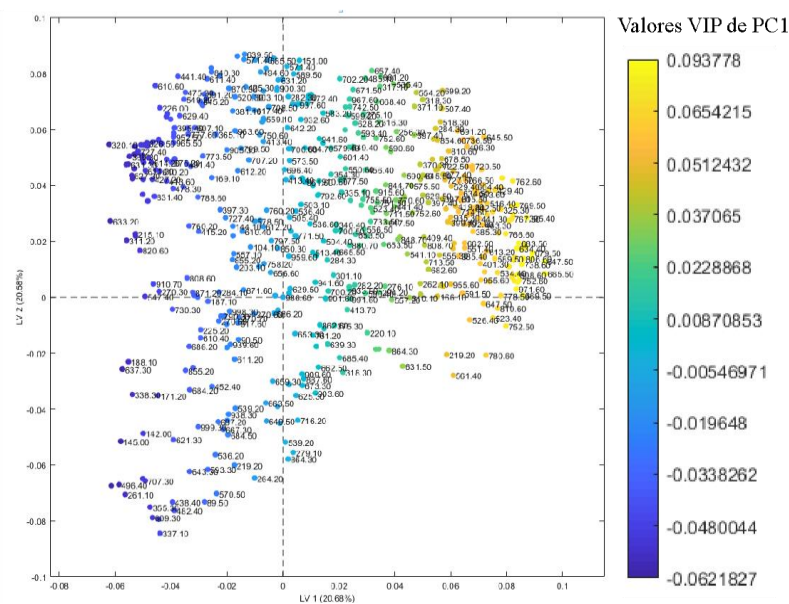
grupos distintos facilmente observados no gráfico de escores de LV1 versus LV2 (variância total de 41,26%) (Figura 27).

Figura 27– Gráficos de escores de PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM das raízes de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+}



Para a discriminação dos metabólitos foi obtido o gráfico de *loading* que mostra a disposição espacial e, concomitantemente, as informações *m/z* dos íons e das variáveis importantes na projeção (VIP) (Figura 28, Tabela 24).

Figura 28– Gráfico de *loading* de PLS-DA subdivididos em classes dos dados CLUE-EM de 15 amostras dos extratos das raízes de *P. crassipes* cultivada na presença e ausência de Cd^{2+} (classe 1 = 0,0, classe 2 = 5,0 e 10,0, classe 3 = 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Cd^{2+})



A Tabela 24 mostra, resumidamente, os valores de m/z , VIP e o tempo de retenção (t_R) dos íons mais importantes para a classificação exibidos no mapa de *loading* PLS-DA. Os valores de m/z em amarelo são os mais relevantes para a região positiva de LV1 e LV2. Já os valores em azul são os mais importantes para a região negativa de LV1 e LV2 e positiva de LV2.

Tabela 24– Valores de m/z , VIP e t_R obtidos na PLS-DA do conjunto de dados CLUE-EM das raízes

Concentração moderada (5,0 e 10,0 mg.L ⁻¹)			Concentração alta (15,0 e 20,0 mg.L ⁻¹)		
m/z	VIP	t_R (min)	m/z	VIP	t_R (min)
145	-0,05799	9,127257	279,2	0,085373	8,338535
188,1	-0,0553	2,161186	395,4	0,087177	9,073342
261,1	-0,05645	4,83914	483,4	0,086897	9,347539
311,2	-0,05594	6,935917	579,4	0,084017	9,267148
320,1	-0,06218	7,237417	634,4	0,083629	7,031572
323,2	-0,05318	6,099595	647,5	0,093672	11,26171
338,3	-0,0539	10,60422	665,5	0,093778	9,761161
369,3	-0,05493	10,40341	669,5	0,085812	9,260183
381,3	-0,05311	10,3844	671,5	0,088964	10,55677
406,3	-0,06142	9,351035	673,5	0,086294	9,903334
496,4	-0,05865	8,982181	679,5	0,089231	10,67316
527,3	-0,05385	7,786477	683,5	0,084274	11,51151
531,3	-0,05605	8,487974	738,6	0,085461	10,3395
627,3	-0,05406	8,050844	752,6	0,084505	11,19847
631,3	-0,0554	8,664212	769,5	0,083733	11,90691
633,2	-0,06178	9,812737	806,6	0,085919	11,72406
637,3	-0,05745	9,847499	808,6	0,083936	11,27263
142	-0,05	8,571171	194,2	0,075009	2,624514
215,1	-0,05278	2,491508	219,2	0,072134	5,302353
233,2	-0,04796	7,275055	325,3	0,077918	9,026622
273,2	-0,04836	8,242753	353,3	0,072999	6,027932
274,1	-0,0527	2,491319	399,3	0,077866	9,482461
305,2	-0,04982	7,02396	429,4	0,075813	11,55169
322,2	-0,05007	6,933003	516,4	0,072965	8,088147
327,2	-0,05016	7,444888	523,4	0,075106	9,342927
327,3	-0,05036	9,245544	534,4	0,076731	5,424244
355,3	-0,04755	8,56481	589,5	0,07572	11,82927

Concentração moderada (5,0 e 10,0 mg.L ⁻¹)			Concentração alta (15,0 e 20,0 mg.L ⁻¹)		
<i>m/z</i>	VIP	<i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>	VIP	<i>t_R</i> (min)
365,1	-0,05013	7,315109	602,5	0,078429	8,79068
405,2	-0,04988	7,455657	604,5	0,08088	11,56647
427,2	-0,04673	7,449122	613,2	0,072778	9,811317
435,4	-0,05302	11,89999	613,5	0,082877	9,964027
506,3	-0,04649	6,676752	629,4	0,073755	9,162636
522,3	-0,05207	7,785725	631,4	0,077112	9,370867
526,3	-0,04854	8,481364	645,5	0,071911	10,87538
541,1	-0,05	11,58723	647,5	0,071725	11,36028
547,4	-0,04938	11,89698	663,5	0,082321	9,608056
553,4	-0,04541	11,86276	681,5	0,073405	11,00845
609,3	-0,04671	7,886688	712,5	0,08175	10,6879
610,6	-0,04566	11,05786	722,6	0,082721	10,13203
611,3	-0,04924	7,162278	748,5	0,08087	8,788163
614,2	-0,04699	11,04527	752,5	0,079725	9,221687
626,4	-0,04864	8,661164	756,6	0,082205	10,33357
653,5	-0,05176	9,301367	762,6	0,082175	11,31362
707,3	-0,0493	7,349564	766,6	0,079668	9,5101
726,4	-0,05073	8,83284	767,5	0,081926	11,43101
727,4	-0,05184	8,296777	778,5	0,077898	10,38847
820,6	-0,05121	9,874792	780,6	0,072587	10,09276
826,5	-0,0488	9,052125	784,6	0,082532	11,56069
831,4	-0,04598	8,972323	796,6	0,081976	9,966772
910,7	-0,04641	9,560794	810,6	0,076813	10,27951
			971,6	0,083478	9,792379

Os dados apresentados na Tabela 24 mostram, nitidamente, a diferença na composição metabólica dos extratos das raízes obtidos em concentrações altas e moderadas de cádmio. Desse modo, o emprego da PLS-DA no conjunto de dados mostrou ser uma abordagem interessante para a identificação dos metabólitos responsáveis pela classificação das amostras.

Na tentativa de identificação de alguns íons responsáveis por essa classificação, foi realizada uma comparação de *m/z* obtidas por CLUE-EM com a *m/z* dos fitoconstituintes isolados dos extratos etanólicos das raízes e partes aéreas de *P. crassipes*. Essa análise mostrou que os íons com *m/z* 145, 194,2 e 320,1 podem ser relativos aos compostos **XV**, **IX** e **V**, respectivamente. Além disso, íons com *m/z* na faixa de 600-700 podem indicar a presença

de dímeros de fenalenos, metabólitos comumente relatados em *P. crassipes* (LALITHA; SRIPATHI; JAYANTHI, 2012).

Certamente, a biossíntese dos compostos correspondentes aos íons formados sofreu influência pela exposição de *P. crassipes* ao Cd^{2+} . Logo, ressaltamos a necessidade de identificação dos íons, a fim de compreendermos o mecanismo de interação do Cd^{2+} com os metabólitos de *P. crassipes*, visto que esta espécie é considerada uma macrófita com alto potencial de bioacumulação de Cd^{2+} e outros metais.

Este estudo é de grande relevância para a ciência, pois poderá contribuir na descoberta de compostos com capacidade quelante, que podem ser empregados tanto na área medicinal na produção de fármacos, quanto na área ambiental em processos de descontaminação do meio ambiente.

5 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *P. crassipes* conduziu ao isolamento, determinação e/ou elucidação estrutural de 17 compostos incluindo anidridos naftálicos, fenilfenalenonas, fenilfenalenos, derivados aromáticos C₆, C₆-C₁ C₆-C₃ e indólicos. Dentre estes, destaca-se os anidridos naftálicos inéditos **I** e **II**, bem como a ocorrência dos compostos **VII**, **X**, **XV-XVII** pela primeira vez em *P. crassipes*. Além disso, destacamos a potencialidade biológica das 8-fenilfenalenonas **III** e **IV** contra parasitas tripomastigotas de *T. cruzi*, tornando-as substâncias promissoras para estudos biológicos voltados para o desenvolvimento de fármacos usados no tratamento de doenças de Chagas.

Os resultados dos experimentos realizados com a exposição de *P. crassipes* ao Cd²⁺, nos permitiram verificar a alta capacidade dessa espécie no processo de fitorremediação do respectivo metal, atingindo uma eficiência de remoção de Cd da água de até 90% ao final do tratamento. Além disso, a análise quimiométrica dos dados de CLUE-EM dos extratos das partes aéreas e raízes sob diferentes concentrações de Cd²⁺ mostrou que, certamente, o cádmio possui influência sob o metabolismo secundário de *P. crassipes*. Todavia, ressaltamos a necessidade de estudos mais detalhados voltados para o entendimento das interações químicas planta-metal para essa espécie.

6 REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, A. M. et al. Cytotoxic and antioxidant properties of active principals isolated from water hyacinth against four cancer cells lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 397, 2014.
- AL-QUDAH, M. A. et al. Chemical constituents of the aerial parts of *Salvia judaica* Boiss. from Jordan. **Natural Product Research**, v. 34, n. 20, p. 2981-2985, 2020.
- ANTONIADIS, V. et al. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. **Earth-Science Reviews**, v. 171, p. 621-645, 2017.
- ARIFKHODZHAEV, A. O.; SHOYAKUBOV, R. S. Polysaccharides of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 31, n. 4, p. 521-522, 1995.
- BOU, D. D. et al. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine**, v. 21, p. 676-681, 2014.
- CARDOSO, S. F. **Avaliação de *Eichhornia crassipes* como fonte de ácido chiquímico**. 2013. Monografia – (Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- CARDOSO, S. F.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. *Eichhornia crassipes*: na advantageous source of shikimic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 439-442, 2014.
- CHAI, T. T.; NGOI, J. C.; WONG, F. C. Herbicidal Potential of *Eichhornia crassipes* Leaf Extract against *Mimosa pigra* and *Vigna radiata*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, p. 835-842, 2013.
- CHEEK, M. et al. New scientific discoveries: Plants and fungi. **Plants People Planet**, v. 2, n. 5, p. 371-388, 2020.
- CHEN, Y.; PAETZ, C.; SCHNEIDER, B. Organ-specific distribution and non-enzymatic conversions indicate a metabolic network of phenylphenalenones in *Xiphidium caeruleum*. **Phytochemistry**, v. 159, p. 30-38, 2019.
- CHENG, G.-G. et al. Phytochemicals and Allelopathy of Induced Water Hyacinth against *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 6, p. 1772-1779, 2021.
- CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; MANZOCCHI, A. Complete ^1H and ^{13}C NMR spectral assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. **Magnetic Mesonance in Chemistry**, v. 45, p. 781-784, 2007.

- CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; SANTANIELLO, E. The action of adenosine deaminase (E.C. 3.5.4.4.) on adenosine and deoxyadenosine acetates: The crucial role of the 5'-hydroxy group for the enzyme activity. **Tetrahedron**, v. 56, p. 3239-3243, 2000.
- CLEMENS, S. How metal hyperaccumulating plants can advance Zn biofortification. **Plant and Soil**, v. 411, p. 111-120, 2017.
- CORNELIUS, M. T. F. et al. Phytochemical and biological investigations of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 564-570, 2016.
- DANTAS-SANTOS, N. et al. Fresh water plants synthesize sulfated polysaccharides: heterogalactans from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **International Journal of Molecula Sciences**, v. 13, p. 961-976, 2012.
- DEL RÍO, J. C. et al. Phenylphenalenone type compounds from the leaf fibers of abaca (*Musa textilis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8744-8748, 2006.
- DELLA GRECA, M. et al. Dimeric phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 19, p. 3971-3976, 1992a.
- DELLA GRECA, M. et al. Phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 311-314, 1992b.
- DELLA GRECA, M. et al. Degraded phenalene metabolites in *Eichhornia crassipes*. **Natural Product Letters**, v. 1, p. 233-238, 1993.
- DELLA GRECA, M.; MONACO, P.; PREVITERA, L. New oxygenated sterols from the weed *Eichhornia crassipes* SOLMS. **Tetrahedron**, v. 47, n. 34, p. 7129-7134, 1991.
- DELLA GRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Revised structures of phenylphenalene derivatives from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 3268-3272, 2008.
- DELLA GRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Structures of new phenylphenalene-related compounds from *Eichhornia crassipes* (water hyacinth). **Tetrahedron**, v. 65, p. 8206-8208, 2009.
- EID, E. M. et al. Bioaccumulation and translocation of nine heavy metals by *Eichhornia crassipes* in Nile delta, Egypt: Perspectives for phytoremediation. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 8, p. 821-830, 2019.
- EL-SHEEKH, M. M.; HAROON, A. M.; SABAE, S. Activity of some Nile River aquatic macrophyte extracts against the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **African Journal of Aquatic Science**, v. 42, n. 3, p. 271-277, 2017.

- ELAGIB, S. M. Antiparasitic activity of *Eichhornia crassipes* leaves extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101556, 2020.
- ESTEVES, C. R. L. et al. **Absorção de metais e produção de antocianidinas em *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae)**. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis. **Anais...**2011.
- FAREED, M. F.; HAROON, A. M.; RABEH, S. A. Antimicrobial activity of some macrophytes from Lake Manzalah (Egypt). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 21, p. 2454-2463, 2008.
- FAWZY, M. A. et al. Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 3, p. 1753-1771, 2012.
- FERNANDES, D. D. S. **Novas estratégias para a seleção de variáveis por intervalos em problemas de classificação**. 2016. 139 f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- FIGUEIREDO, P. et al. New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colourloss? **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 301-308, 1996.
- FILETO-PÉREZ, H. A. et al. GC/MS analysis of some extractives from *Eichhornia crassipes*. **Bio Resources**, v. 10, p. 7353-7360, 2015.
- GANESH, N.; SHARMA, P. *In vivo* determination of wound healing and antitumor properties of HPLC eluted fractions of water weeds (*Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*). **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, p. 355-367, 2018.
- GAYA, K. S.; MATHEW, L.; MG BABU, R. A preliminary quantitative phytochemical screening of five macrophytes, N. Paravur, Ernakulam, Kerala, India. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 22-27, 2017.
- GOSWAMI, P. C. et al. Water hyacinth as a prospective source of stigmasterol. **Current Science**, v. 52, n. 17, p. 806-808, 1983.
- GOVINDAN, B. et al. Secondary metabolites from the unique bamboo, *Melocanna baccifera*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 1, p. 122-125, 2019.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GUTIÉRREZ-MORALES, A. et al. Anti-staphylococcal properties of *Eichhornia crassipes*,

- Pistacia vera*, and *Ziziphus amole* leaf extracts: Isolates from cattle and rabbits. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 181-189, 2017.
- HAGGAG, M. W.; ABOU EL ELLA, S. M.; ABOUZIENA, H. F. Phytochemical analysis, antifungal, antimicrobial activities and application of *Eichhornia crassipes* against some plant pathogens. **Planta Daninha**, v. 35, p. e017159560, 2017.
- HASABALLAH, A. I. Toxicity of some plant extracts against vector of lymphatic filariasis, *Culex pipiens*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.45, n.1, p. 185 -194, 2015.
- HAMANA, K. et al. Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1114-1120, 1994.
- HEGDE, K. T. et al. Efficacy of bio-agents, botanicals and fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* causing wilt of carnation. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 139-142, 2017.
- HIDALGO, W. et al. Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. **Plant Cell and Environment**, v. 39, n. 3, p. 492-513, 2016.
- HÖLSCHER, D. et al. Monolaterol, the first configuration ally assigned phenylphenalenone derivative with a stereogenic center at C-9, from *Monochoria elata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1614-1617, 2006.
- HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. The biosynthesis of 8 phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. **Phytochemistry**, v. 66, p. 59-64, 2005.
- HÖLSCHER, D., SCHNEIDER, B. Phenalenones from *Strelitzia reginae*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1027-1028, 2000.
- HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. The biosynthetic origin of the central one-carbon unit of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. **Natural Product Letters**, v. 7, p. 177-182, 1995a.
- HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. A diaryl heptanoid intermediate in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 5, p. 525-526, 1995b.
- HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. HPLC-NMR analysis of phenylphenalenones and a stilbene from *Anigozanthos flavidus*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 155-161, 1999.
- HUSSAIN, Z. et al. The long chain alcohols of the *n*-hexane fraction of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): extraction, estimation, GC-MS analysis and antimicrobial

- activity. **Journal of Chemical Society of Pakistan**, v. 37, p. 144-149, 2015.
- JAYANTHI, P.; LALITHA, P. Antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Der Pharma Chemica**, v. 5, p. 135-140, 2013.
- JAYANTHI, P.; LALITHA, P.; AARTHI, N. Larvicidal and pupicidal activity of extracts and fractionates of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say. **Parasitol Research**, v. 111, p. 2129-2135, 2012.
- JAYANTHI, P.; LALITHA, P.; SRIPATHI, S. K. Phytochemical investigation of the extracts of *Eichhornia crassipes* and its solvent fractionates. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 5, p. 1405-1406, 2011.
- JIANG, L. et al. Three new acenaphthene derivatives from rhizomes of *Musa basjoo* and their cytotoxic activity. **Natural Product Research**, v. 35, n. 8, p. 1307-1312, 2021.
- JIN, Z. H. et al. Isolation and identification of extracts of *Eichhornia crassipes* and their allelopathic effects on algae. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, p. 1048-1052, 2003.
- JITSAENG, K.; SCHNEIDER, B. Metabolic profiling of *Musa acuminata* challenged with *Sporobolomyces salmonicolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 84-87, 2010.
- KAMO, T. et al. Phenylphenalenone-type phytoalexins from unripebuñgulan banana fruit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 95-101, 1998.
- KAYATHRI, B.; KANIMOZHI, K.; PANNEERSELVAM, A. Preliminary phytochemical analysis and in vitro investigation of antimicrobial activity of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. Against poultry pathogens. **CIBTech Journal of Microbiology**, v. 4, p. 19-27, 2015.
- KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739-753, 2018.
- KUMAR, G. D.; KARTHIK, M.; RAJAKUMAR, R. *In-silico* antibacterial activity of active phytocompounds from the ethanolic leaves extract of *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. against selected target pathogen *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, p. 12-15, 2018.
- KUMAR G, D.; KARTHIK, M.; R., R. GC-MS analysis of bioactive compounds from ethanolic leaves extract of *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. And their pharmacological activities. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, p. 459-462, 2018.
- KUMAR, S. et al. In vitro antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activity and in vivo effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-

11, 2014.

- LALITHA, P.; SRIPATHI, S. K.; JAYANTHI, P. Secondary metabolites of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth): a review (1949 to 2011). **Natural Product Communications**, v. 7, n. 9, p. 1249-1256, 2012.
- LALITHA, P. T.; JAYANTHI, P. Study of antioxidant activity of ethanolic extract of fresh *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Der Pharmacia Sinica**, v. 3, p. 271-277, 2012.
- LARAIA, L.; ROBKE, L.; WALDMANN, H. Bioactive compound collections: from design to target identification. **Chem**, v. 4, p. 705-730, 2018.
- LATA, N.; DUBEY, V. Quantification and identification of alkaloids of *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 6, p. 1229-1231, 2010.
- LENORA, L. et al. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. – An alternate renewable source for Shikimic acid, a precursor for Tamiflu, a swine flu drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 178-181, 2016.
- LENORA, L. M.; SENTHILKUMAR, N. Insecticidal potential of aquatic alien weed, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms on tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (F.). **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2017.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.
- LI, Q. et al. Removal of Pb, Zn, Cu, and Cd by two types of *Eichhornia crassipes*. **Environmental Engineering Science**, v. 33, n. 2, p. 88-97, 2016.
- LI, X. et al. Synthesis of 2,6-dimethoxy-9-phenyl-1H phenalen-1-one and structural revision of the benzoindenone from *Eichhornia crassipes*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 74, p. 183-189, 2019.
- LI, Z. J. et al. A highly efficient transformation of *cis*- to *trans*-cinnamic acid derivatives by iodine. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 7197-7200, 2015.
- LONE, M. I. et al. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 3, p. 210-220, 2008.
- LUGHADHA, E. N. et al. Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. **Phytotaxa**, v. 272, p. 82-88, 2016.
- LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: Antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani*

- promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1534-1540, 2004.
- MAHANTESH, S. B. et al. In vitro evaluation of fungicides, bioagents and natural plant extracts against early blight caused by *A. solani*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 5, p. 1346-1350, 2017.
- MELIGNANI, E.; FAGGI, A. M.; DE CABO, L. I. Growth, accumulation and uptake of *Eichhornia crassipes* exposed to high cadmium concentrations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 22, p. 22826-22834, 2019.
- MISHRA, S.; MAITI, A. The efficiency of *Eichhornia crassipes* in the removal of organic and inorganic pollutants from waste water: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 7921-7937, 2017.
- MOHAMED, W. A.; MANSOUR, M. M. A.; SALEM, M. Z. M. *Lemna gibba* and *Eichhornia crassipes* extracts: Clean alternatives for deacidification, antioxidation and fungicidal treatment of historical paper. **Journal of Cleaner Production**, v. 219, p. 846-855, 2019.
- MOHAN, J. et al. A review on secondary metabolites, pharmacological status and phytoremediation to treat water hyacinth. **Annals of Plant Sciences**, v. 7, p. 2170-2174, 2018.
- MTEWA, A.; SESAAZI, D. C.; LAMPIAO, F. Structural and *in silico* characterization of small molecules isolated from *Eichhornia crassipes*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.
- NARAIN, S. et al. Cadmium and chromium removal by aquatic plant. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1297-1304, 2011.
- 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.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020b.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Plant endophytes and epiphytes: burgeoning sources of known and “unknown” cytotoxic and antibiotic agents? **Planta Medica**, v. 86, p. 891-905, 2020a.
- NGUYEN, D. M. C. 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.

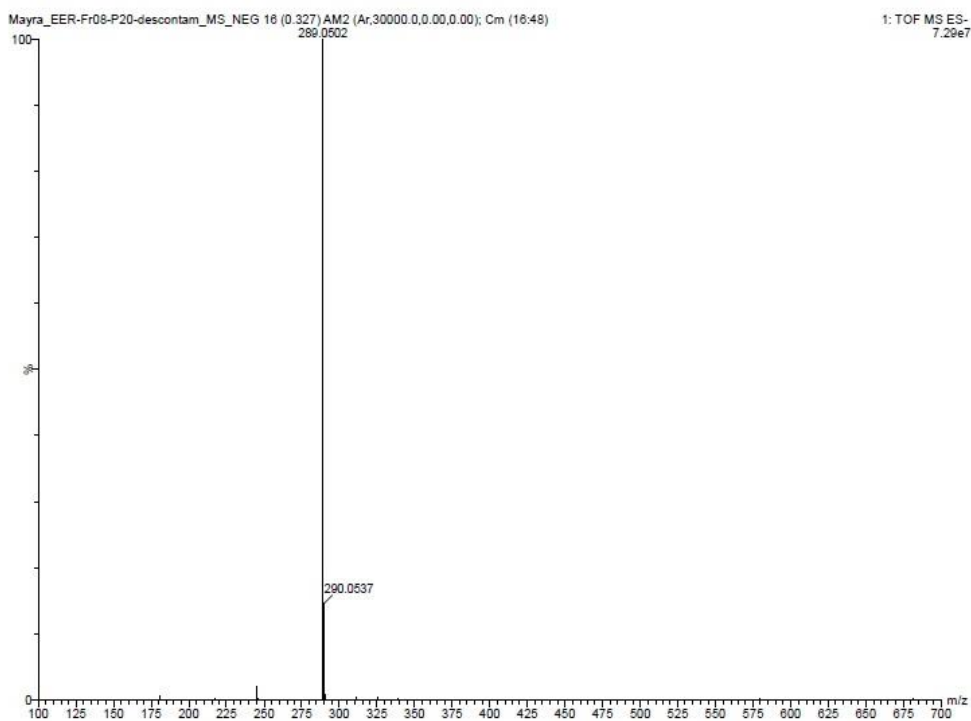
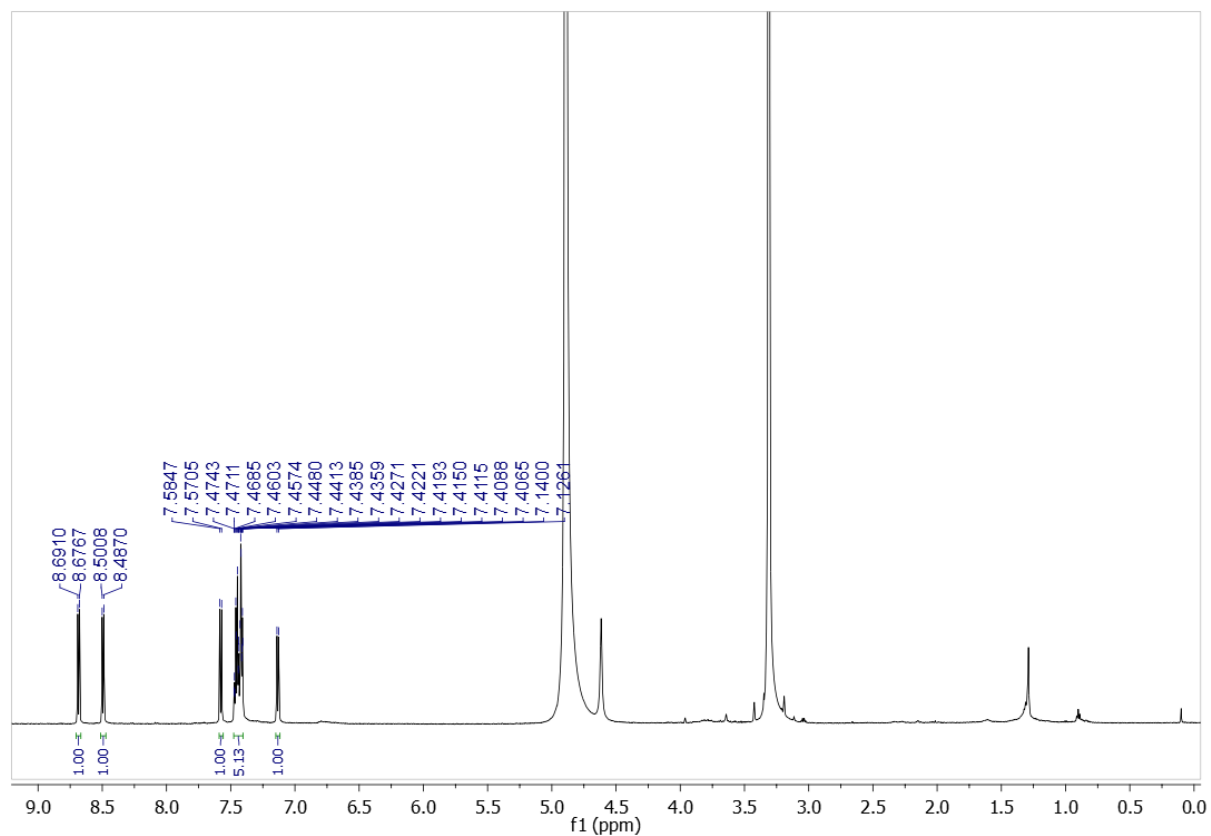
- NIGAM, M. et al. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 491-515, 2019.
- NORMAN, E. O. et al. Distribution, biosynthesis, and biological activity of phenylphenalenone-type compounds derived from the family of plants, Haemodoraceae. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 5, p. 753-768, 2019.
- OLSZEWSKI, T. K.; ADLER, P.; GRISON, C. Bio- based catalysts from biomass issue dafter decontamination of effluents rich in copper – An innovative approach towards greener copper-based catalysis. **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 214, 2019.
- PAL, R. et al. Induction of non-protein thiols and phytochelatins by cadmium in *Eichhornia crassipes*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 8, p. 790-798, 2019.
- PANCHANADIKAR, V. et al. **Beta-carotene enriched extract from water hyacinth *Eichhornia crassipes***. U.S. Patent Application n. 10/811,295, 29 set. 2005.
- PEI, Y. et al. Root exudated algicide of *Eichhornia crassipes* enhances allelopathic effects of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* on green algae. **Hydrobiologia**, v. 823, p. 67-77, 2018.
- PELLEGRINI, M. O. O; HORN, C. N.; ALMEIDA, R. F. Total evidence phylogeny of Pontederiaceae (Commelinales) sheds light on the necessity of its recircumscription and synopsis of *Pontederia* L. **PhytoKeys**, v. 108, p. 25-83, 2018.
- PIÃO, P. S.; LOPES, L. M. X.; 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. **Anais...**2010.
- PILON, A. C. et al. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020
- POORANI, T. R. et al. Formulation of *Eichhornia crassipes* derived lutein: coconutoil micro-emulsion for sustained ophthalmic drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, p. 4159-4171, 2017.
- POOT, V. J; POTT, A. **Plantas Aquáticas do Pantanal**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 404 p.
- PRABAKARAN, A. S.; MANI, N. Analysis of bioactive compounds in *Eichhornia crassipes* leaf extract using GC MS technique. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, p. 809-813, 2017.
- PRAJAPATI, S. K.; MERAVIDI, N.; SINGH, S. Phytoremediation of chromium and cobalt using *Pistia stratiotes*: A sustainable approach. **Proceedings of International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 136-138, 2012.

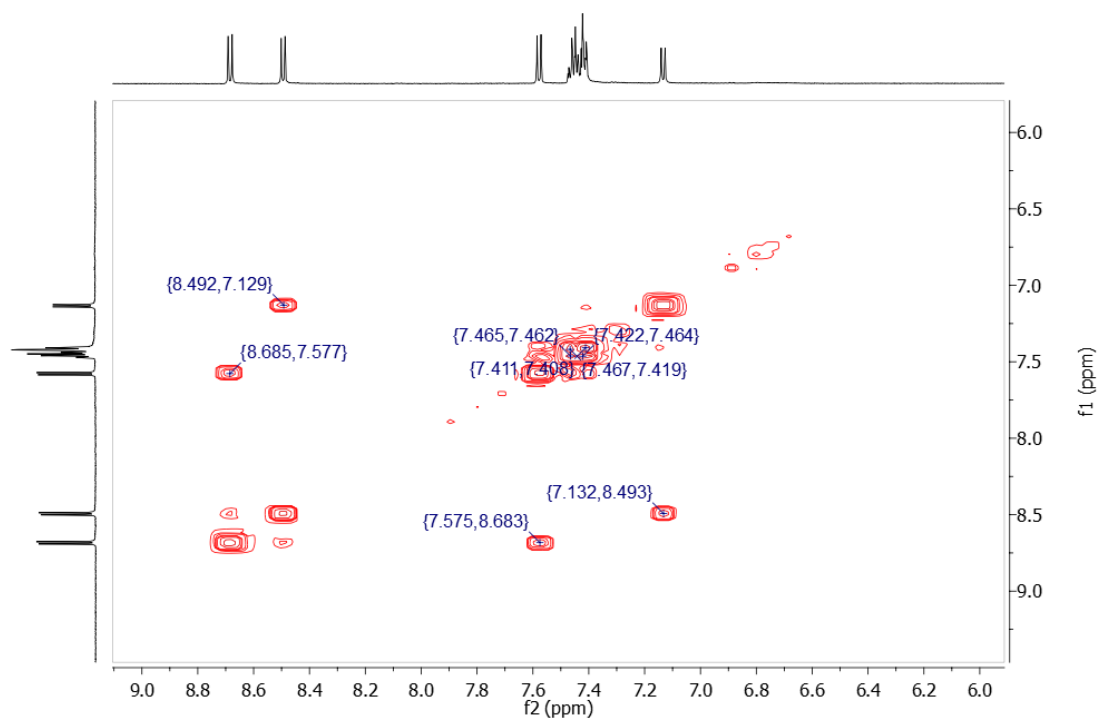
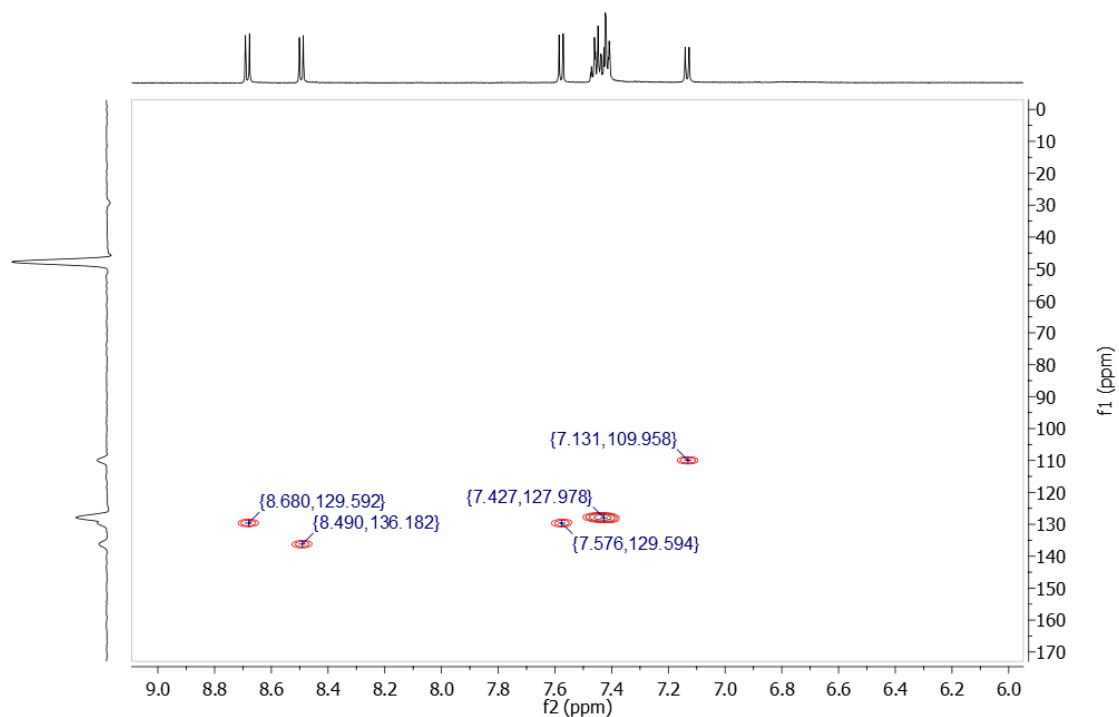
- RAI, P. K.; SINGH, M. M. *Eichhornia crassipes* as a potential phytoremediation agent and an important bioresource for Asia Pacific region. **Environmental Skeptics and Critics**, v. 5, n. 1, p. 12-19, 2016.
- REA, A. et al. Soultamarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2013.
- REN, Q. et al. Organic acids from *Capparis spinosa* fruit. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 5, p. 868-869, 2012.
- ROMERO-HERNÁNDEZ, J. A. et al. Tolerance and hyperaccumulation of a mixture of heavy metals (Cu, Pb, Hg, and Zn) by four aquatic macrophytes. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 2017.
- RUI, P. et al. Polar and lipophilic extracts characterization of roots, stalks, leaves and flowers of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), and insights for its future valorization. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1033-1038, 2015.
- SAIKIA, B.; BORAH, P. A new avenue to Dakin reaction in H₂O₂–WERSA. **RSC Advance**, v. 128, p. 1-5, 2015.
- SALUM, M. L.; ROBLES, C. J.; ERRA-BALSELLS, R. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: One-pot synthesis-isolation of Z-cinnamic acids. **Organic Letters**, v. 12, n. 21, p. 4808-4811, 2010.
- SATURNO, J. O. et al. Antibacterial activity of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) extracts against *Aeromonas hydrophila* *in-vitro* and *in-vivo*. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences (IJBPAS)**, v. 8, n. 1, p. 65-72, 2019.
- SEKOMO, C. B. et al. Heavy metal removal by combining an aerobic upflow packed bed reactors with water hyacinth ponds. **Environmental Technology**, v. 33, n. 12, p. 1455-1464, 2012.
- SHANAB, S. M. M. et al. Allelopathic effects of water hyacinth [*Eichhornia crassipes*]. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13200, 2010.
- SILVA, R. P. et al. Polar and lipophilic extracts characterization of roots, stalks, leaves and flowers of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), and insights for its future valorization. **Industrial Crops & Products**, v. 76, p. 1033-1038, 2015.
- SINGH, K. S. et al. Stigmasterol from *Eichhornia crassipes* (Water hyacinth): isolation, characterization and X-ray structure. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, p. 3028-3030, 2015.
- SRICOTH, T. et al. Aquatic plants for phytostabilization of cadmium and zinc in hydroponic

- experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 15, p. 14964-14976, 2018.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- SUN, W. H. et al. Allelochemicals from root exudates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Acta Phytophysiologica Sinica** v. 19, p. 92-96, 1993.
- TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.
- TAN, D. X. et al. Novel rhythms of N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 1724-1729, 2007.
- THAKUR, S. et al. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 4, p. 206, 2016.
- THOMAZ, S. M.; DA CUNHA, E. R. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 2, p. 218-236, 2010.
- THORAT, L. J.; NATH, B. B. Effects of water hyacinth *Eichhornia crassipes* root extracts on midge *Chironomus ramosus* larvae: a preliminary note. **Physiological Entomology**, v. 35, p. 391-393, 2010.
- TIAN, X. et al. Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents of *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Natural Product Research**, v. 32, n. 3, p. 354-357, 2018.
- TOKI, K. et al. (Delphinidin-3-gentiobiosyl) (Apigenin 7-glucosyl) malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1181-1183, 1994.
- TOKI, K. et al. (Delphinidin 3-Gentiobiosyl) (Luteorin 7-Glucosyl) malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Heterocycles**, v. 63, n. 4, p. 899-902, 2004.
- TYAGI, T.; AGARWAL, M. Antioxidant properties and phenolic compounds in methanolic extracts of *Eichhornia crassipes*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 11, n. 2, p. 85-89, 2017a.
- TYAGI, T.; AGARWAL, M. Ethnomedicine analysis of bioactive constituents in ethanolic leaf extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms by GC-MS.

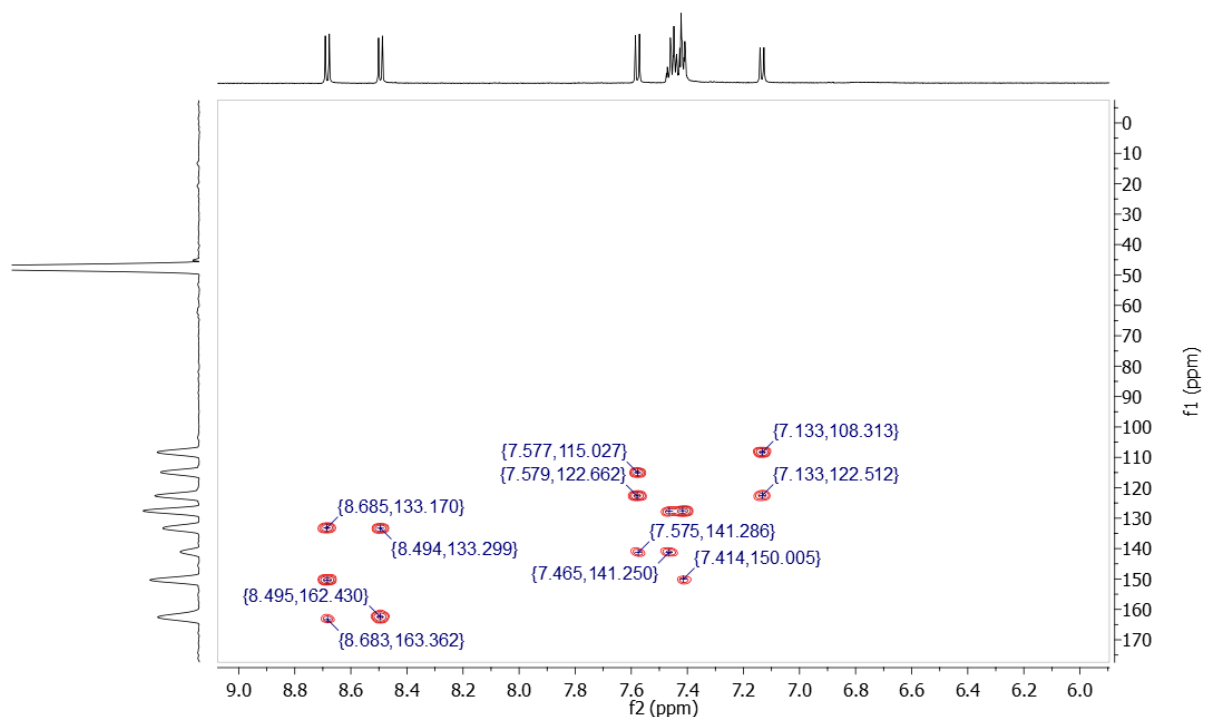
- Advances in BioResearch**, v. 8, p. 204-211, 2017b.
- USHARANI, P.; AKKEWAR, D.M.; MURTHY, J. M.; DEVANAND, P. **A process of isolation of an insecticidal compound 2-propylpiperidine from the roots of aquatic weed, water hyacinth**. Depositante: Council of Scientific & Industrial Research, India. IN 2008DE00834. Depósito: 31 mar. 2008. Concessão: 16 abril 2010.
- VASU, K. et al. Biomolecular and phytochemical analyses of three aquatic angiosperms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 8, p. 418-421, 2009.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, n. 4, p. 759-776, 2009.
- WANG, M. Z.; CAI, X. H.; LUO, X. D. New phenylphenalene derivatives from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 61-66, 2011.
- WANG, Y. et al. Preparation of indole-phosphineoxazoline (IndPHOX) ligands and their application in allylic alkylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 19, p. 2376-2384, 2010.
- WANG, Z.; ZHENG, F.; XUE, S. The economic feasibility of the valorization of water hyacinth for bioethanol production. **Sustainability**, v. 11, p. 905, 2019.
- WU, H. M. et al. A novel steroid from *Eichhornia crassipes*. **Chinese Chemical Letters**, v. 2, p. 509-512, 1991.
- WU, X. et al. Allelopathic effects of *Eichhornia crassipes* on the growth of *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, p. 1400-1406, 2012.
- YANG, X. E. et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum fredii* Hance). **Plant and Soil**, v. 259, n. 1-2, p. 181-189, 2004.
- YANG, S. Y. et al. Isolation and identification of anti-algal compounds from root system of water hyacinth. **Acta Phytobiologica Sinica** v. 18, p. 399-402, 1992.
- ZHANG, Y. et al. Isolation, purification and identification of two antioxidant peptides from water hyacinth leaf protein hydrolysates (WHLPH). **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 1, p. 83-96, 2018.

APÊNDICE

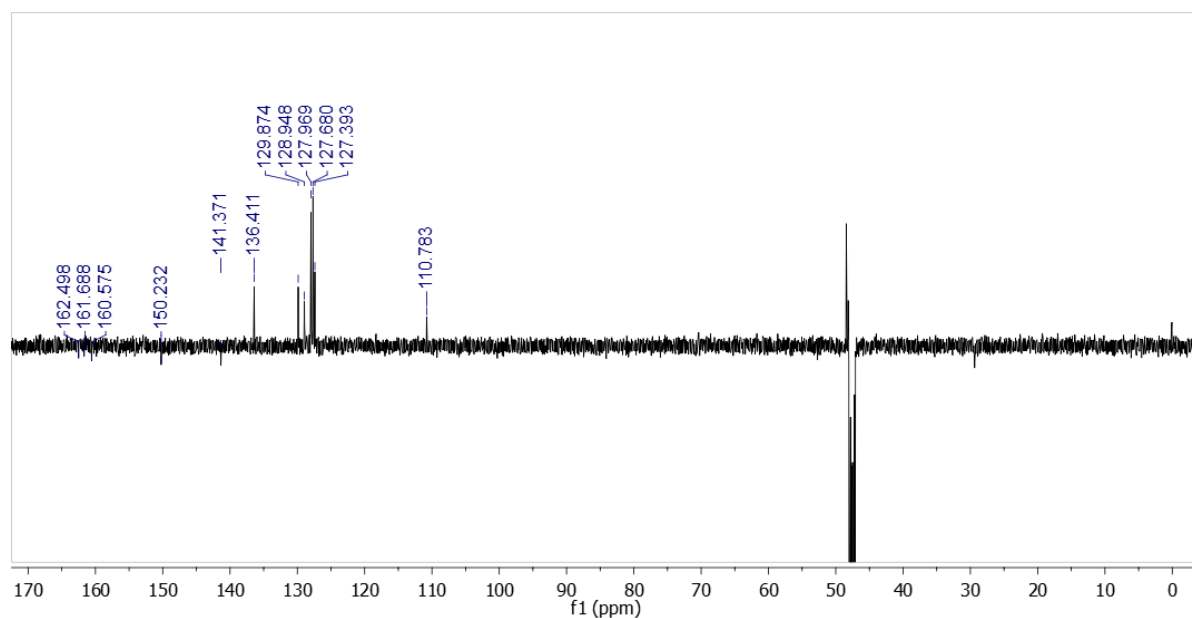
APÊNDICE 1 - Espectro de massas de alta resolução, no modo negativo, da substância **I** (ESI-QTOF, 7,29 eV)APÊNDICE 2 - Espectro de RMN de ^1H de **I** (CD_3OD , 14,1 T)

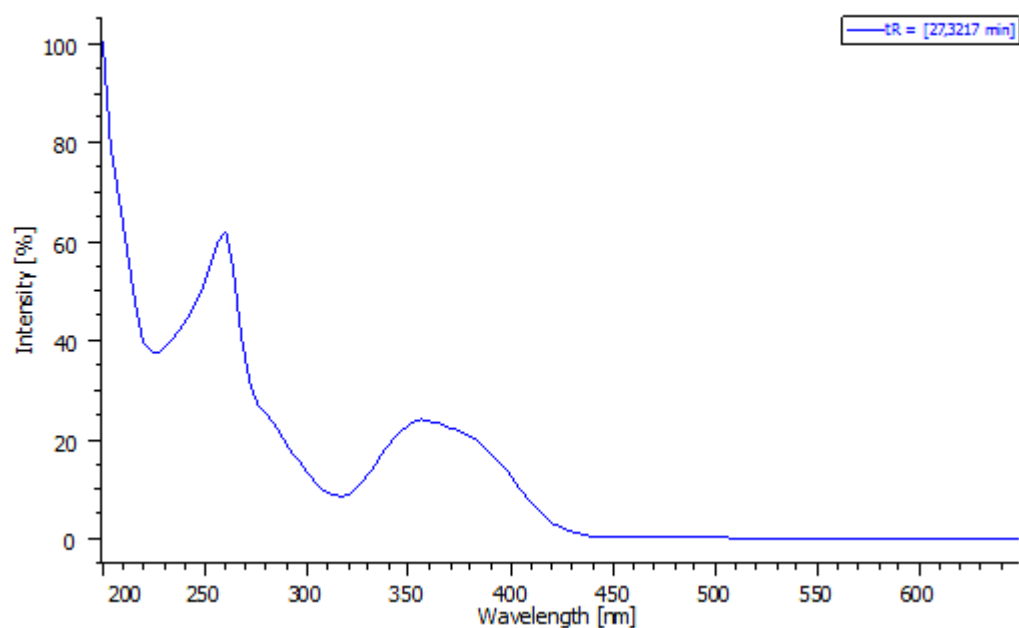
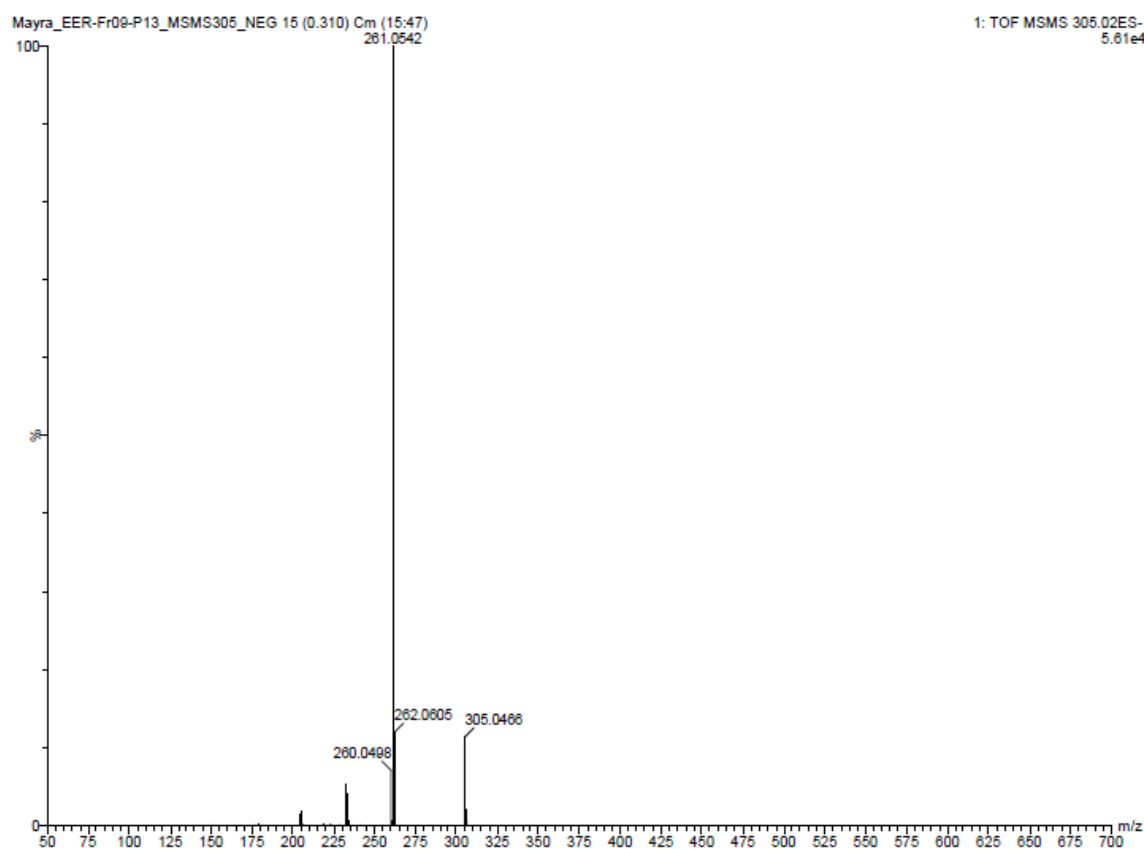
APÊNDICE 3 - Mapa de contornos COSY ampliado de **I** (CD₃OD, 14,1 T)**APÊNDICE 4** - Mapa de contornos HSQC ampliado de **I** (CD₃OD, 14,1 T)

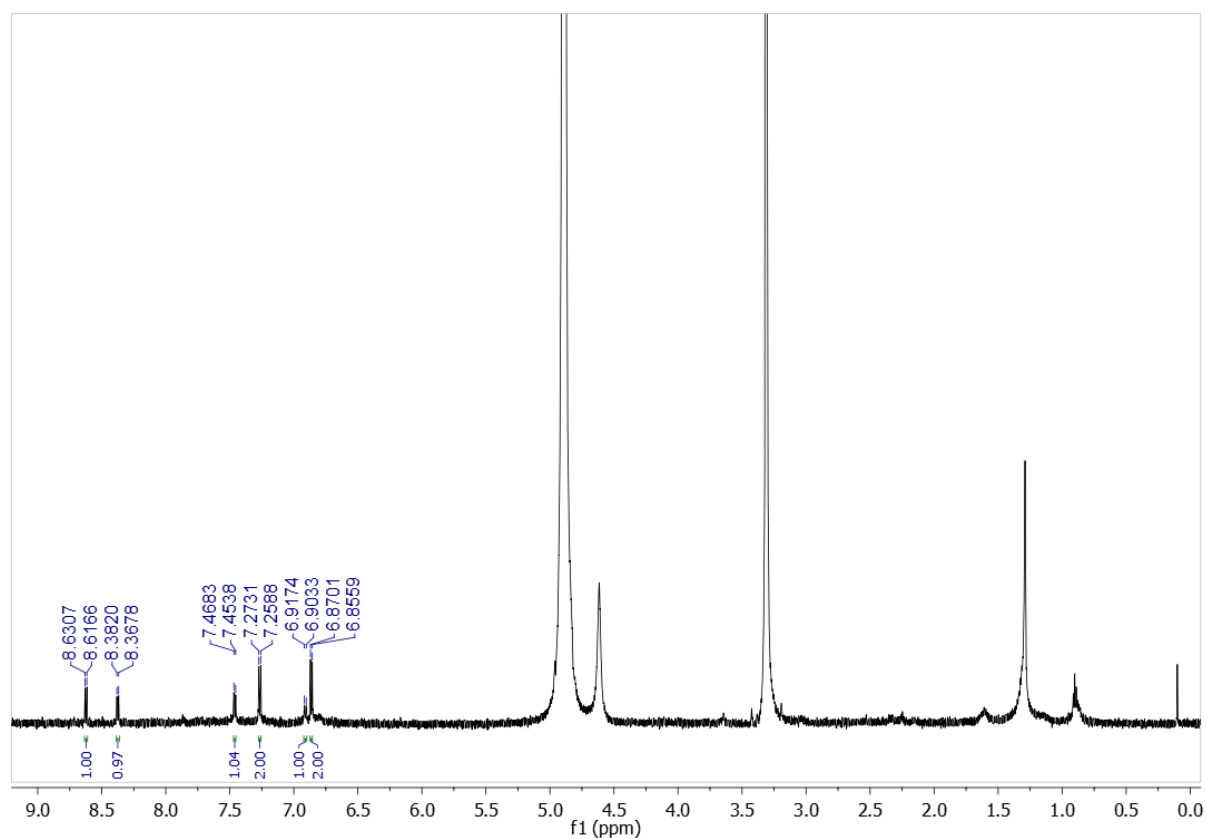
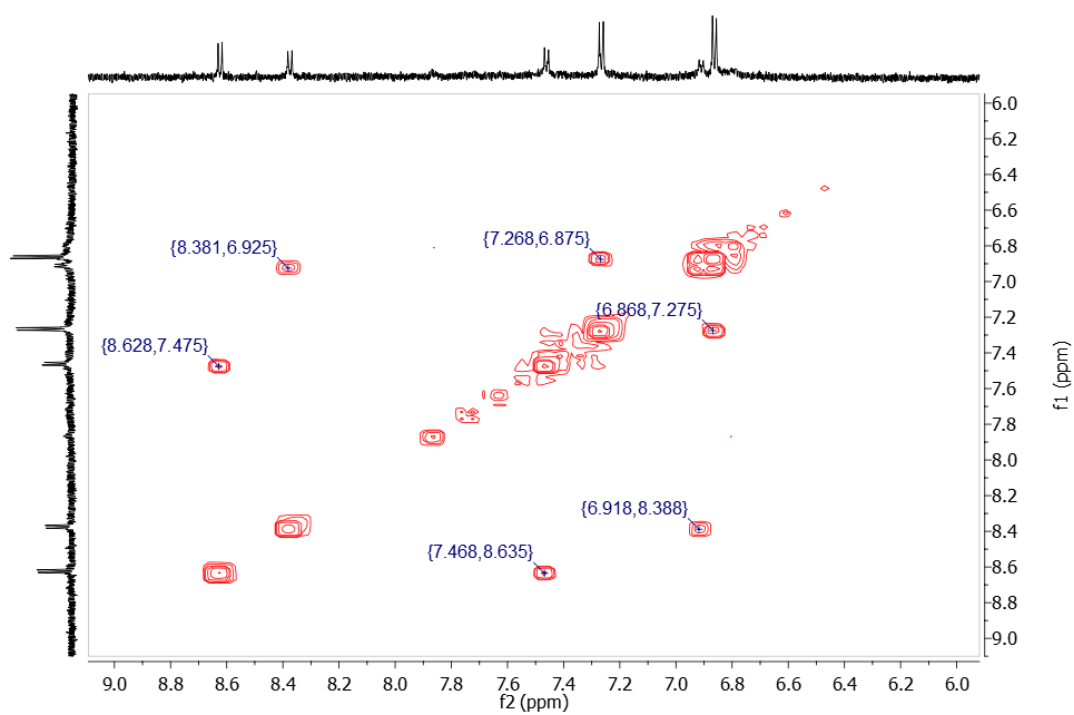
APÊNDICE 5 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **I** (CD₃OD, 14,1 T)

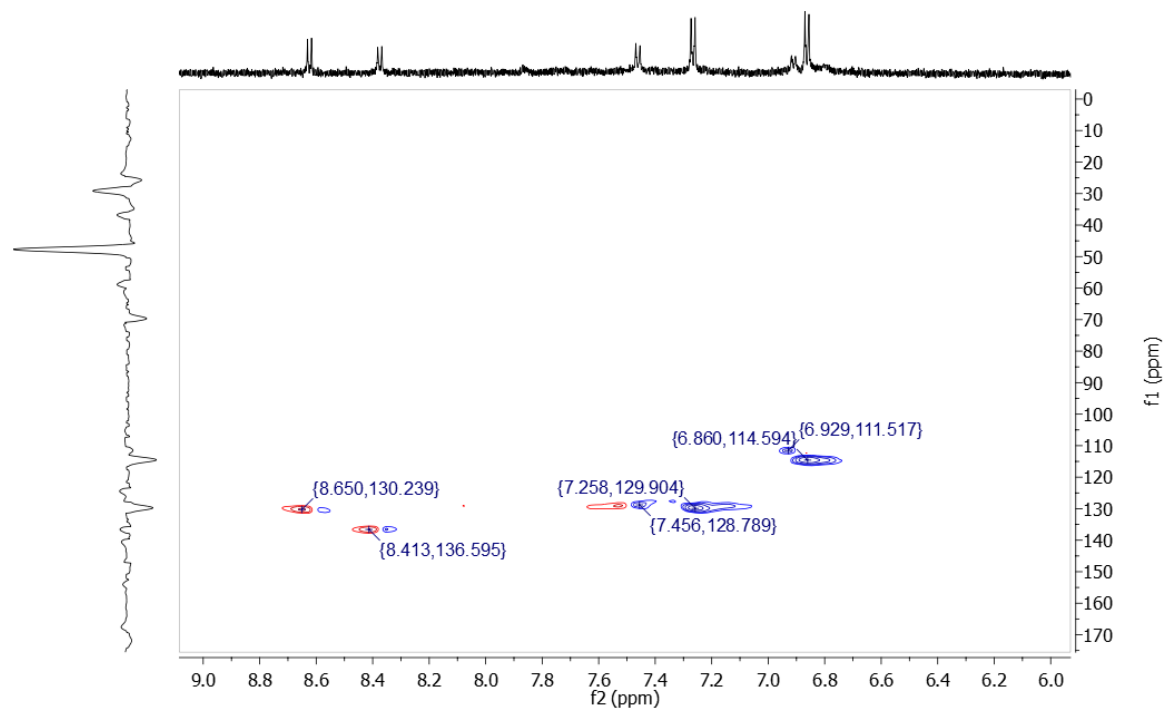
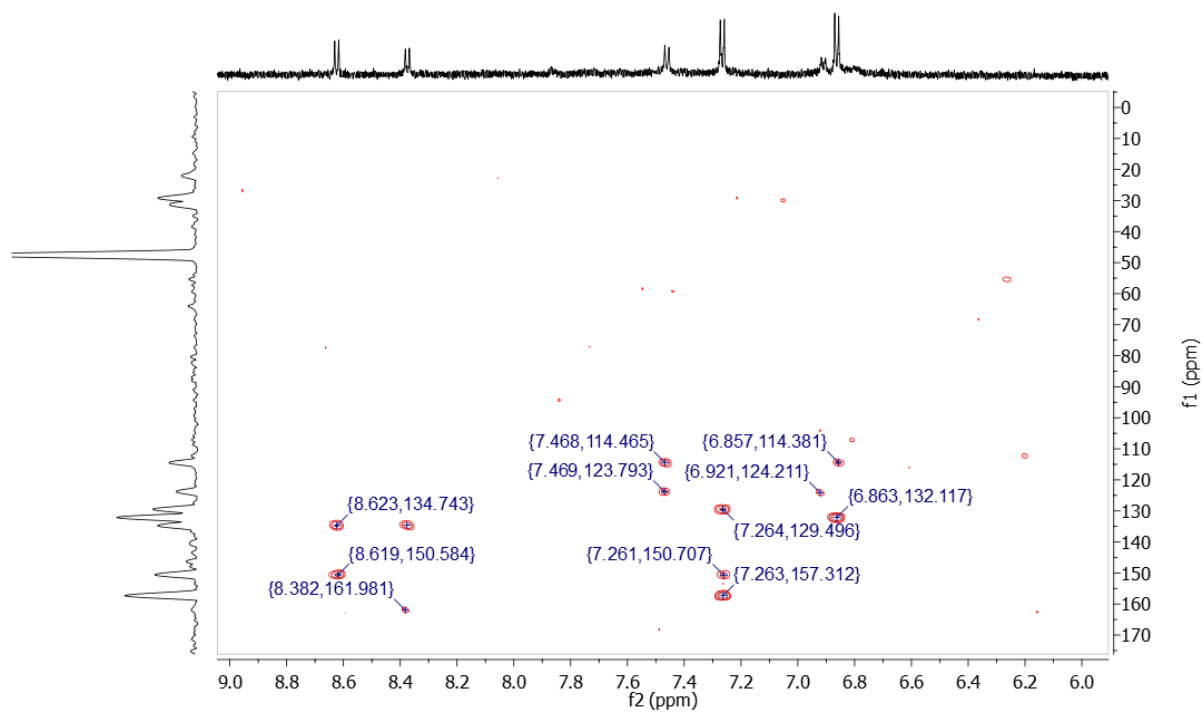


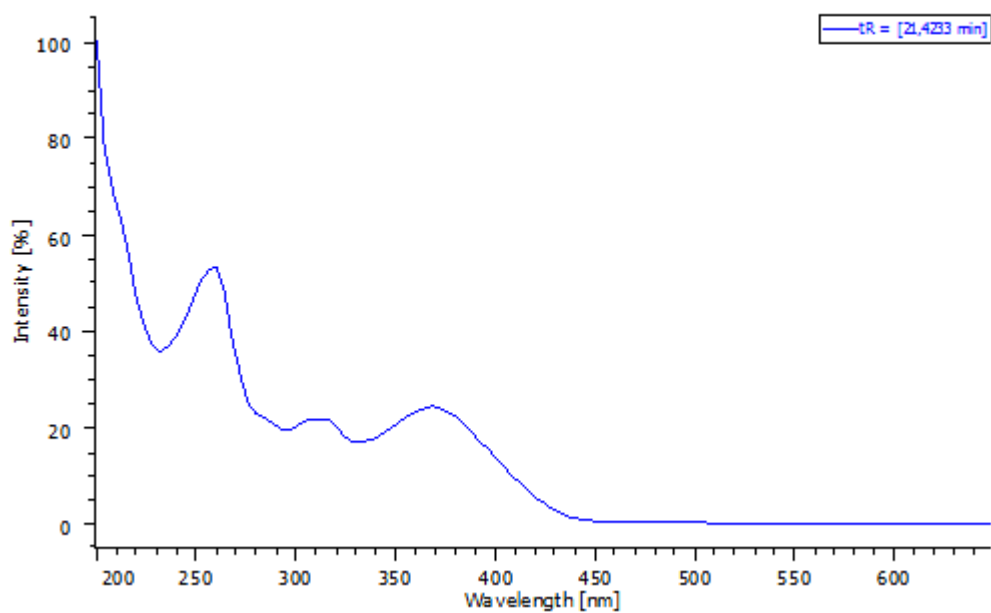
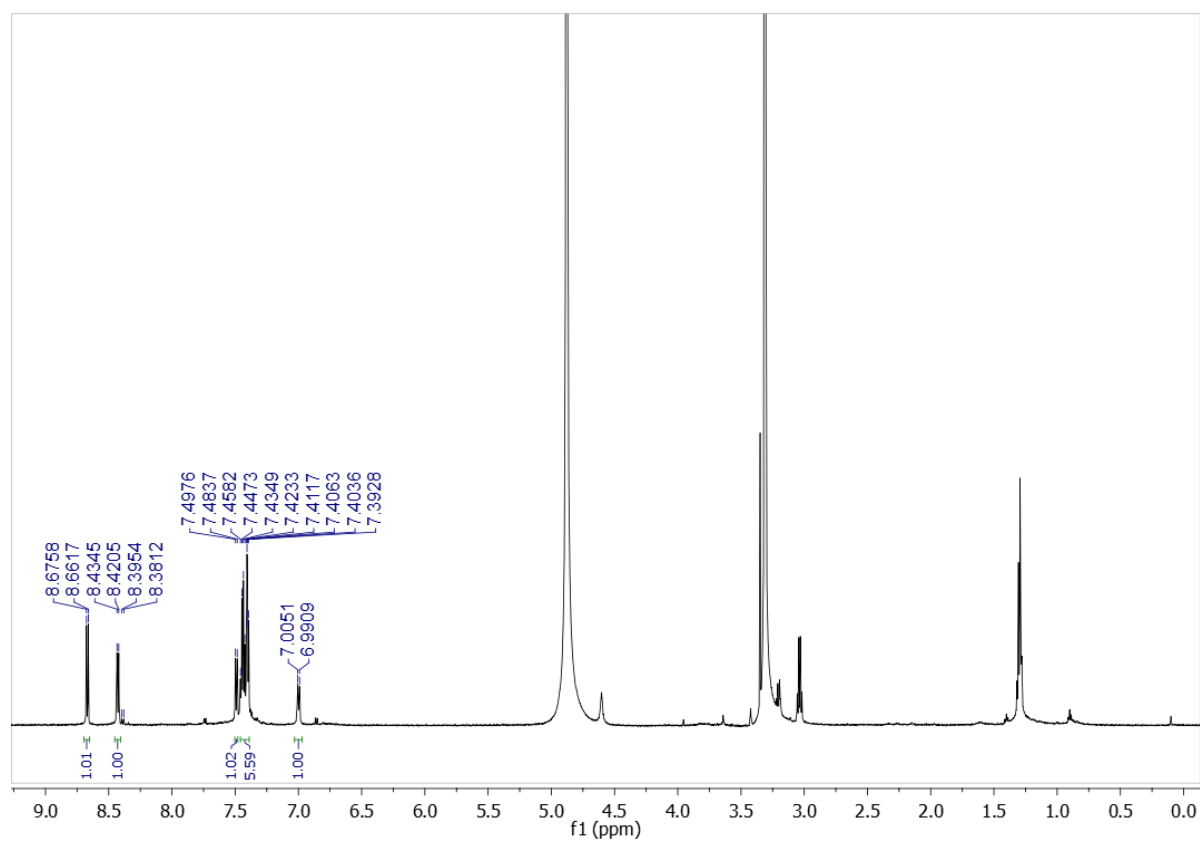
APÊNDICE 6 - Espectro de ¹³C (DEPTQ) de **I** (CD₃OD, 14,1 T)

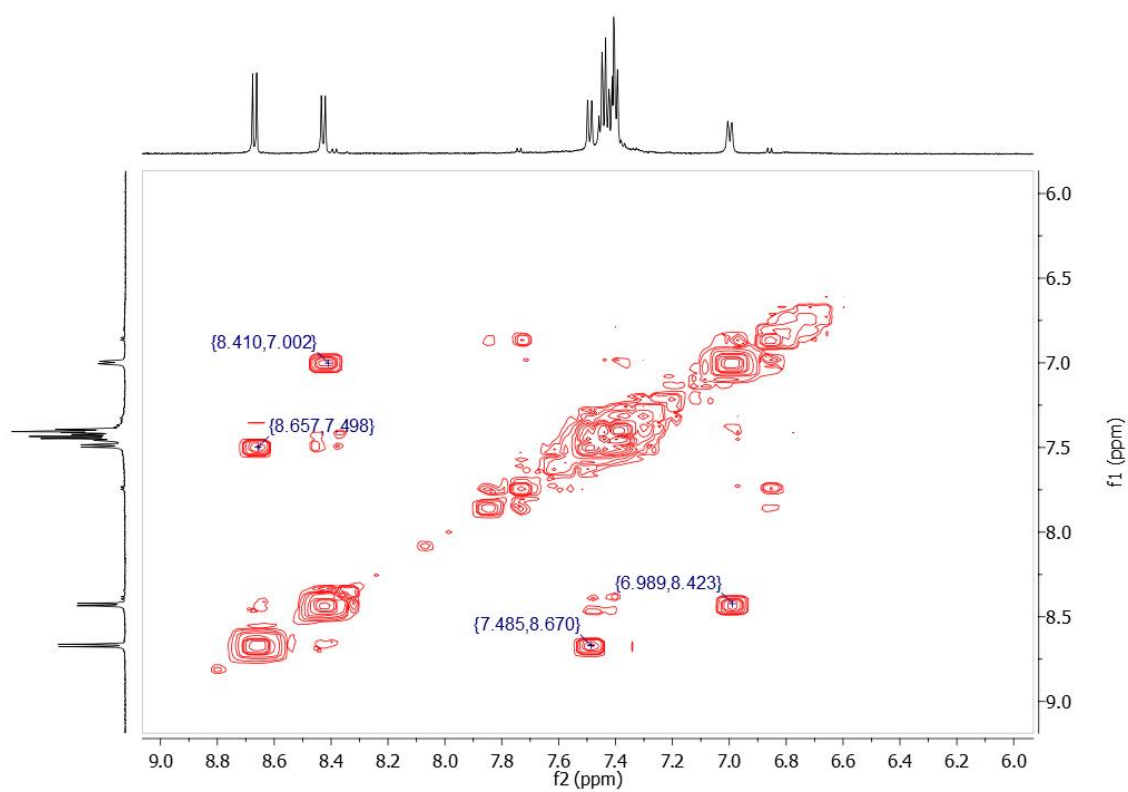
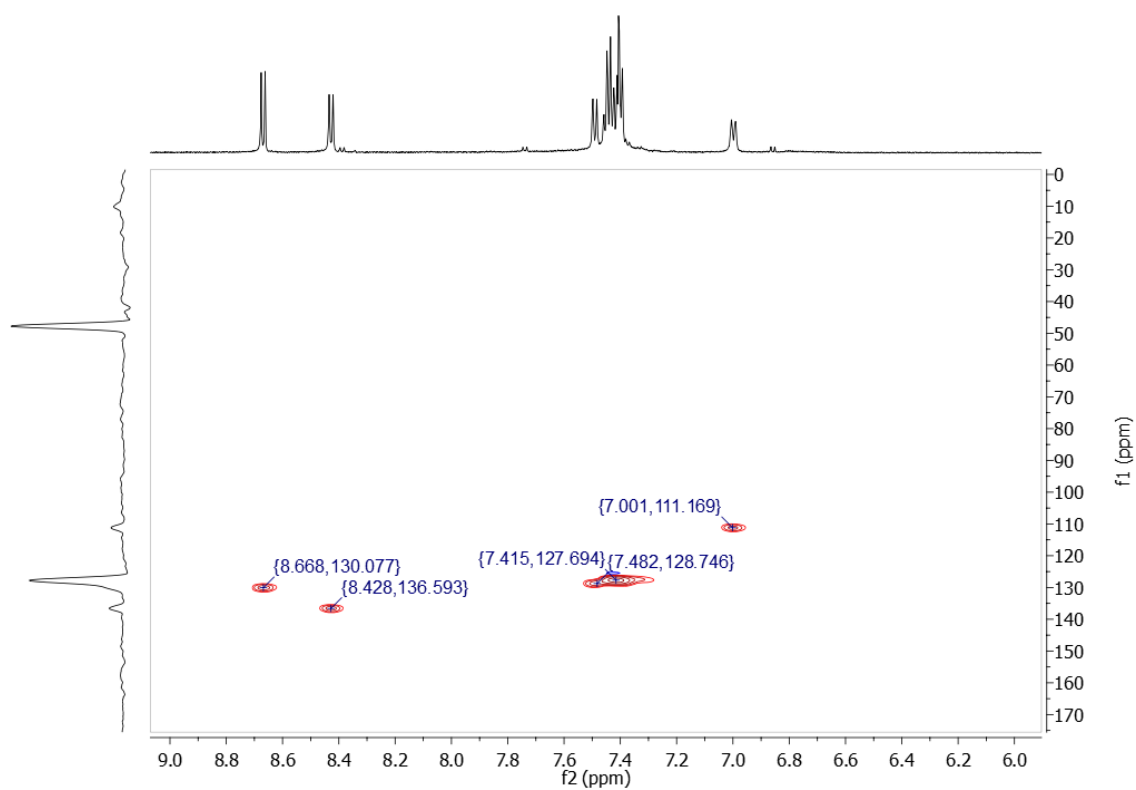


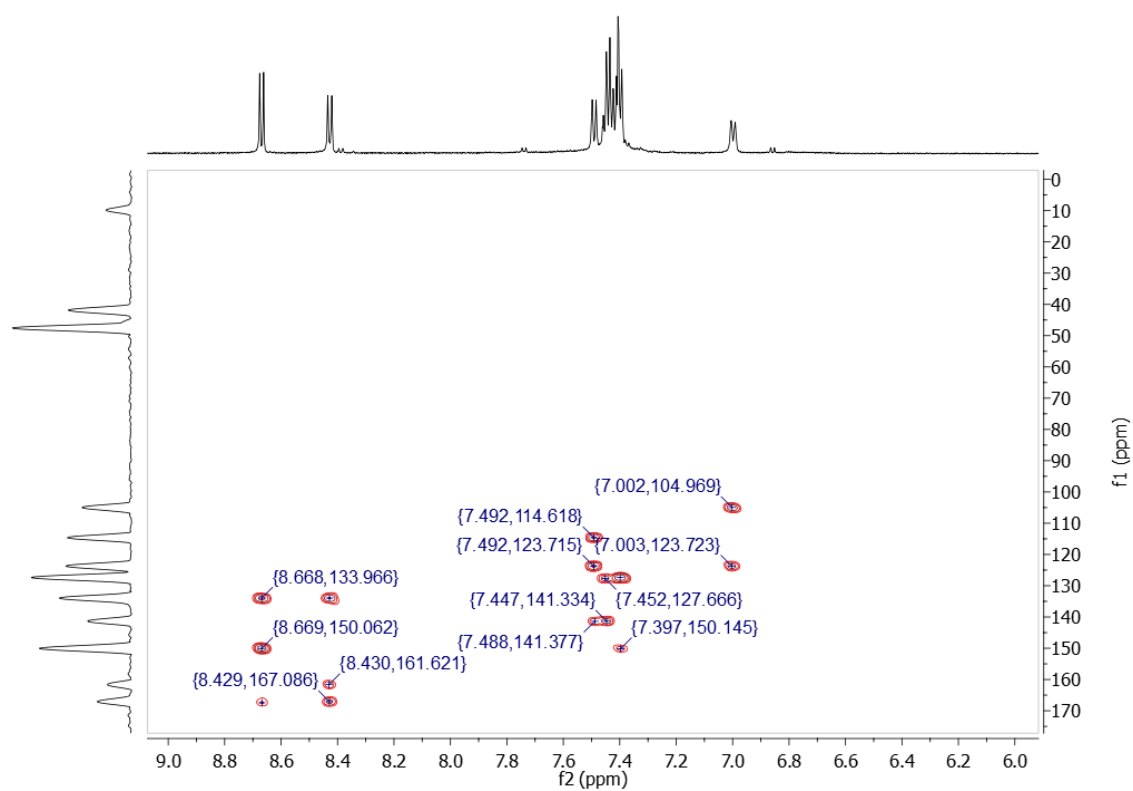
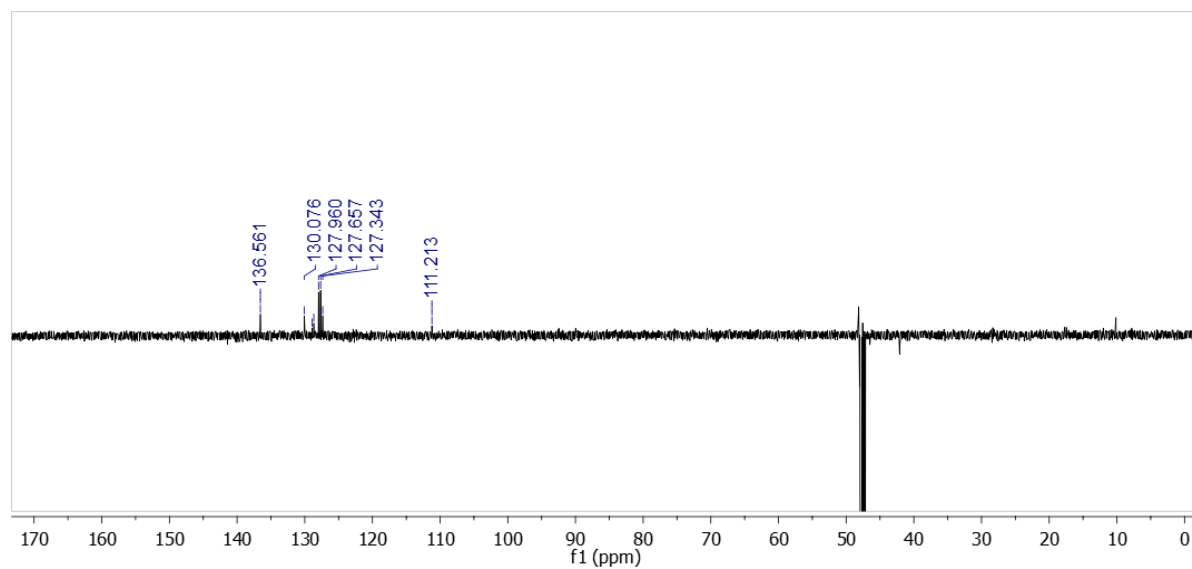
APÊNDICE 7 - Espectro de UV de **I** obtido por CLAE-DAD ($\lambda = 204, 260, 362$ nm)**APÊNDICE 8** - Espectro de massas de alta resolução, no modo negativo, da substância **II** (ESI-QTOF, 5,61 eV)

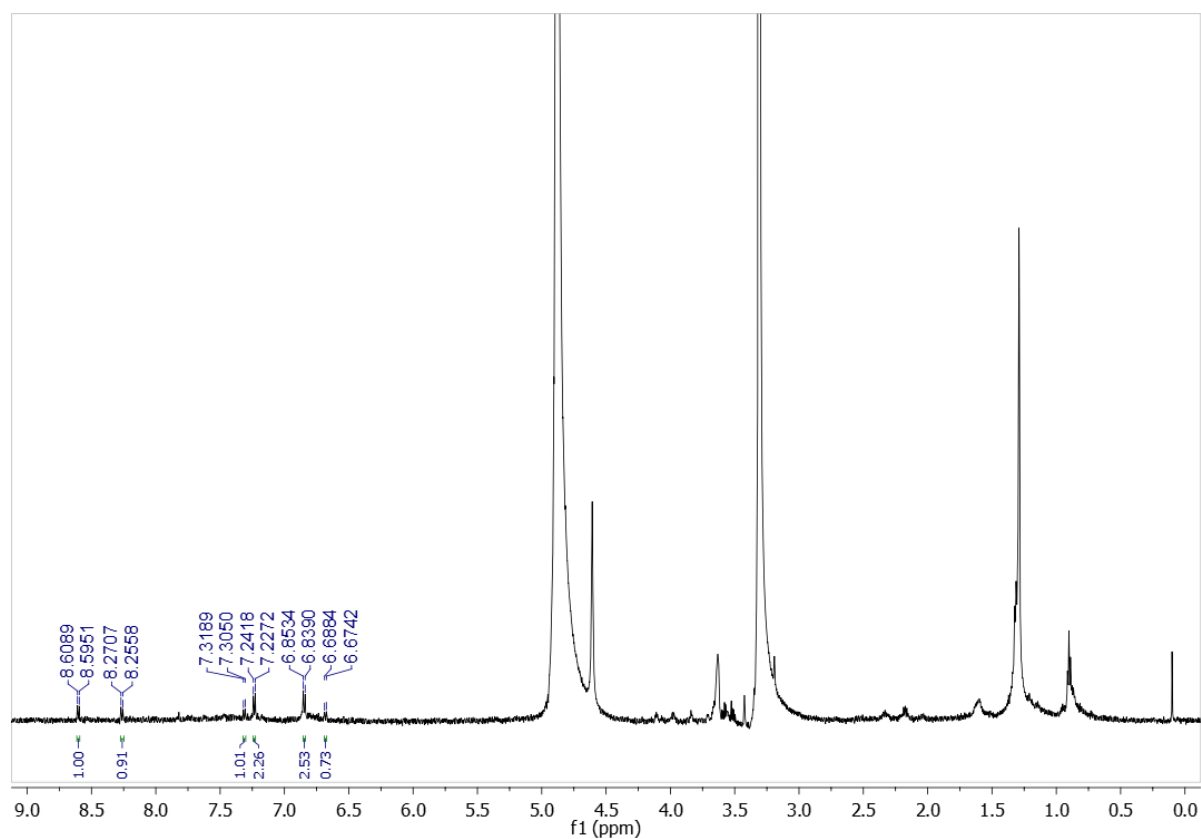
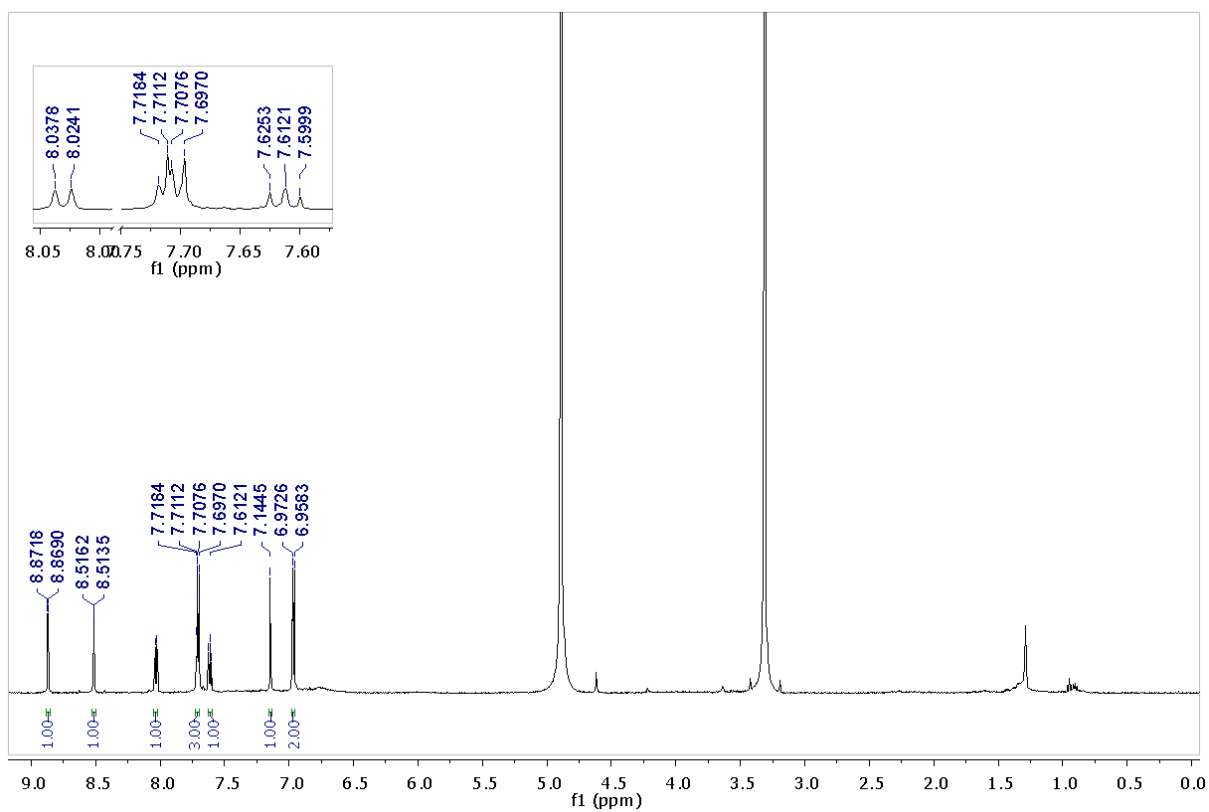
APÊNDICE 9 - Espectro de RMN de ^1H de **II** (CD_3OD , 14,1 T)APÊNDICE 10 - Mapa de contornos COSY ampliado de **II** (CD_3OD , 14,1 T)

APÊNDICE 11 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **II** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 12 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **II** (CD₃OD, 14,1 T)

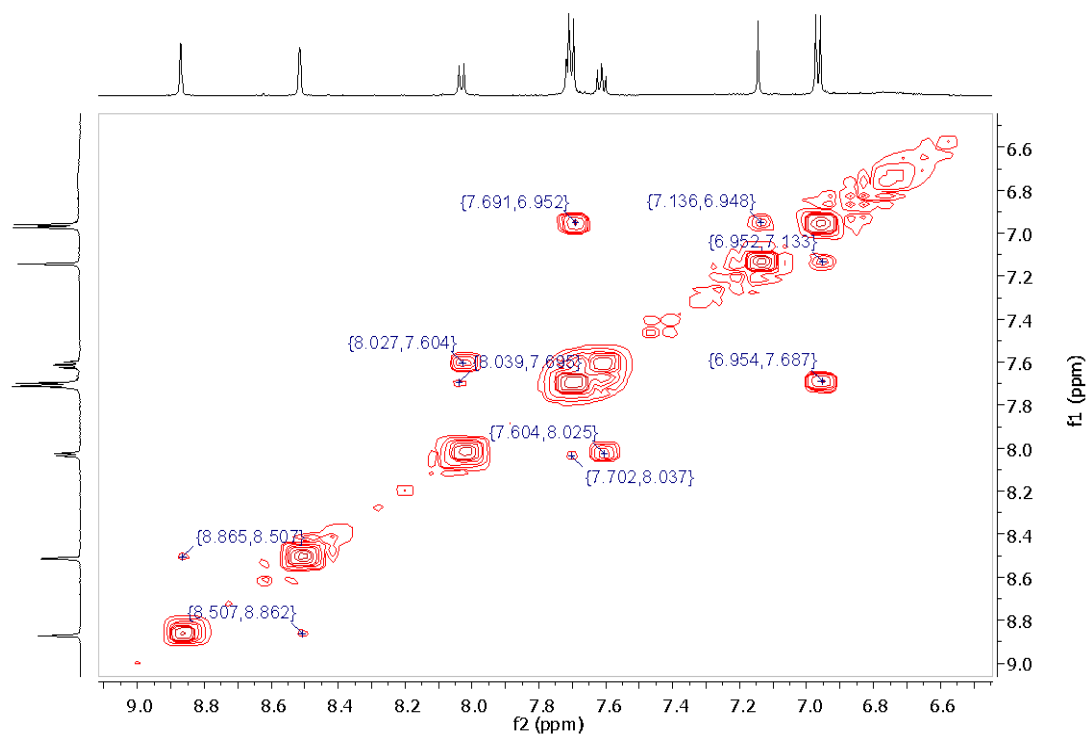
APÊNDICE 13 - Espectro de UV de **II** obtido por CLAE-DAD ($\lambda = 205, 260, 311, 370$ nm)**APÊNDICE 14** - Espectro de RMN de ^1H de **Ia** (CD_3OD , 14,1 T)

APÊNDICE 15 - Mapa de contornos COSY ampliado de **Ia** (CD₃OD, 14,1 T)**APÊNDICE 16** - Mapa de contornos HSQC ampliado de **Ia** (CD₃OD, 14,1 T)

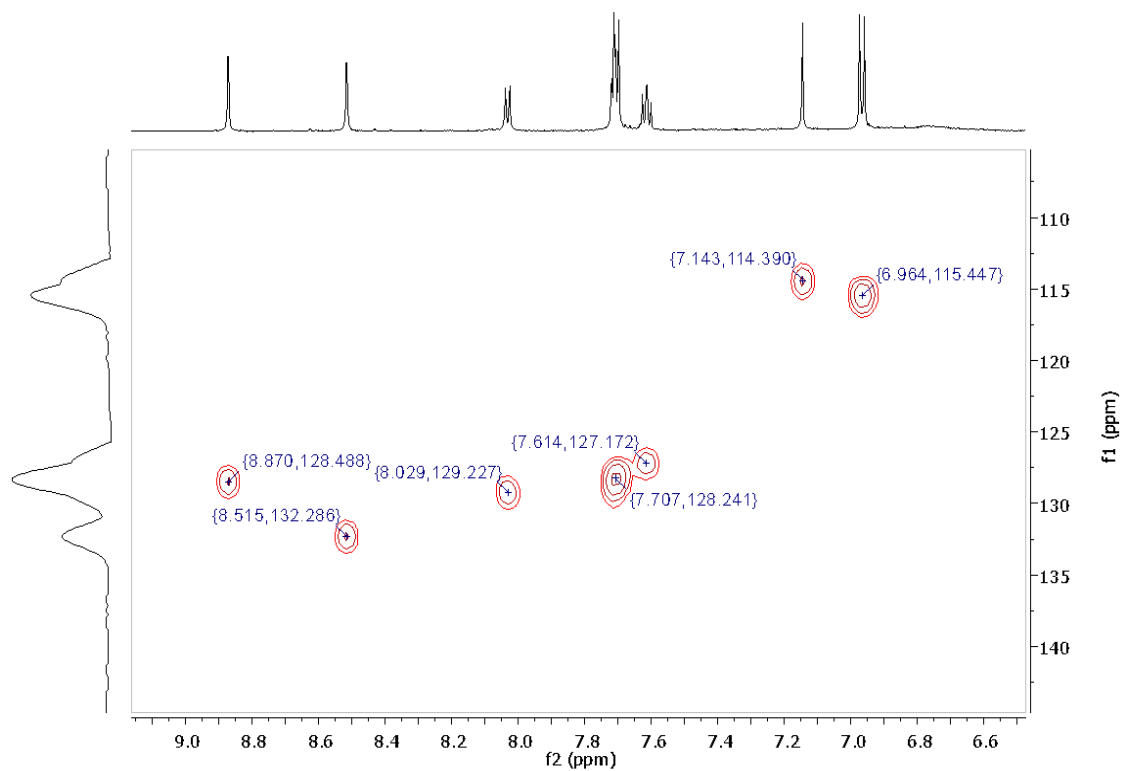
APÊNDICE 17 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **Ia** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 18 - Espectro de ¹³C (DEPTQ) de **Ia** (CD₃OD, 14,1 T)

APÊNDICE 19 - Espectro de RMN de ^1H de **IIa** (CD_3OD , 14,1 T)APÊNDICE 20 - Espectro de RMN de ^1H de **III** (CD_3OD , 14,1 T)

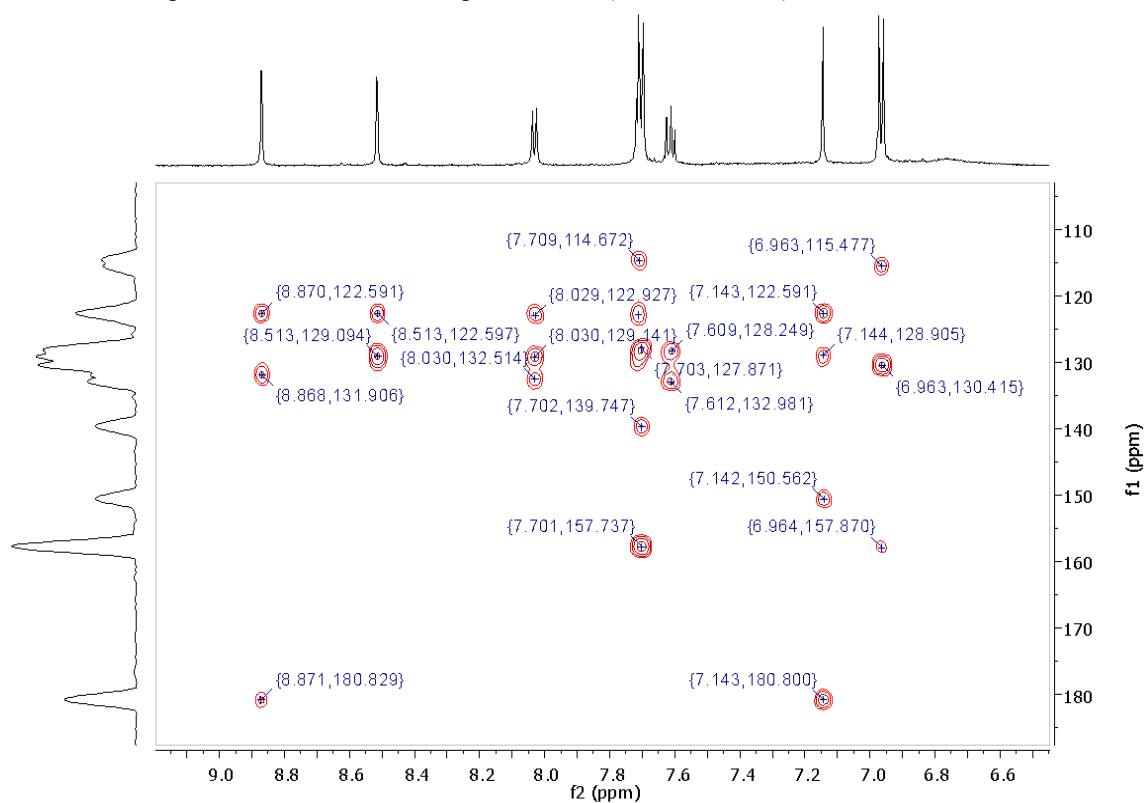
APÊNDICE 21 - Mapa de contornos COSY ampliado de **III** (CD₃OD, 14,1 T)



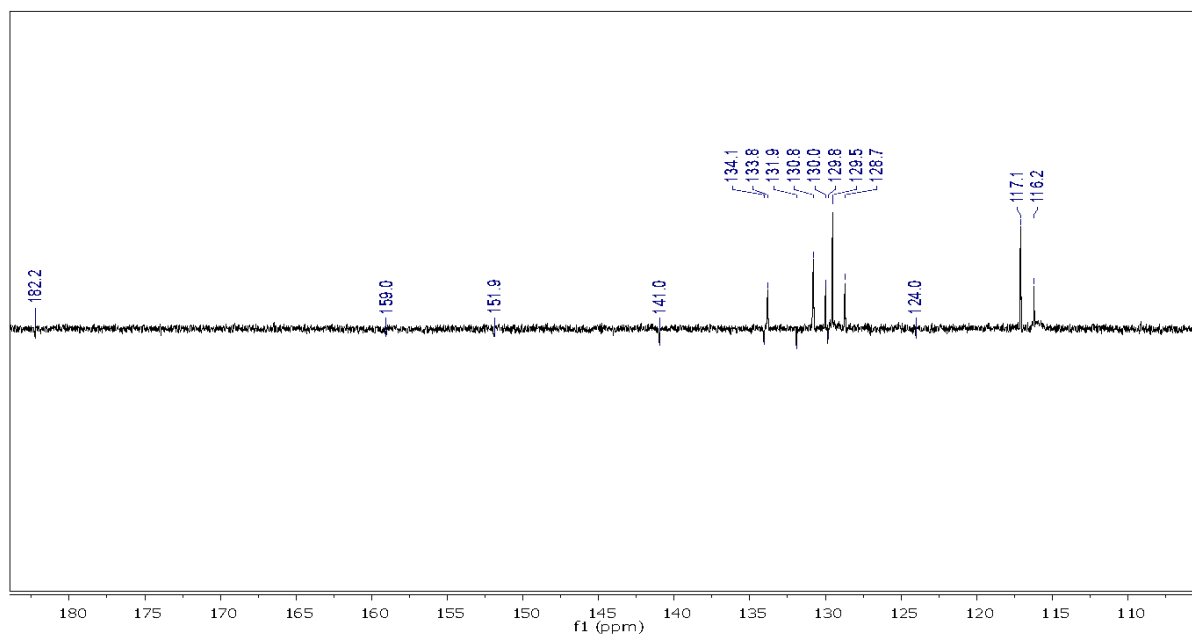
APÊNDICE 22 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **III** (CD₃OD, 14,1 T)



APÊNDICE 23 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **III** (CD₃OD, 14,1 T)



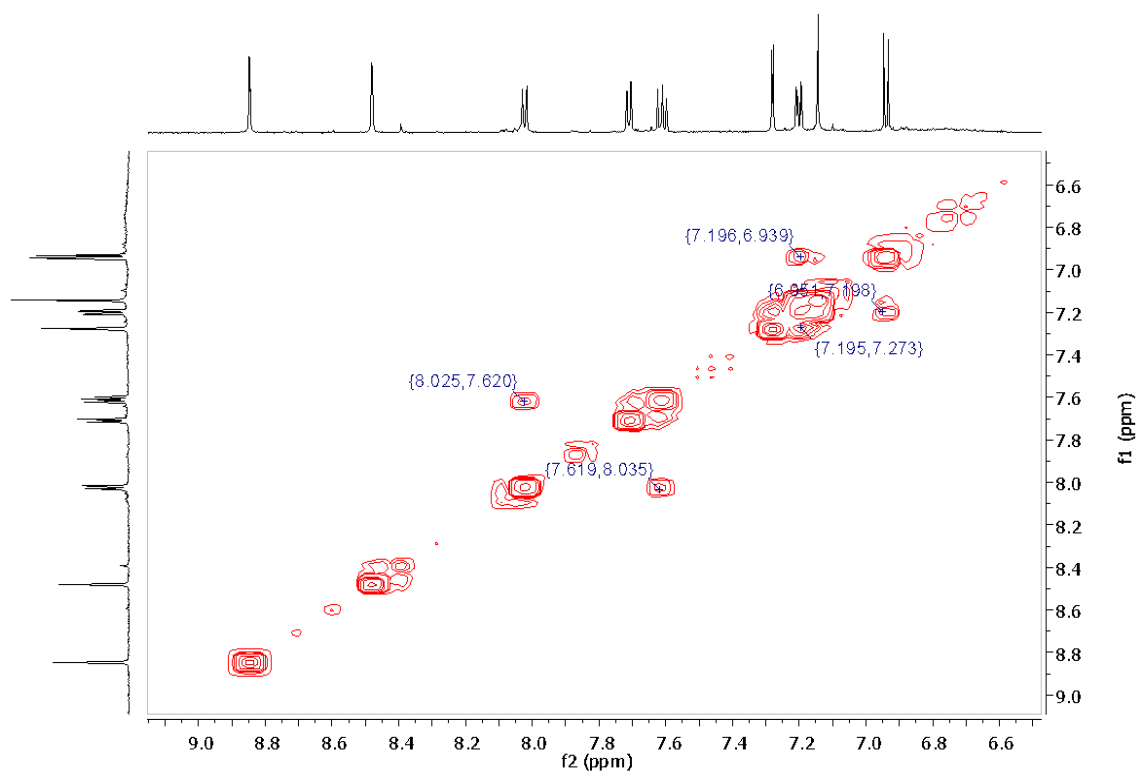
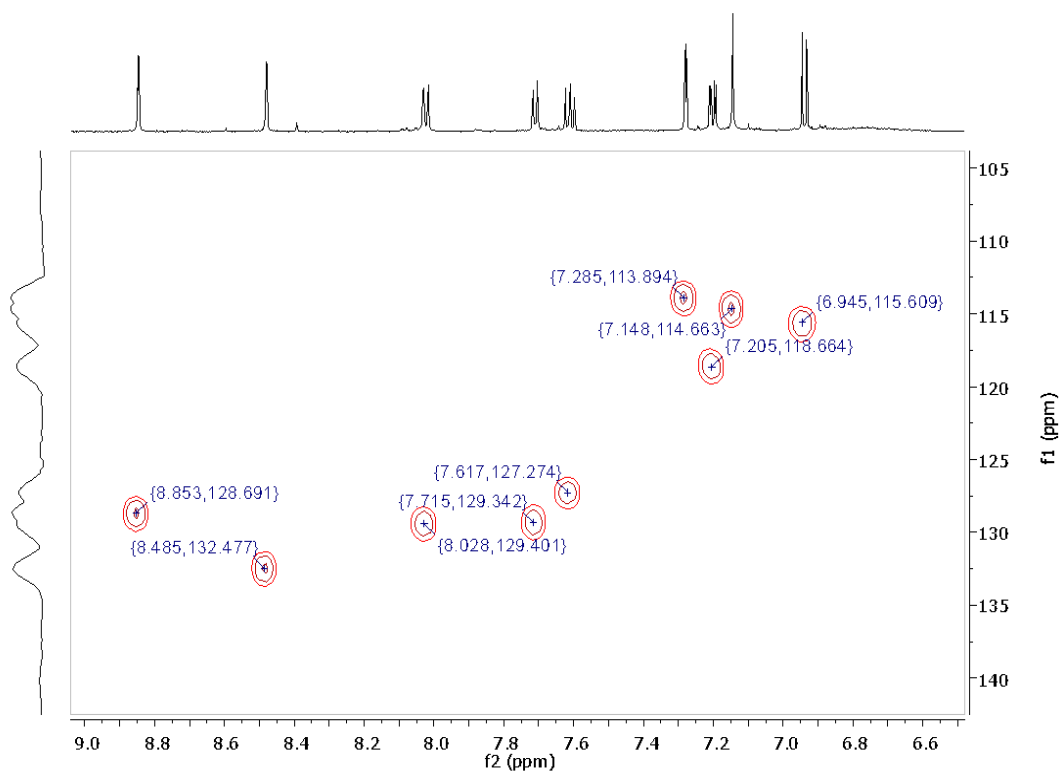
APÊNDICE 24 - Espectro de ¹³C (DEPTQ) de **III** (CD₃OD, 14,1 T)



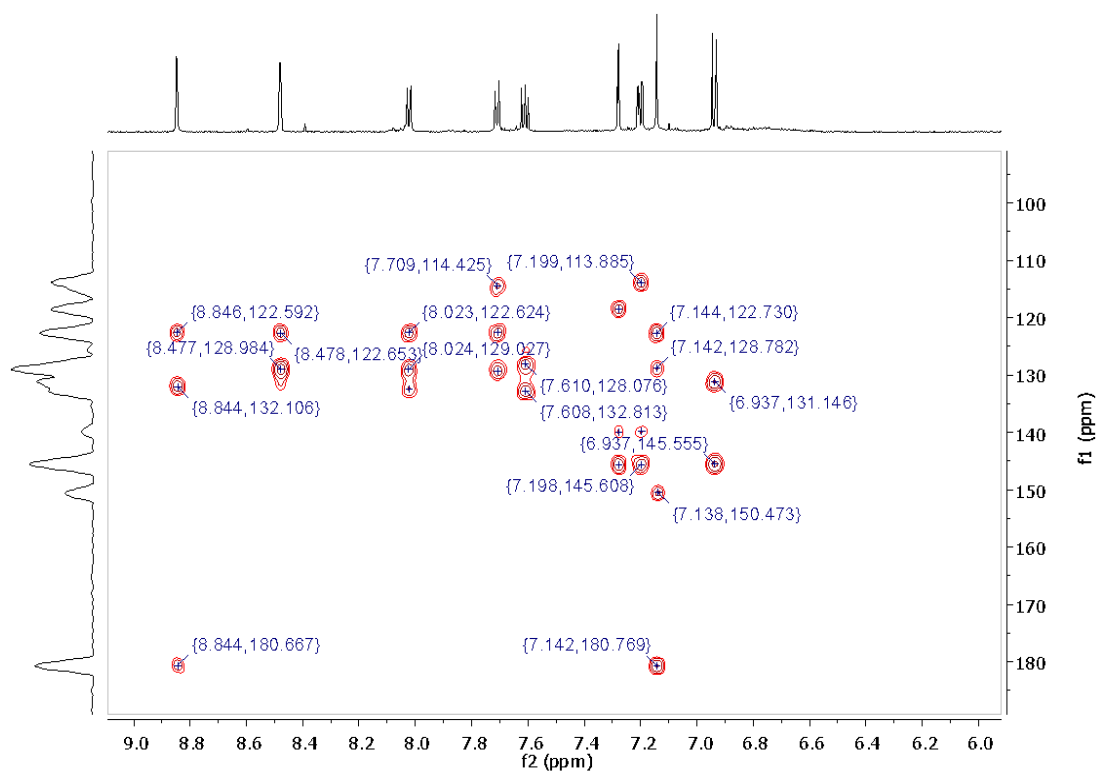
1H NMR spectrum of compound 1 in CDCl₃.

Chemical Shifts (ppm): 8.8481, 8.8450, 8.4813, 8.4783, 8.0300, 8.0164, 7.7159, 7.7043, 7.6232, 7.6113, 7.6095, 7.5976, 7.2812, 7.2775, 7.2096, 7.2059, 7.1960, 7.1923, 7.1437, 6.9458, 6.9322.

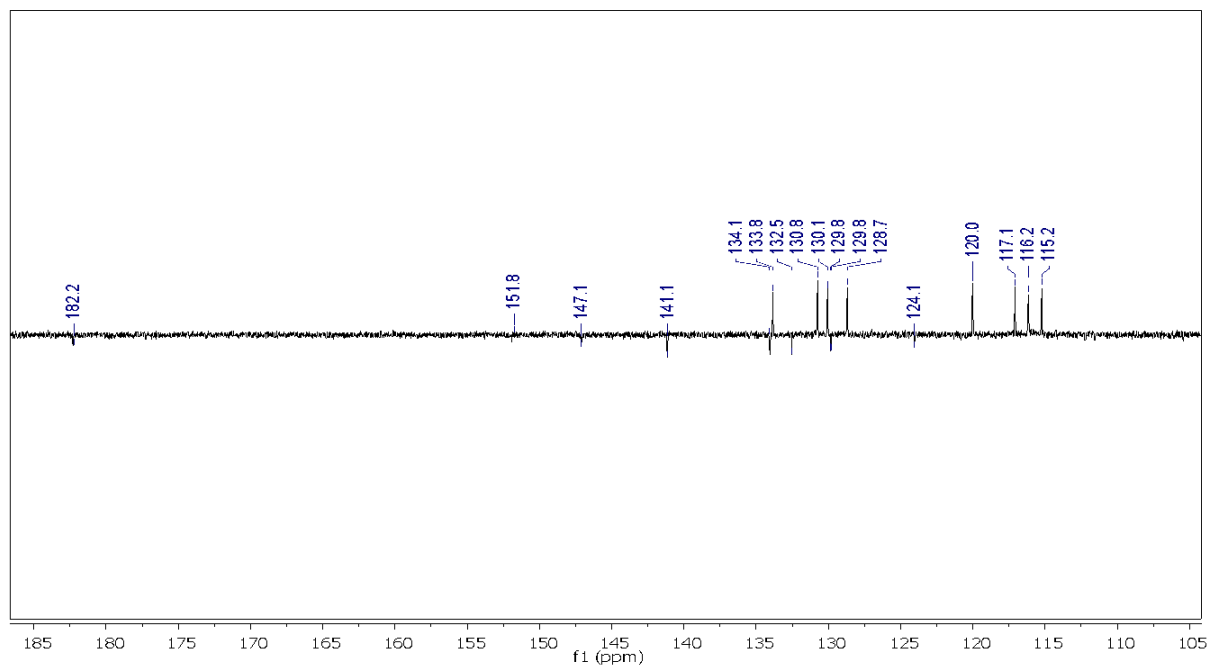
Integration values: 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00.

APÊNDICE 27 - Mapa de contornos COSY ampliado de **IV** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 28 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **IV** (CD₃OD, 14,1 T)

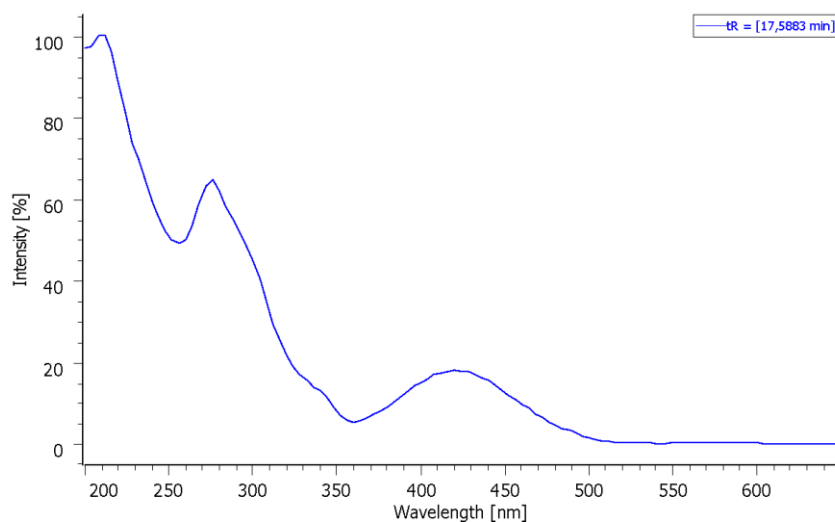
APÊNDICE 29 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **IV** (CD₃OD, 14,1 T)



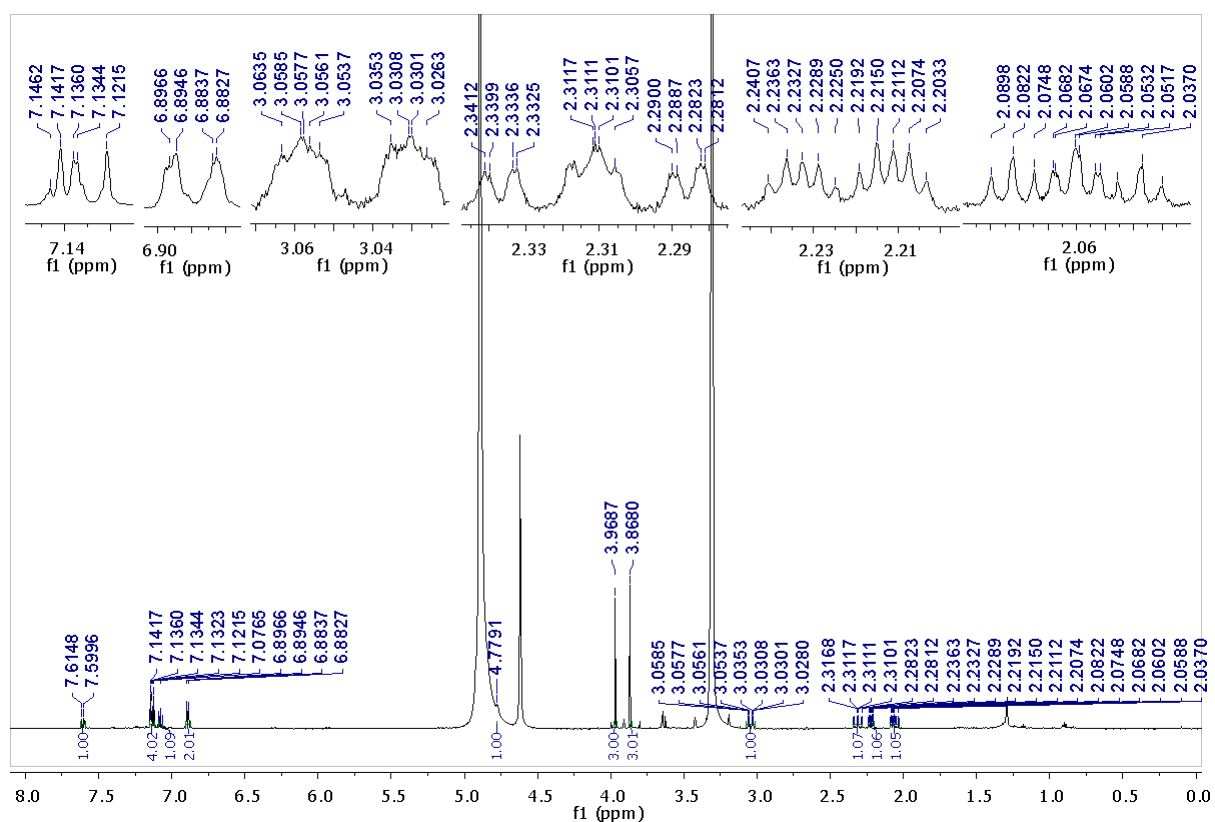
APÊNDICE 30 - Espectro de ¹³C (DEPTQ) de **IV** (CD₃OD, 14, 1 T)

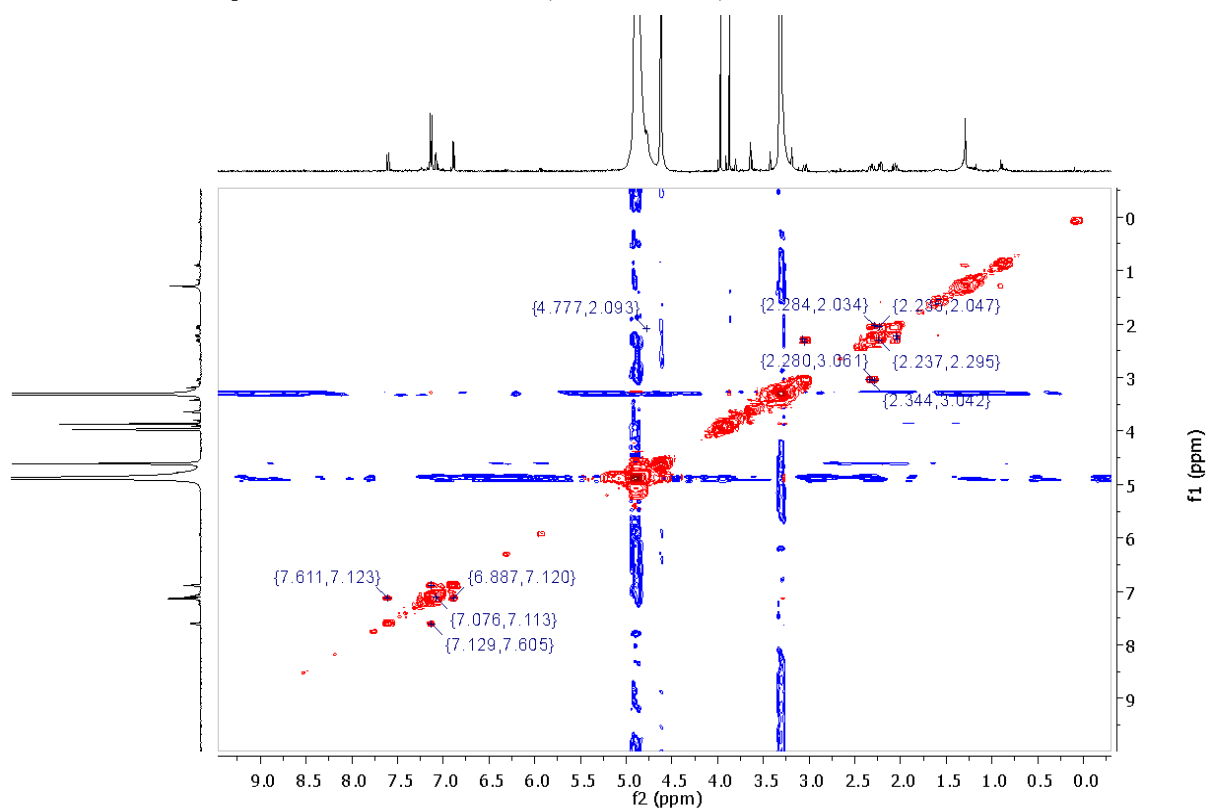
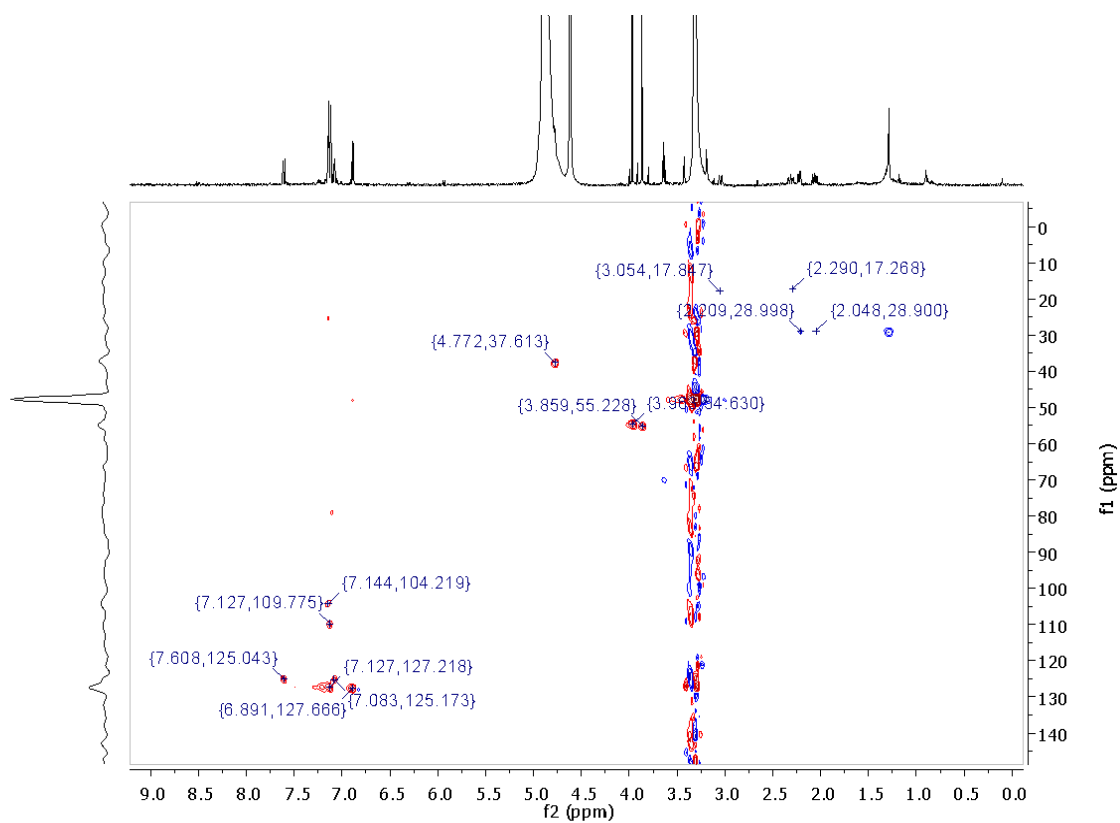


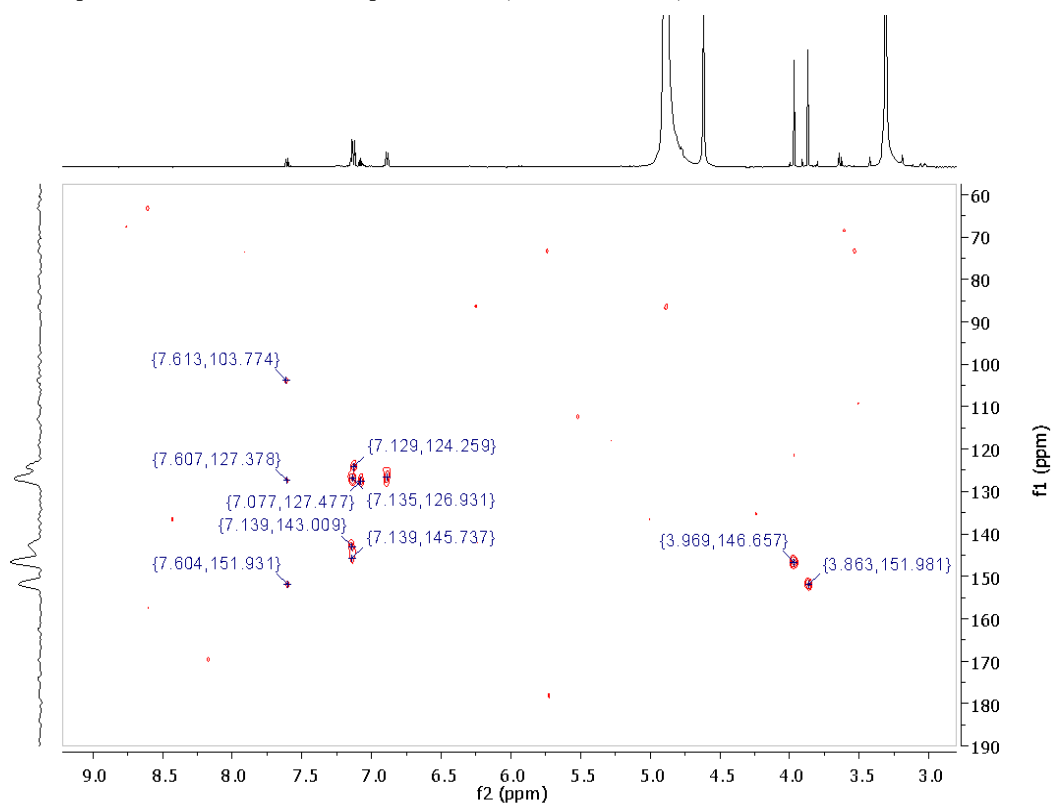
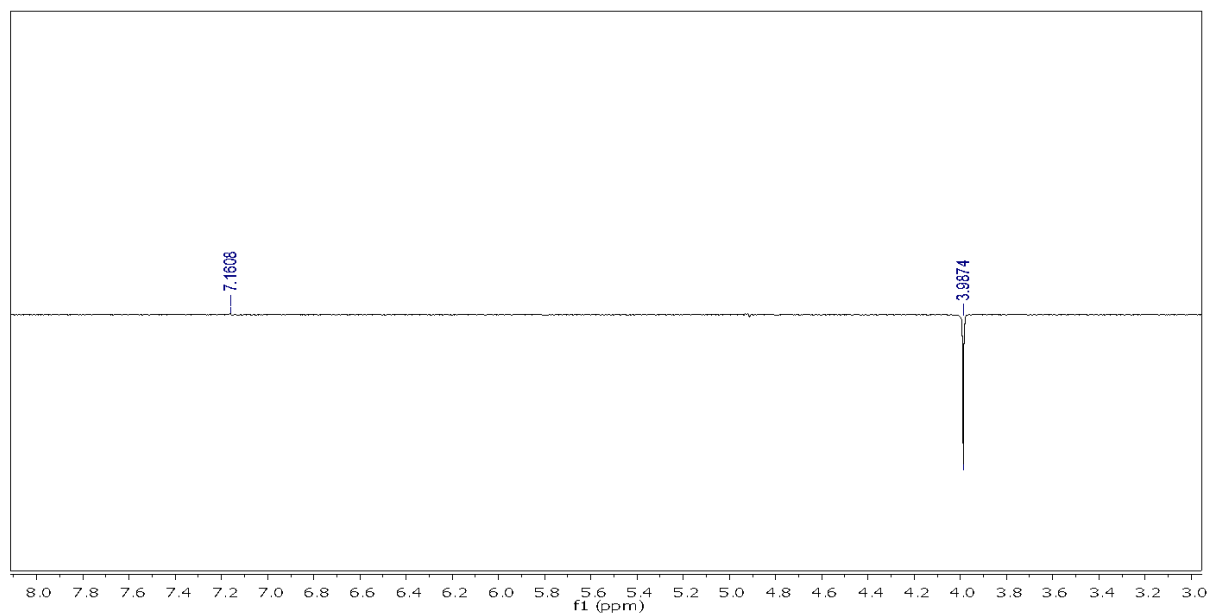
APÊNDICE 31 - Espectro de UV de **IV** obtido por CLAE-DAD ($\lambda = 275,5, 342,8$ e $423,2$ nm)



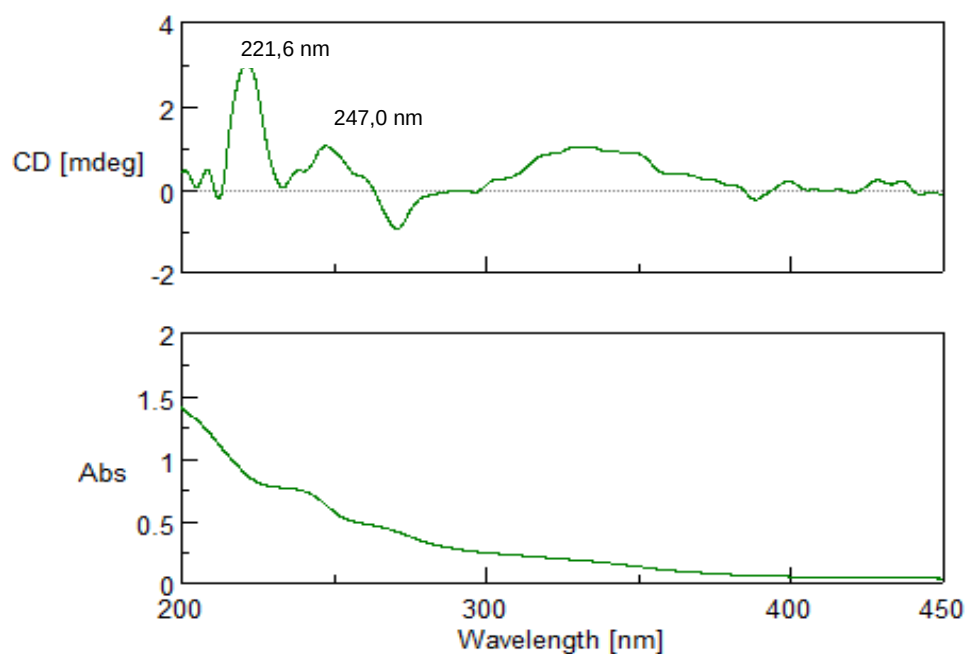
APÊNDICE 32 - Espectro de RMN de ^1H de **V** (CD_3OD , 14,1 T)



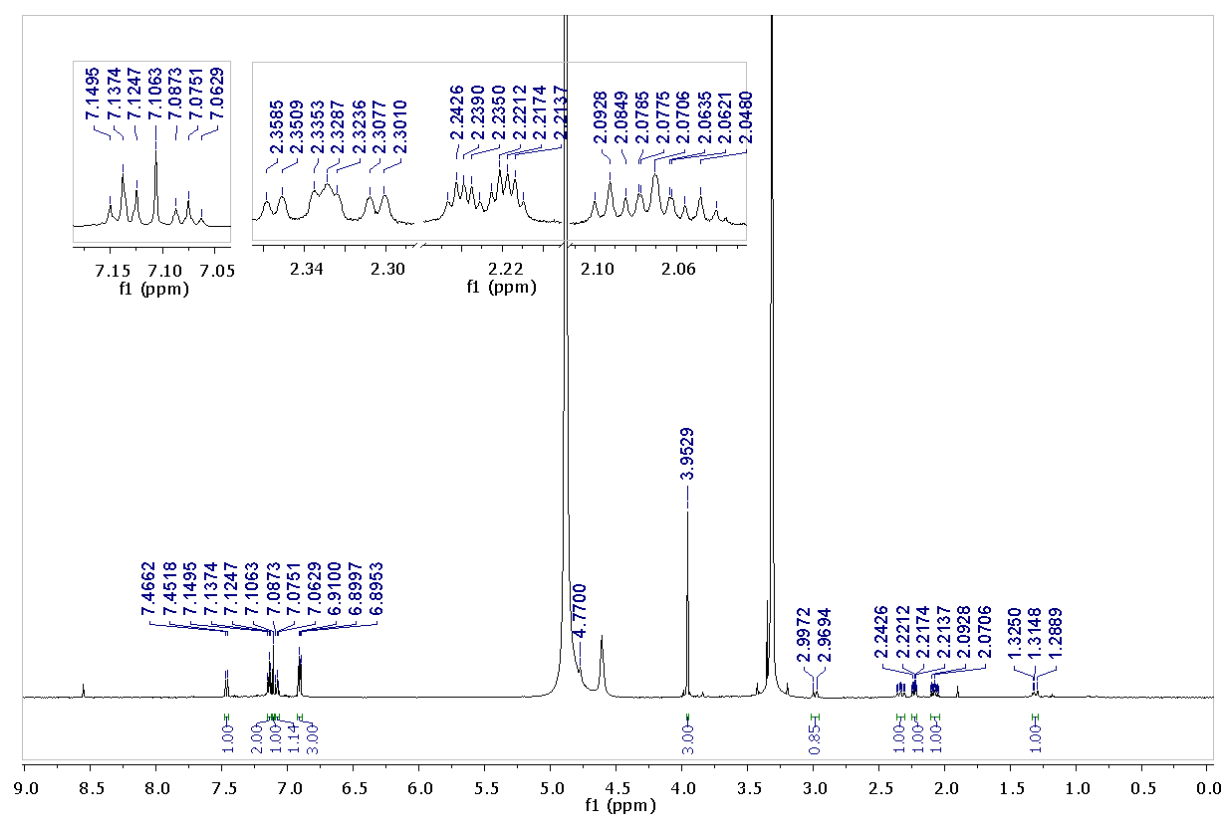
APÊNDICE 33 - Mapa de contornos COSY de V (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 34 - Mapa de contornos HSQC de V (CD₃OD, 14,1 T)

APÊNDICE 35 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **V** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 36 - Espectro de NOESY 1D de **V** com irradiação em δ 3,98 (CD₃OD, 14,1 T)

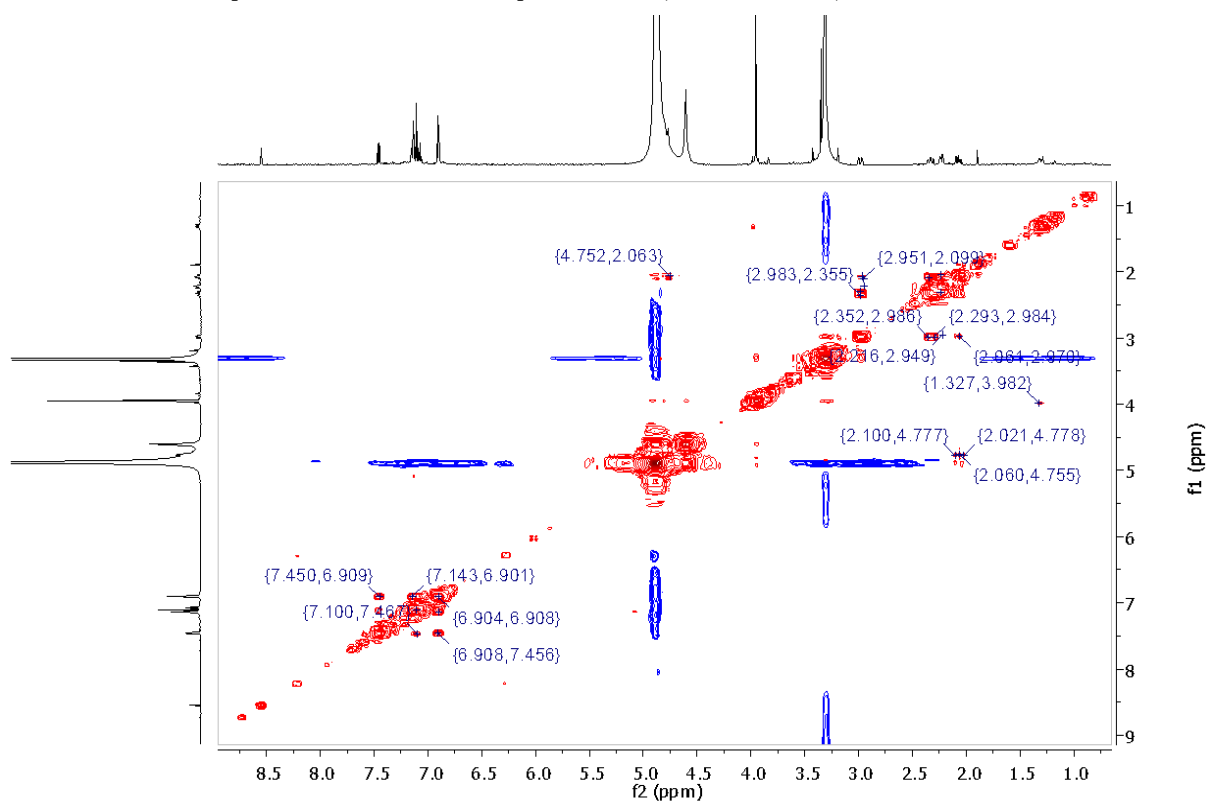
APÊNDICE 37 - Espectro de Dicroísmo Circular Eletrônico de **V** (5,2 mmol.L⁻¹ em MeOH, $\lambda_{\text{máx}}$ = 221,6 e 247 nm)



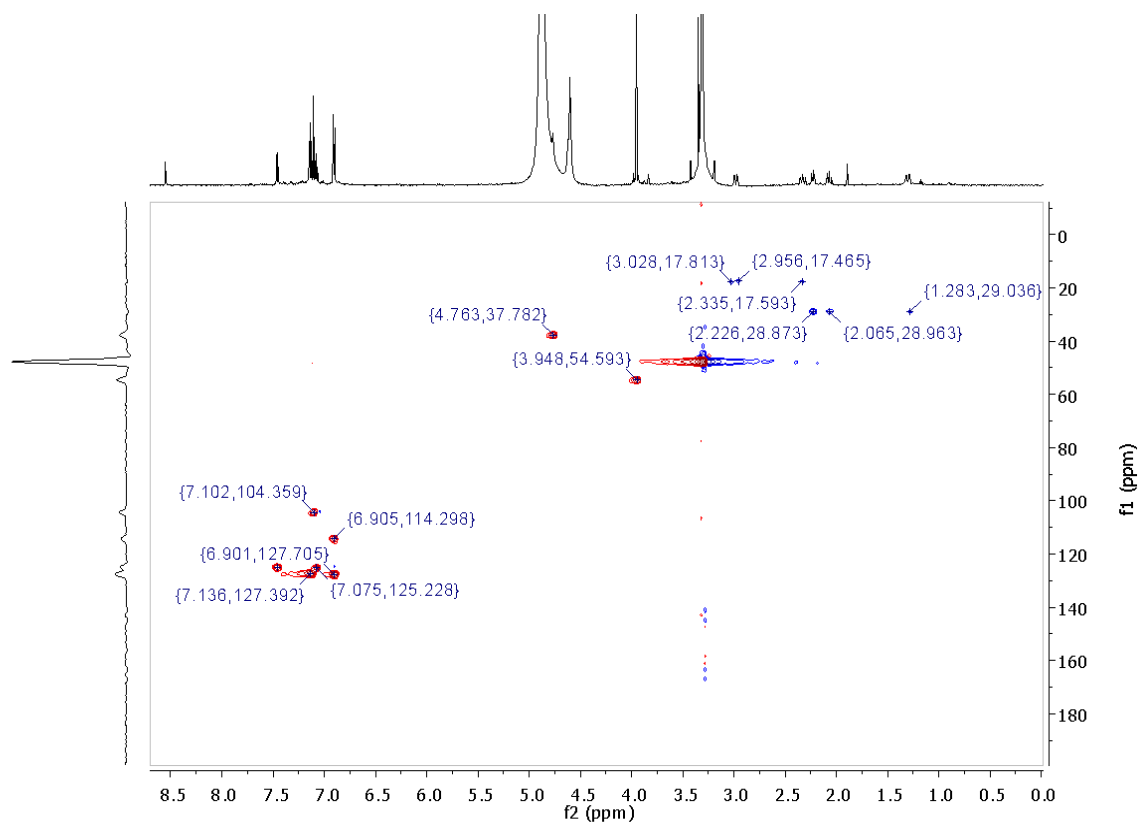
APÊNDICE 38 - Espectro de RMN de ¹H de **VI** (CD₃OD, 14,1 T)

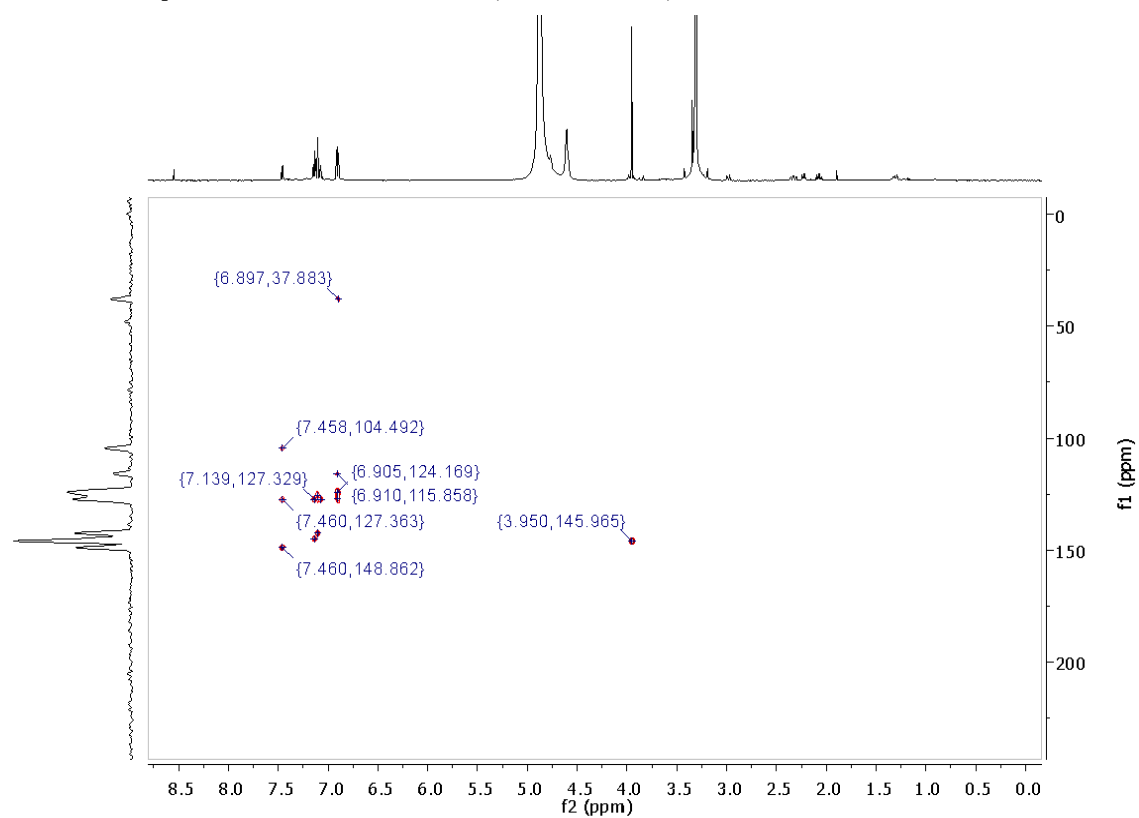
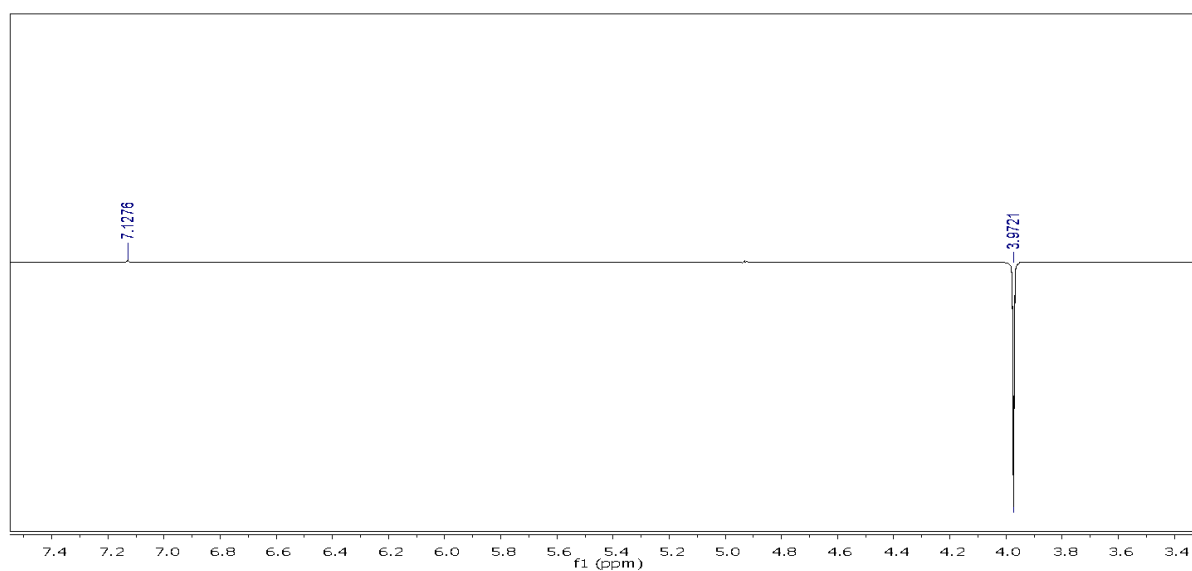


APÊNDICE 39 - Mapa de contornos COSY ampliado de **VI** (CD₃OD, 14,1 T)

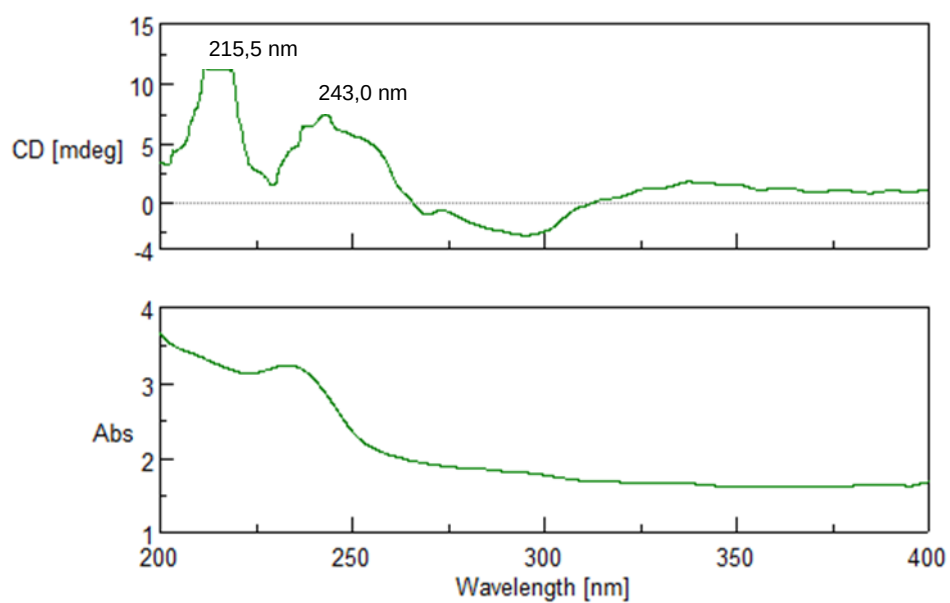


APÊNDICE 40 - Mapa de contornos HSQC de **VI** (CD₃OD, 14,1 T)

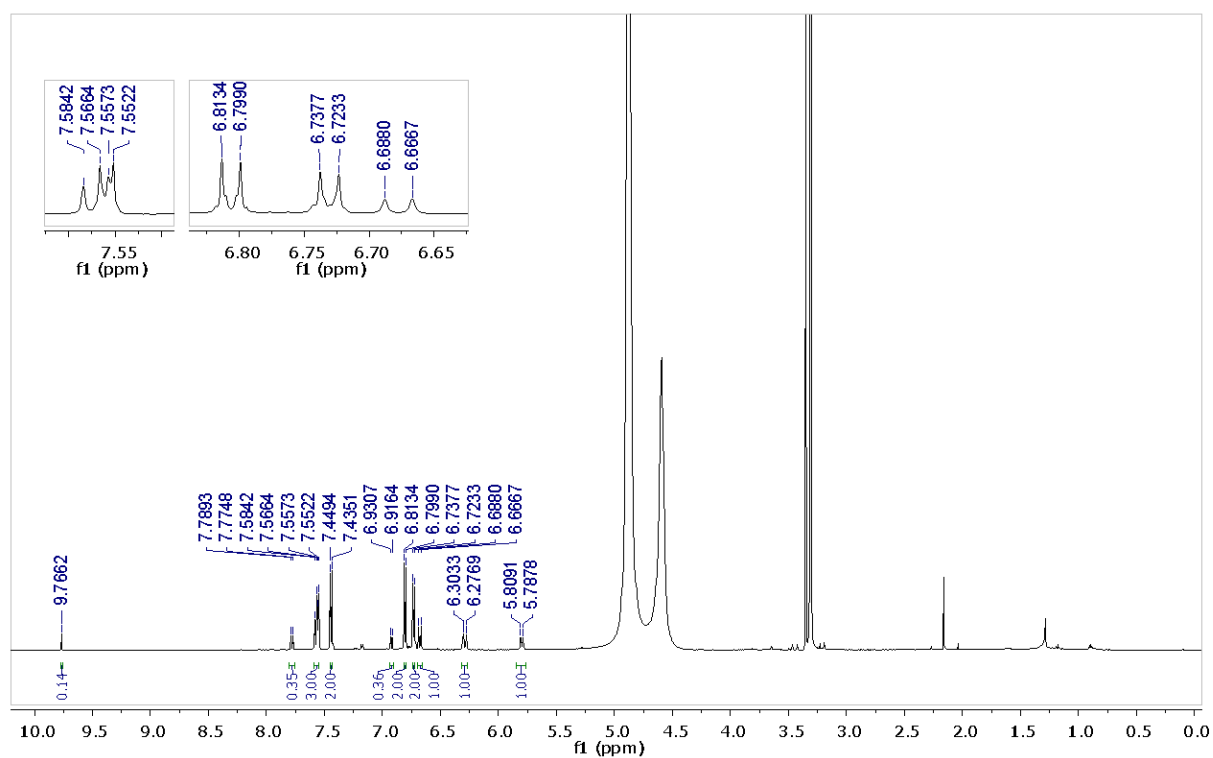


APÊNDICE 41 - Mapa de contornos HMBC de **VI** (CD₃OD, 14,1 T)**APÊNDICE 42** - Espectro de NOESY 1D de **VI** com irradiação em δ 3,97 (CD₃OD, 14,1 T)

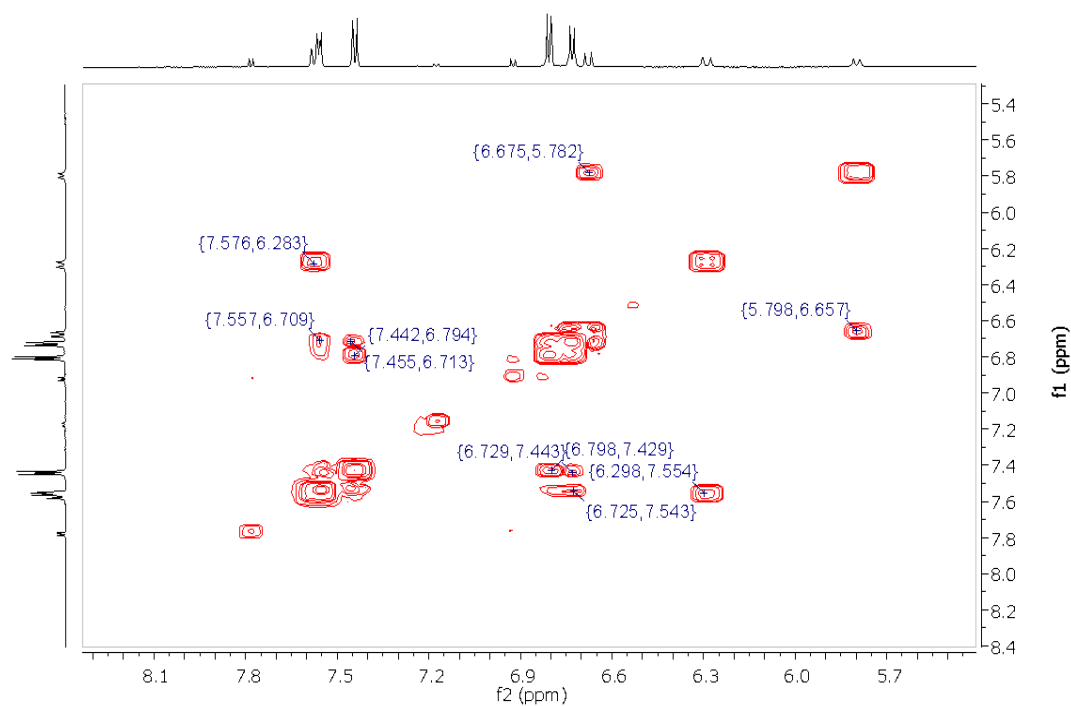
APÊNDICE 43 - Espectro de Dicroísmo Circular Eletrônico de **VI** (9,33 mmol.L⁻¹ M em MeOH, $\lambda_{\text{máx}}$ = 215,5 e 243 nm)



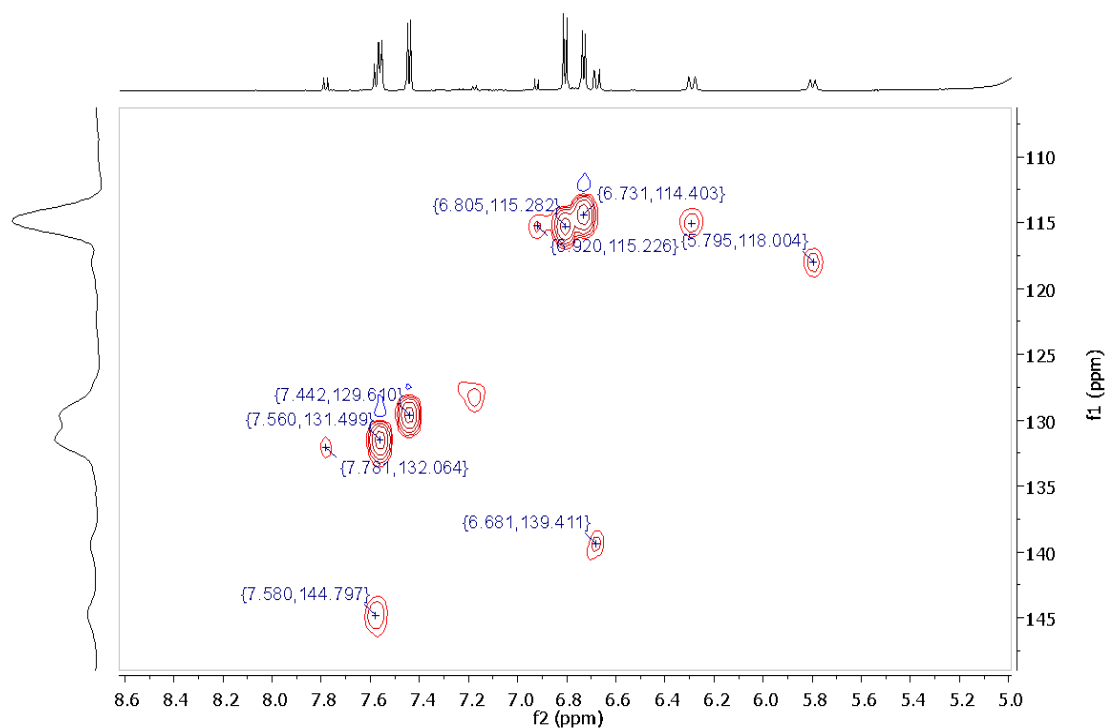
APÊNDICE 44 - Espectro de RMN de ^1H de **VII**, **X** e **XI** em mistura (CD_3OD , 14,1 T)



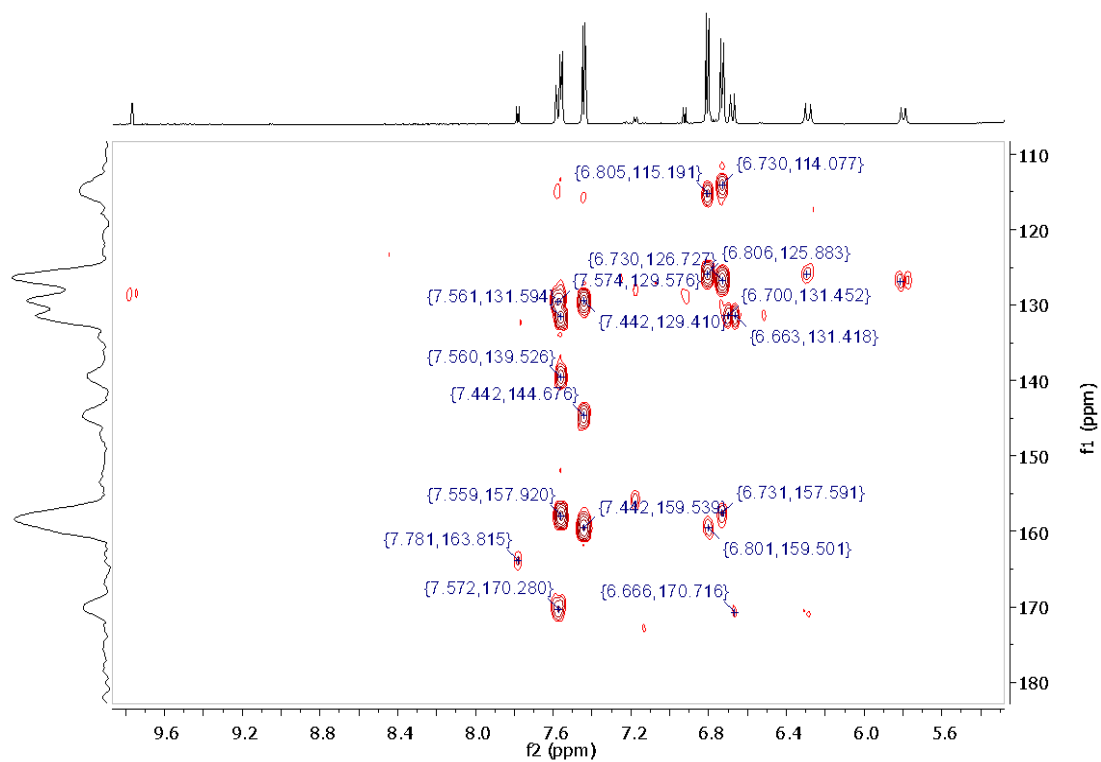
APÊNDICE 45 - Mapa de contornos COSY ampliado de **VII**, **X** e **XI** em mistura (CD_3OD , 14,1 T)



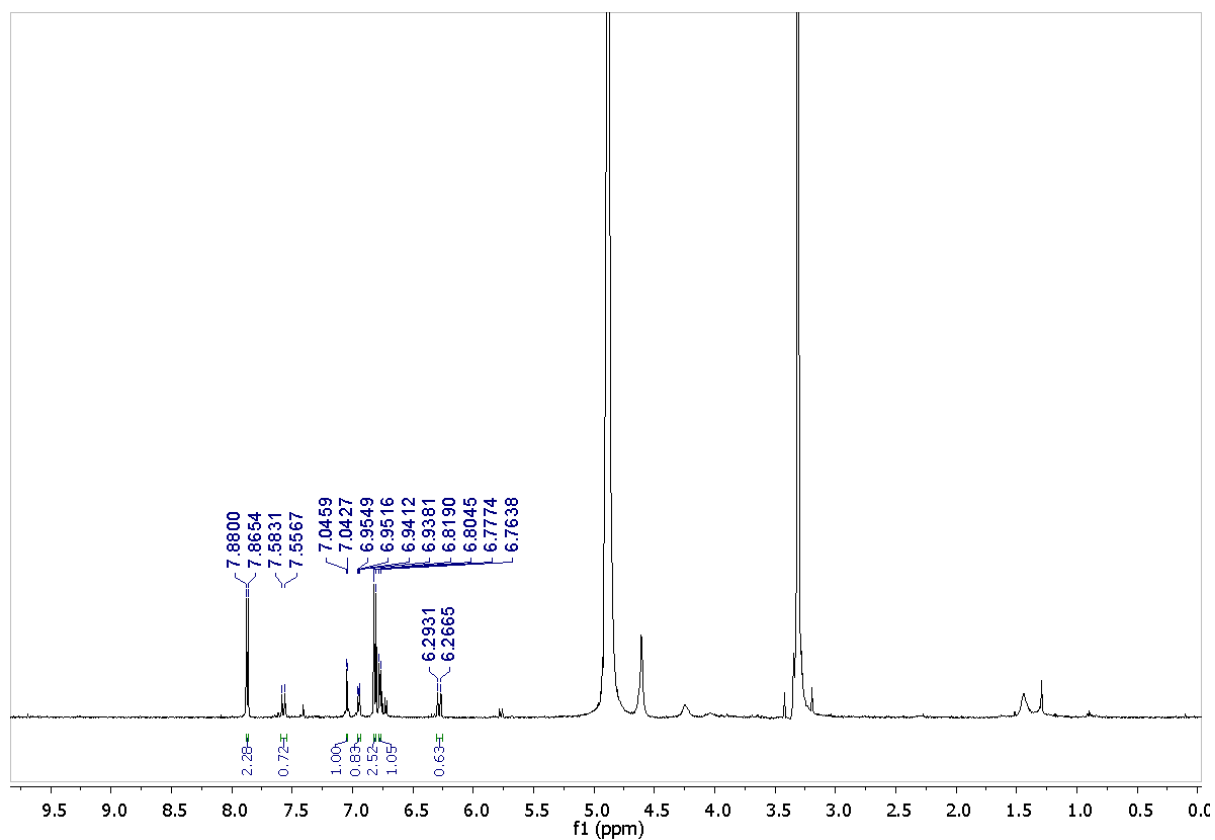
APÊNDICE 46 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **VII**, **X** e **XI** em mistura (CD₃OD, 14,1 T)



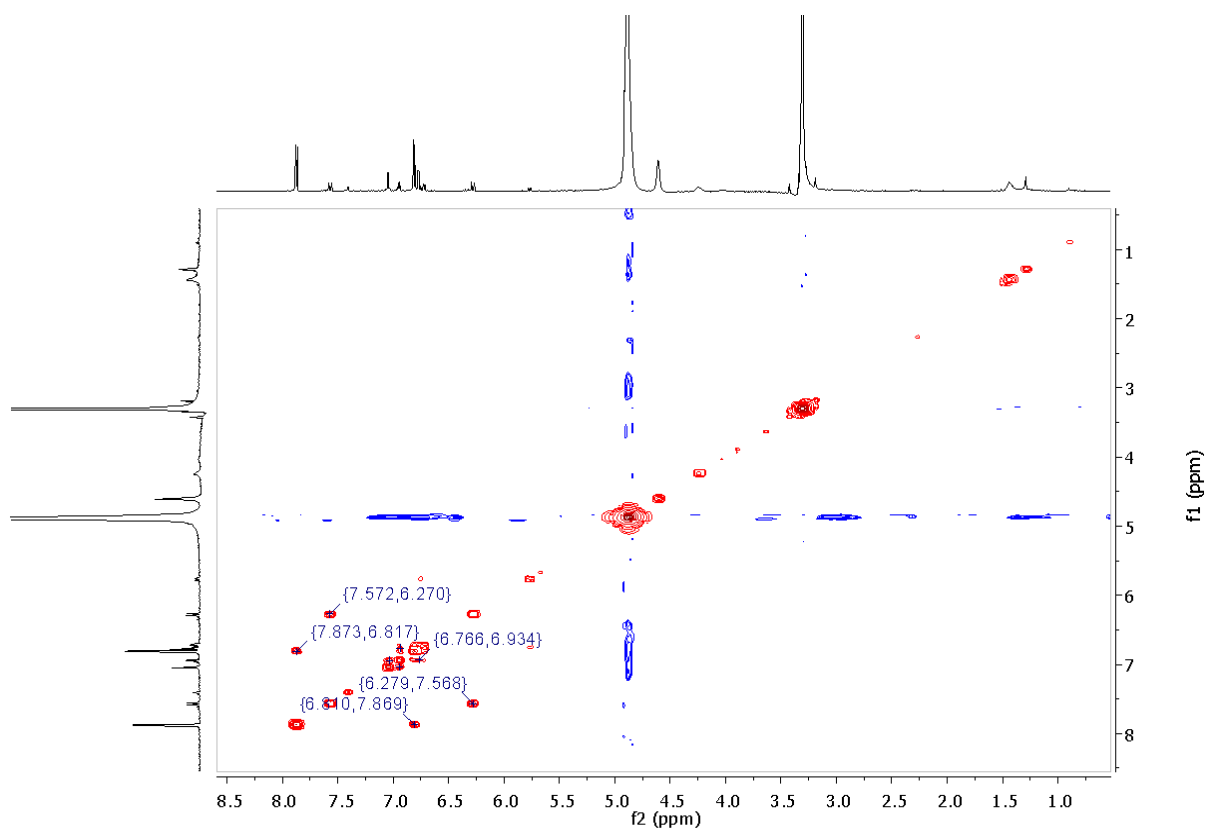
APÊNDICE 47 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **VII**, **X** e **XI** em mistura (CD₃OD, 14,1 T)

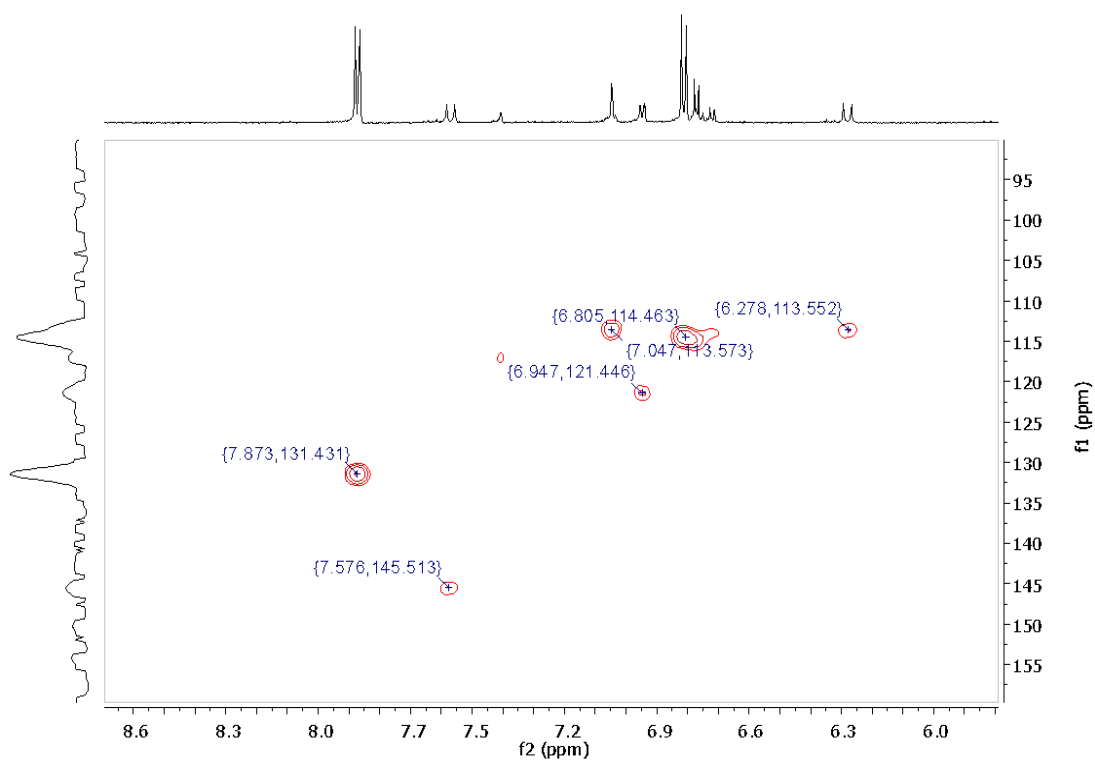
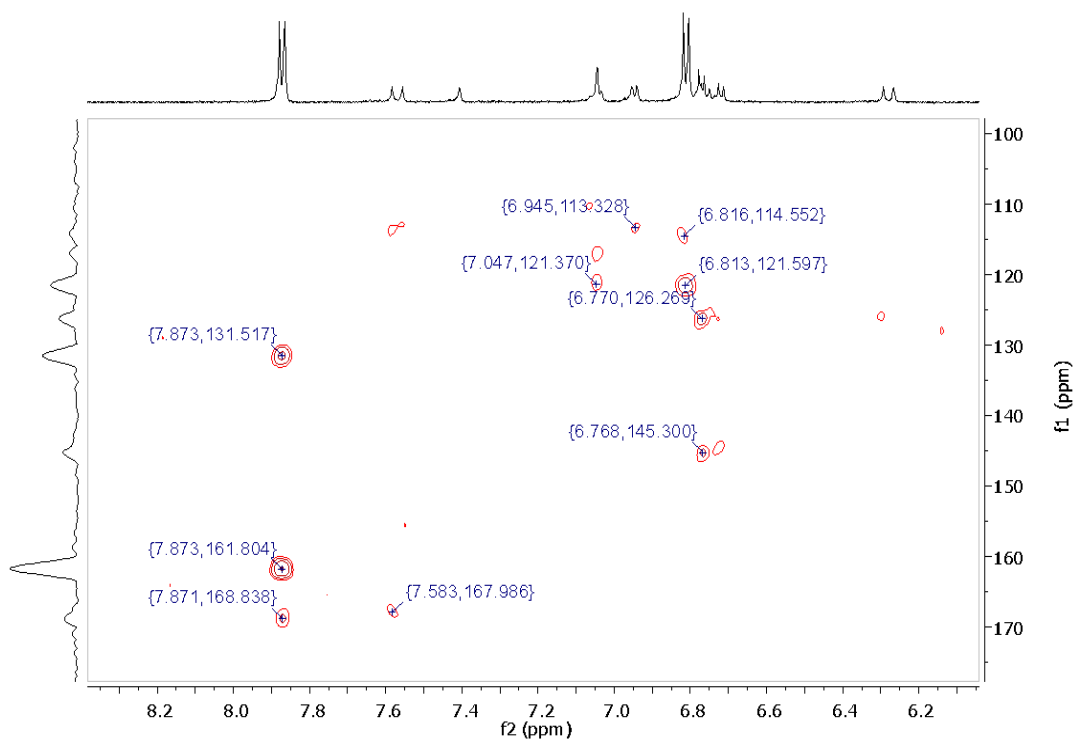


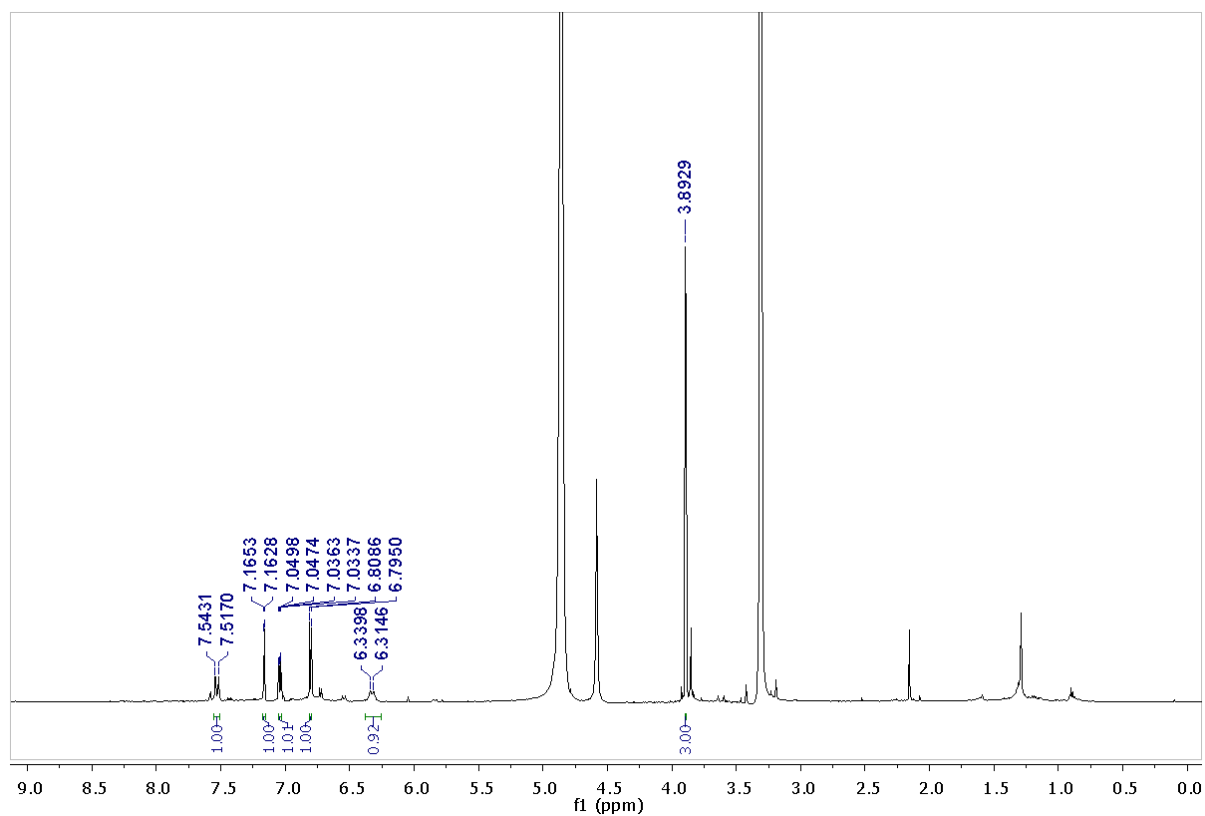
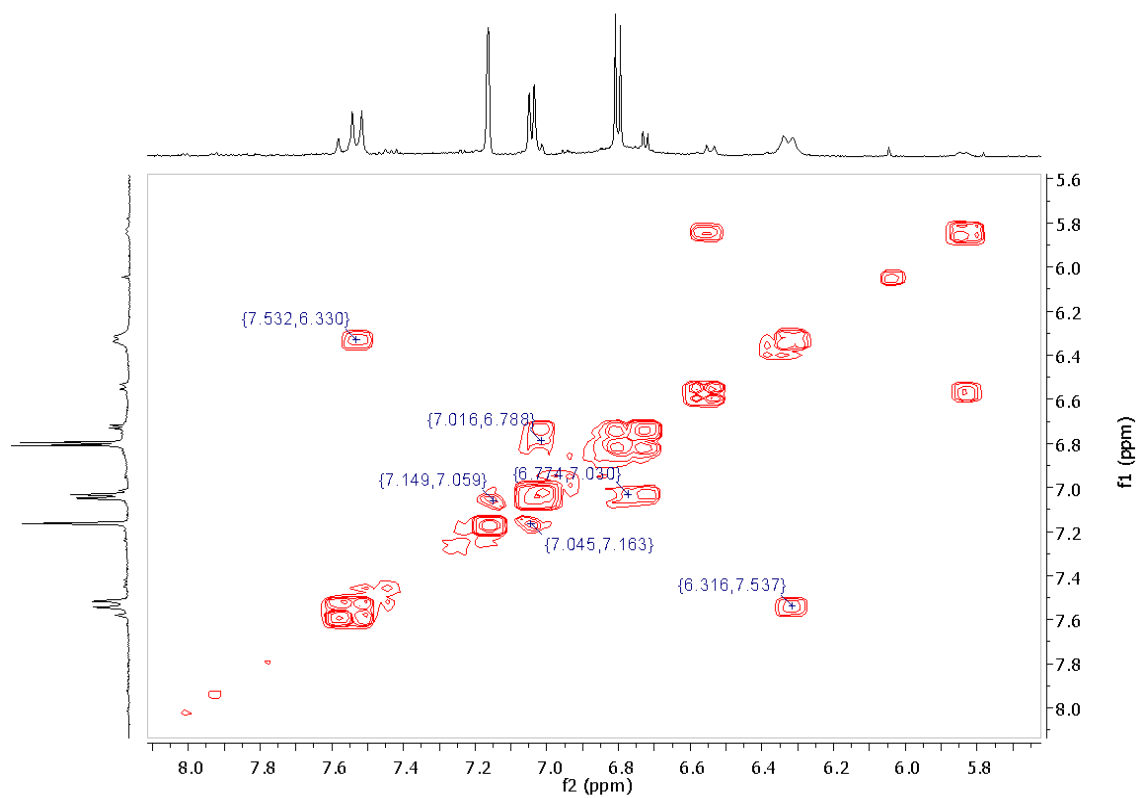
APÊNDICE 48 - Espectro de RMN de ^1H de **VIII** em mistura com **XII** (CD_3OD , 14,1 T)

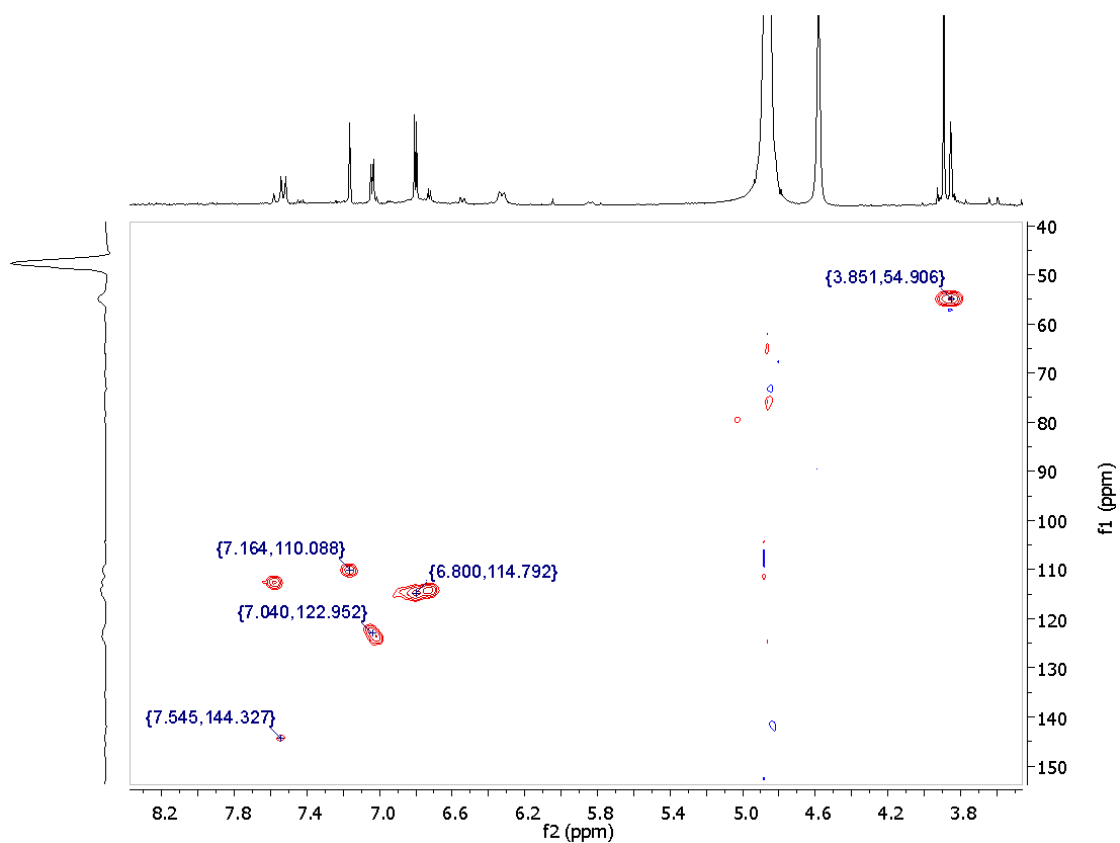
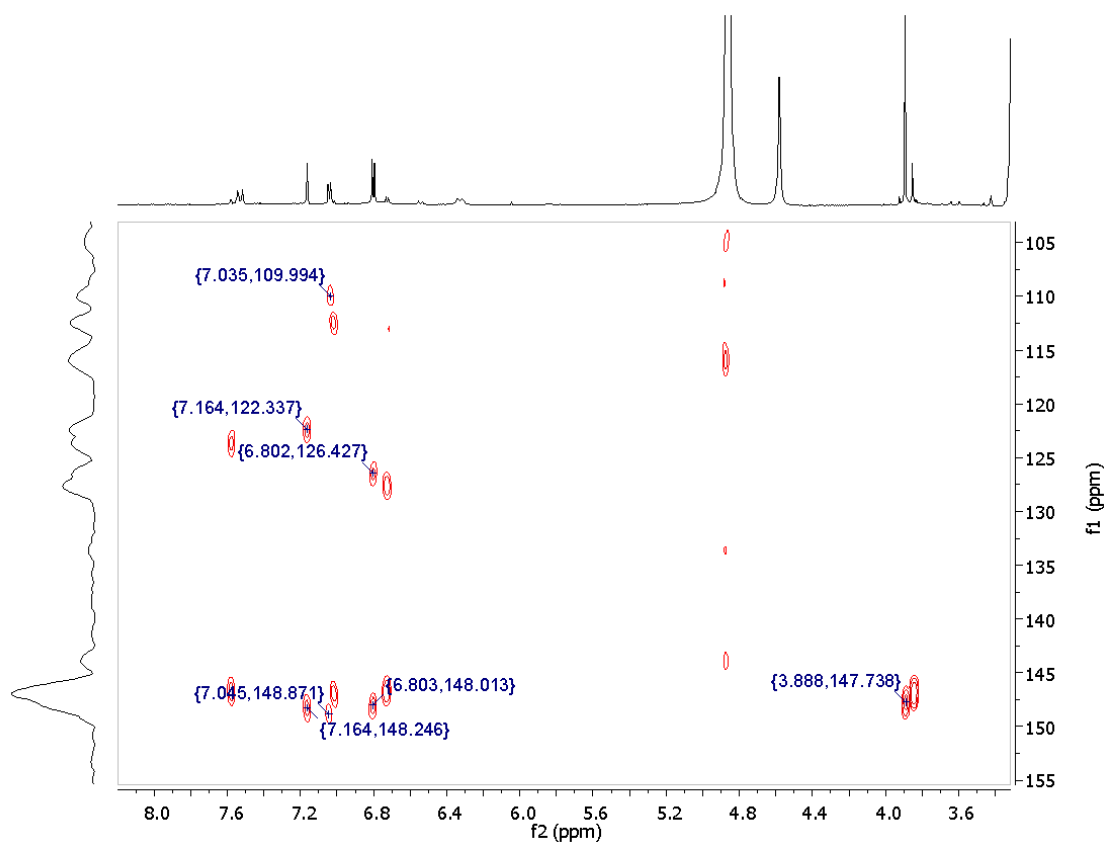


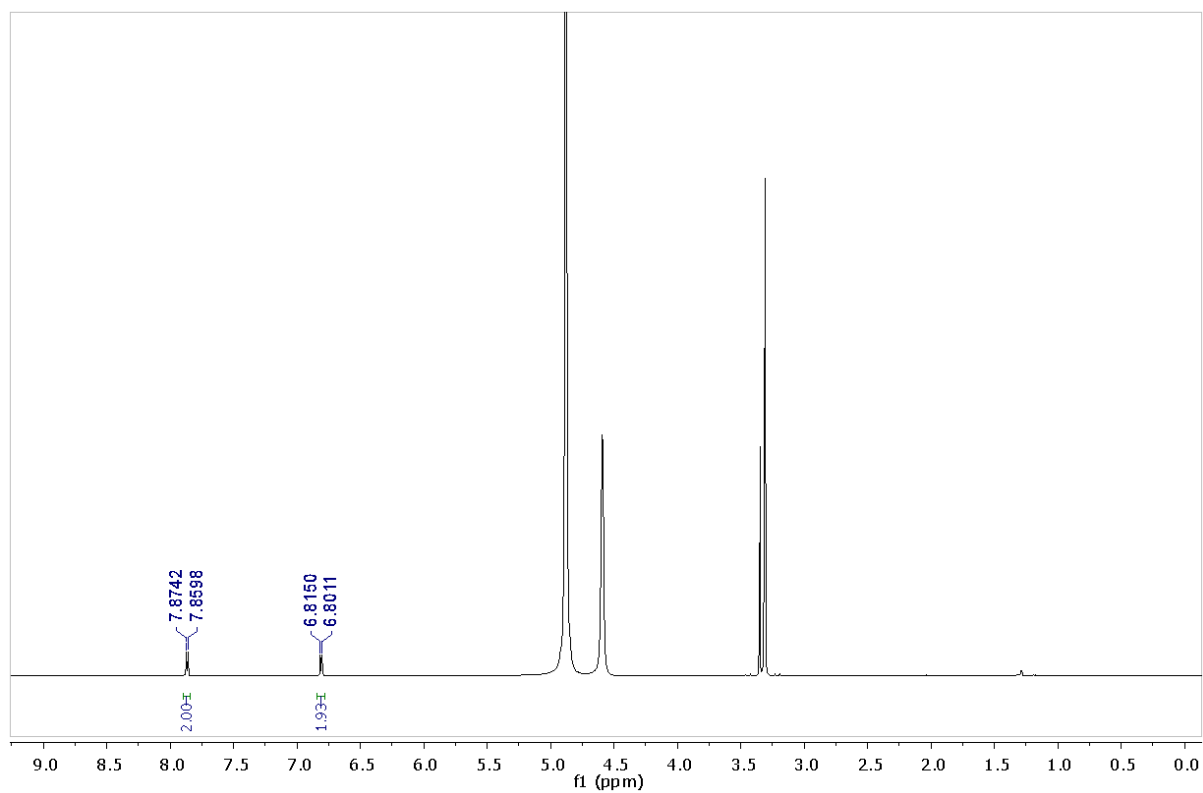
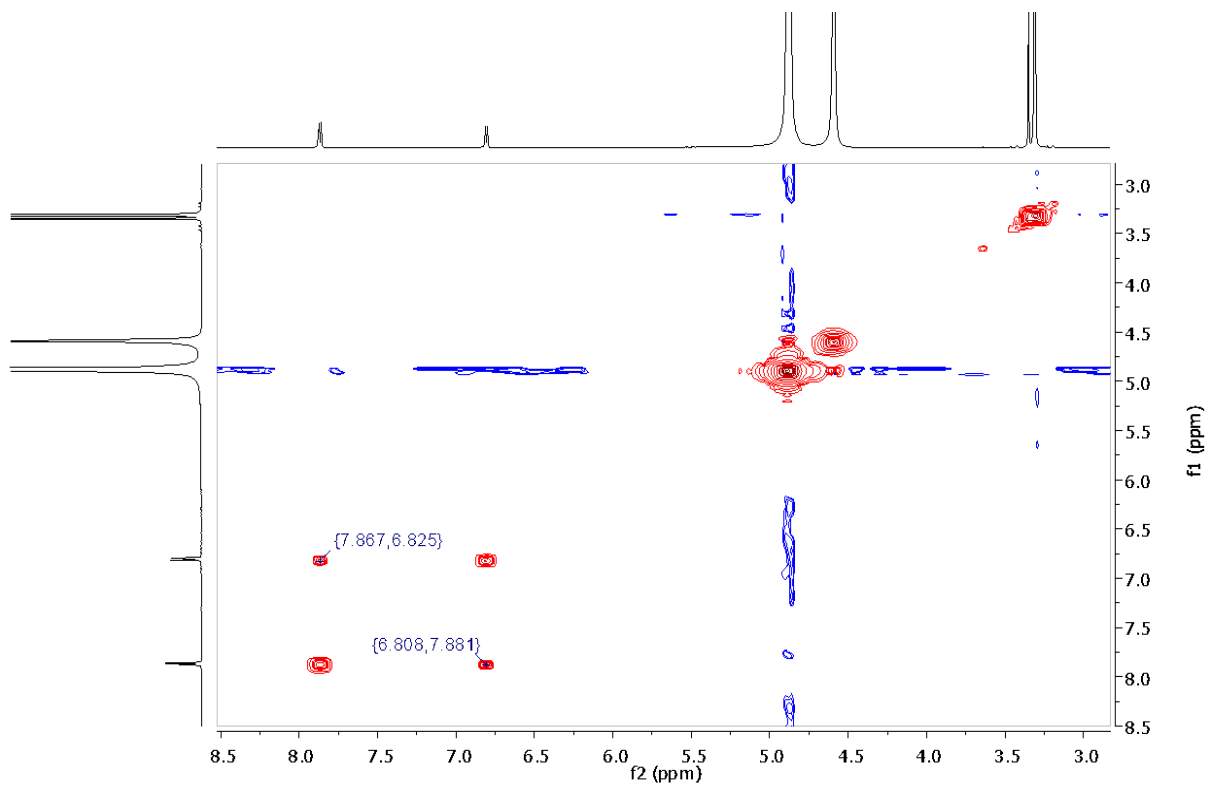
APÊNDICE 49 - Mapa de contornos COSY ampliado de **VIII** em mistura com **XII** (CD_3OD , 14,1 T)

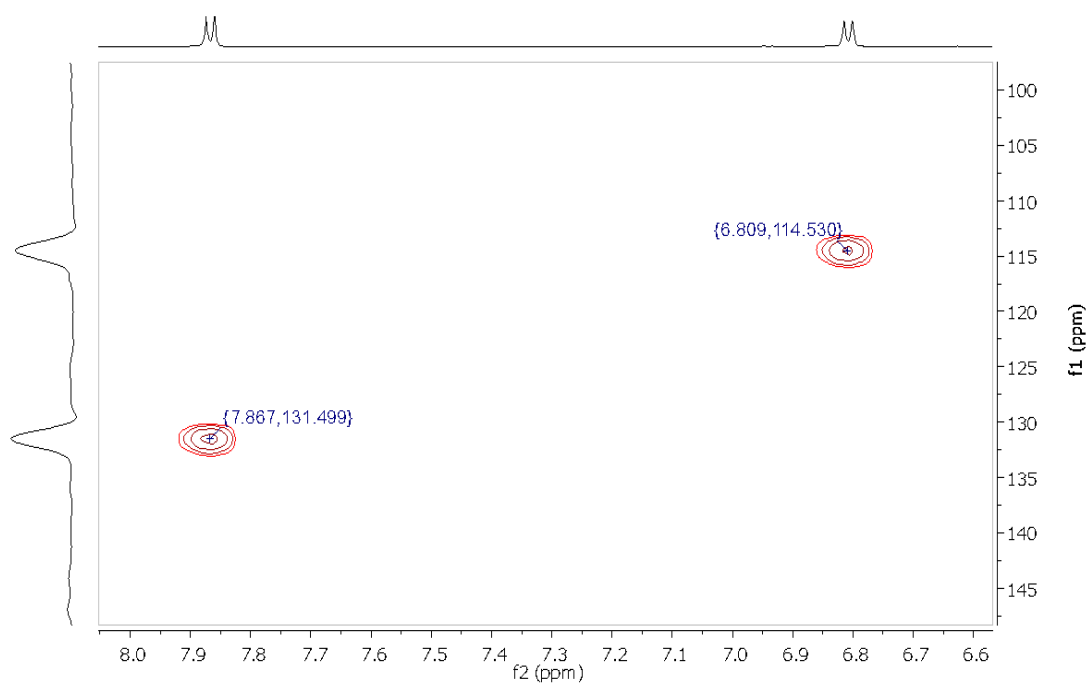
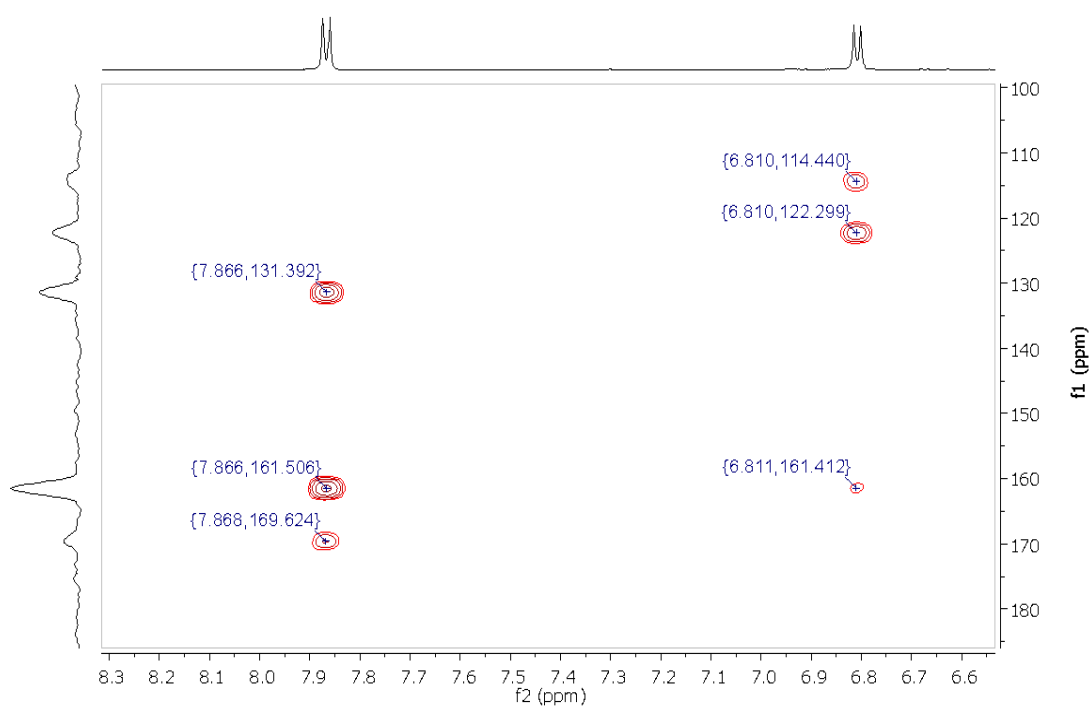


APÊNDICE 50 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **VIII** em mistura com **XII** (CD₃OD, 14,1 T)**APÊNDICE 51** - Mapa de contornos HMBC ampliado de **VIII** em mistura com **XII** (CD₃OD, 14,1 T)

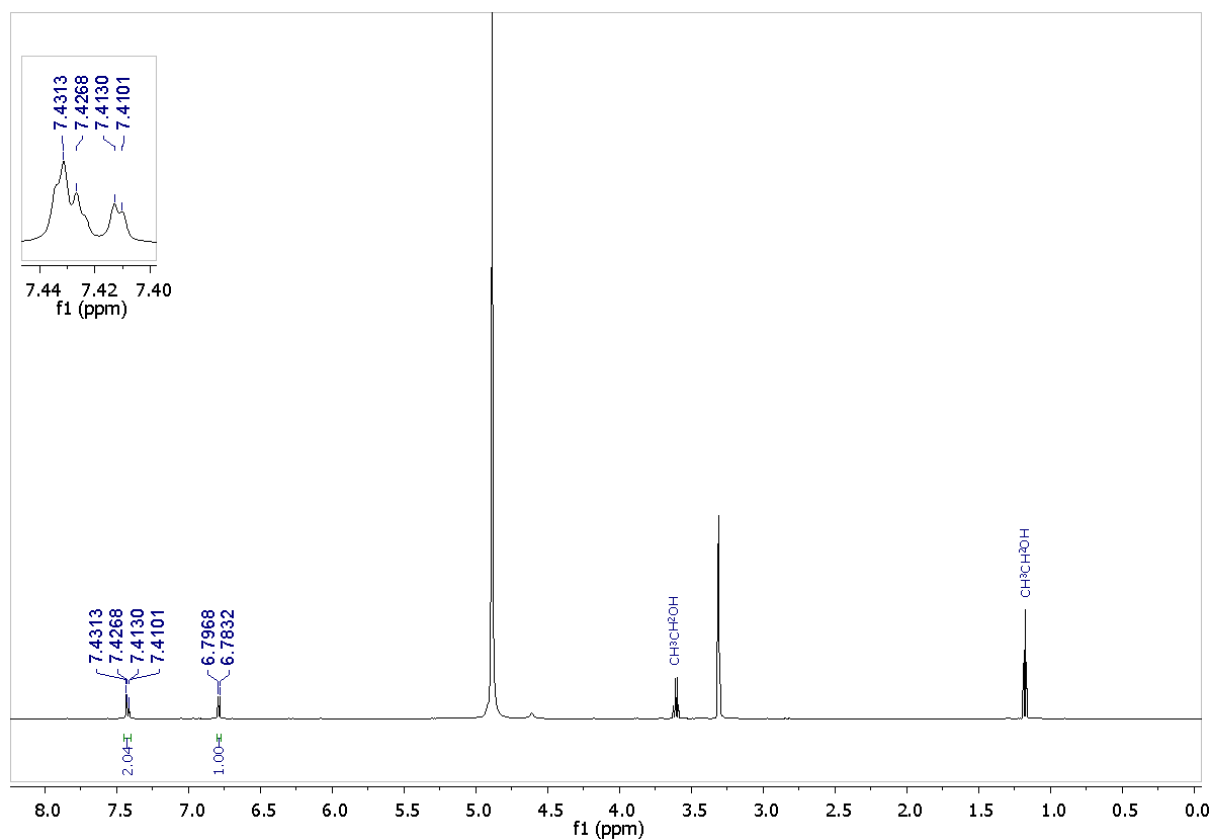
APÊNDICE 52 - Espectro de RMN de ^1H de IX (CD_3OD , 14,1 T)APÊNDICE 53 - Mapa de contornos COSY ampliado de IX (CD_3OD , 14,1 T)

APÊNDICE 54 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **IX** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 55 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **IX** (CD₃OD, 14,1 T)

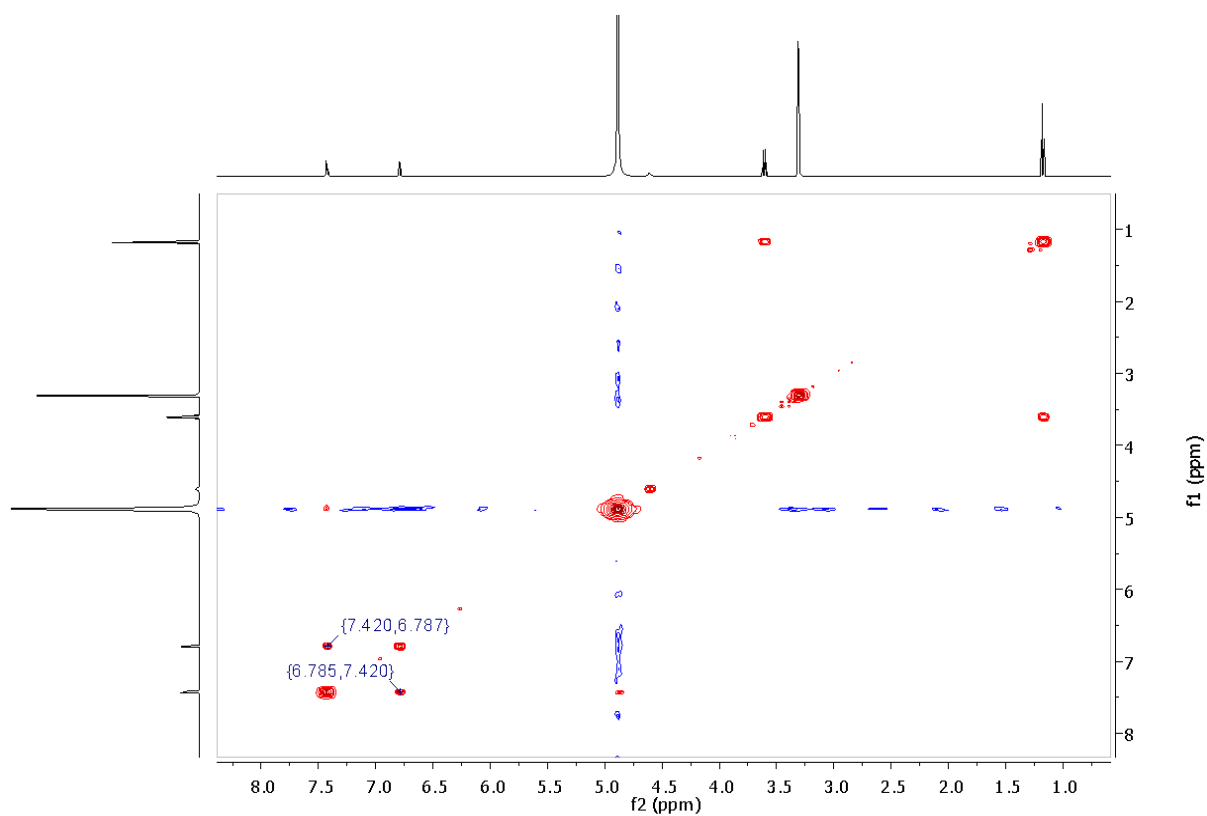
APÊNDICE 56 - Espectro de RMN de ^1H de **XII** (CD_3OD , 14,1 T)APÊNDICE 57 - Mapa de contornos COSY ampliado de **XII** (CD_3OD , 14,1 T)

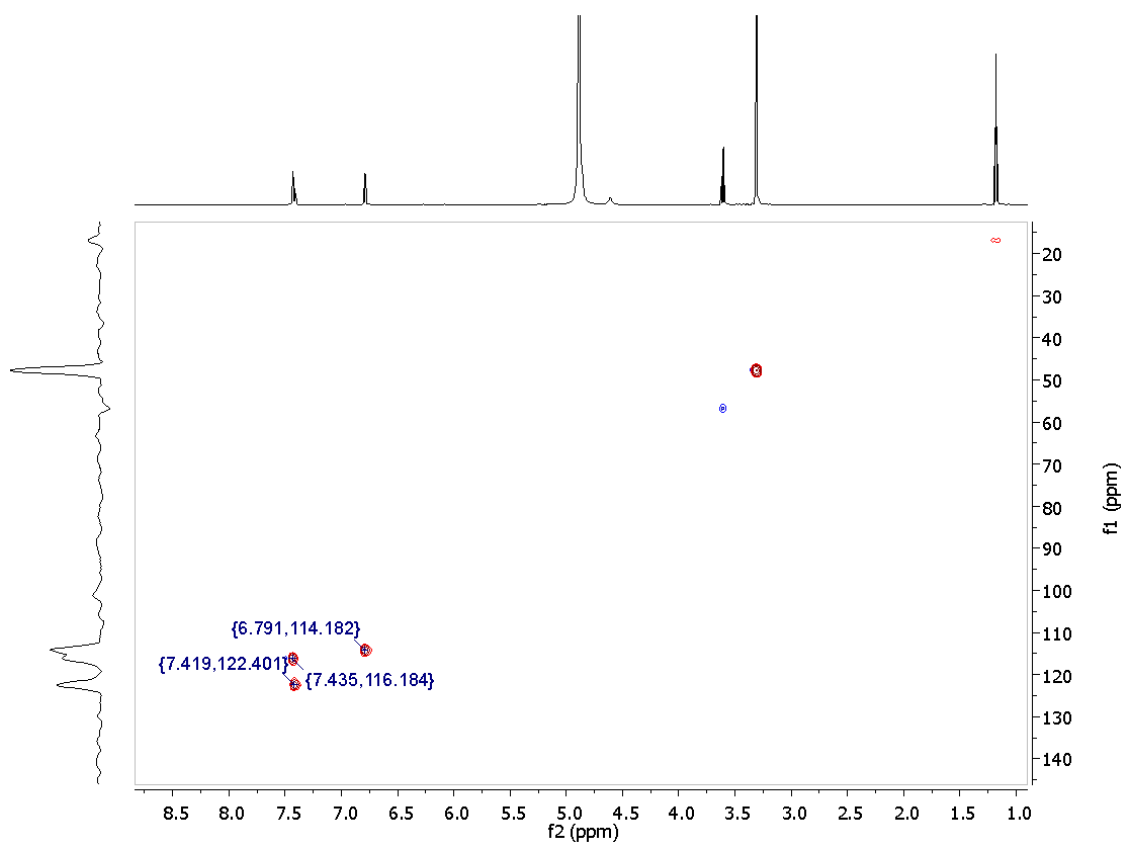
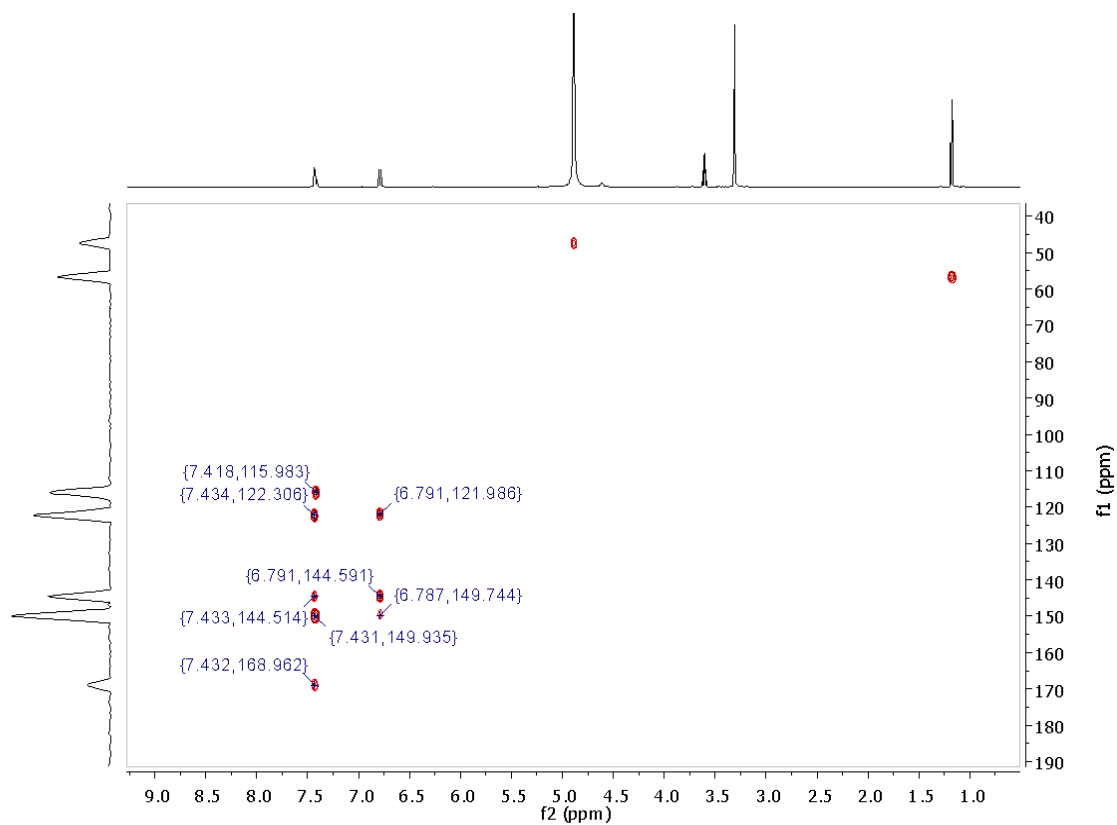
APÊNDICE 58 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **XII** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 59 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **XII** (CD₃OD, 14,1 T)

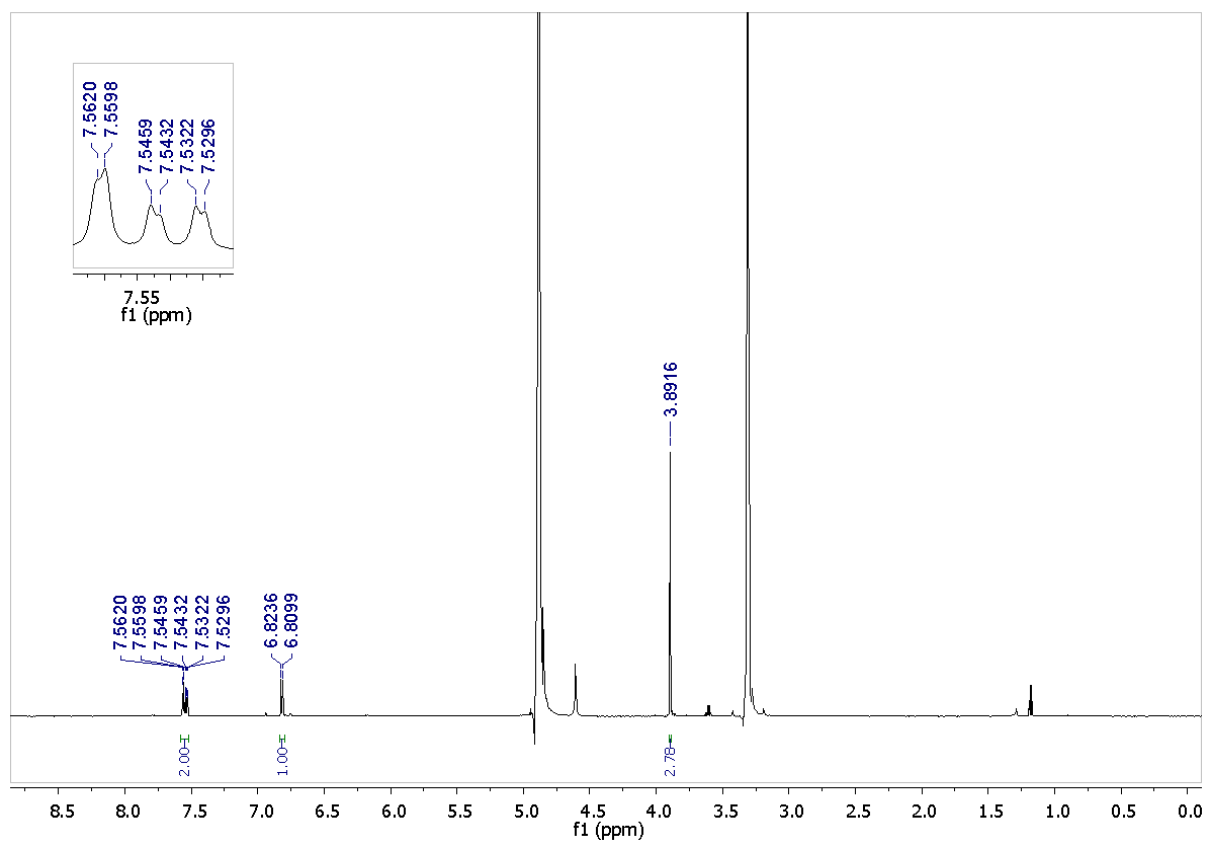
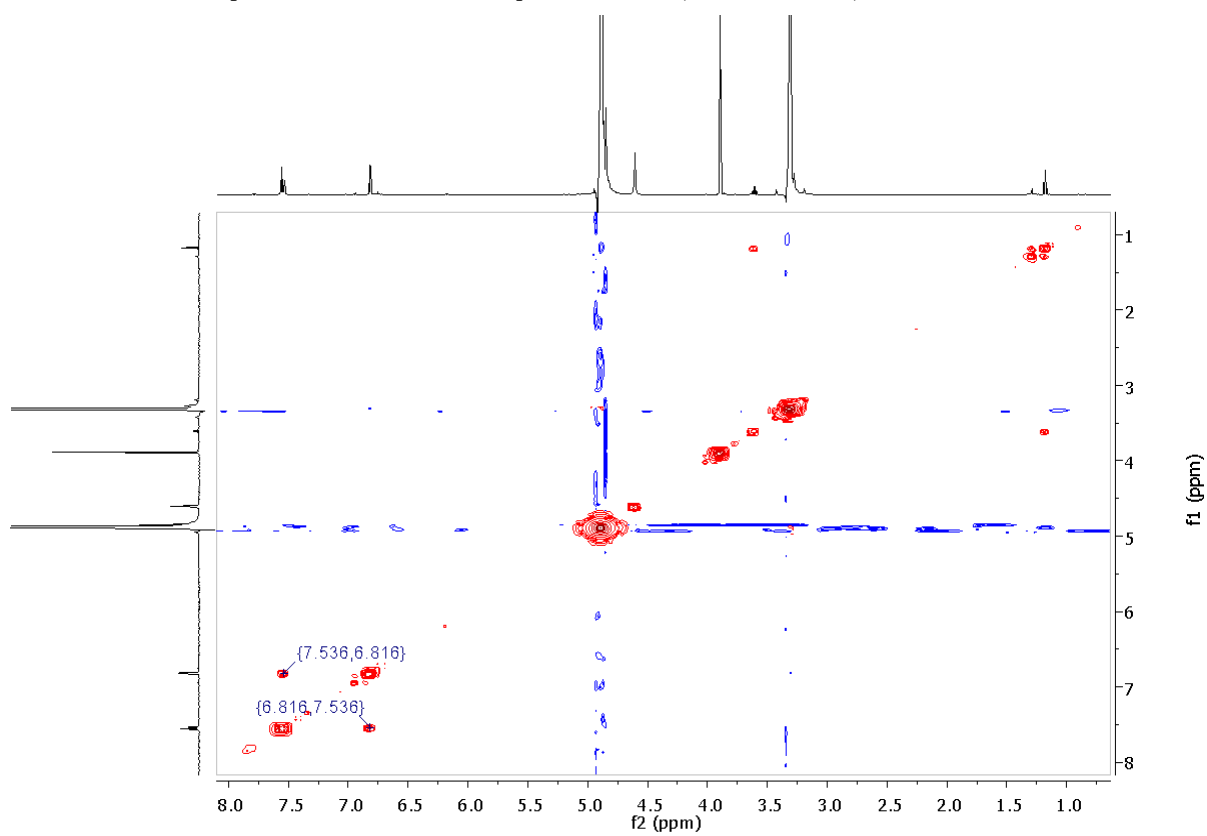
APÊNDICE 60 - Espectro de RMN de ^1H de **XIII** (CD_3OD , 14,1 T)

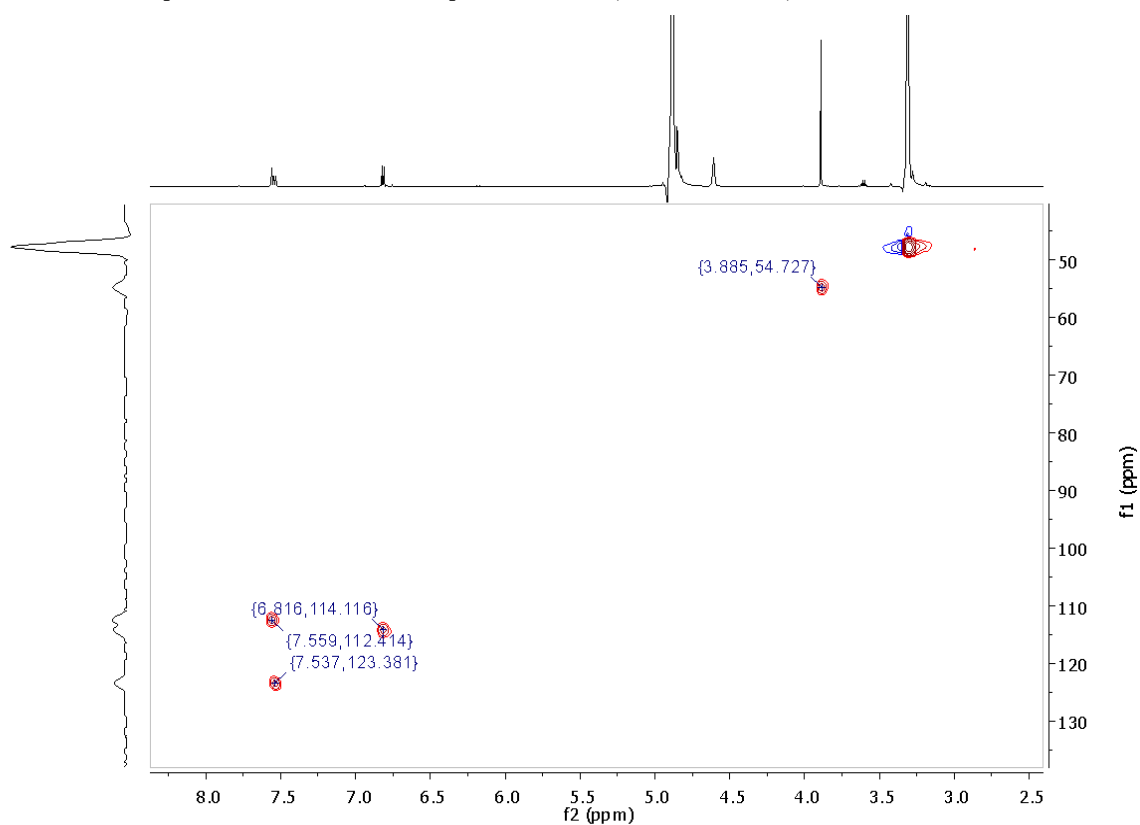
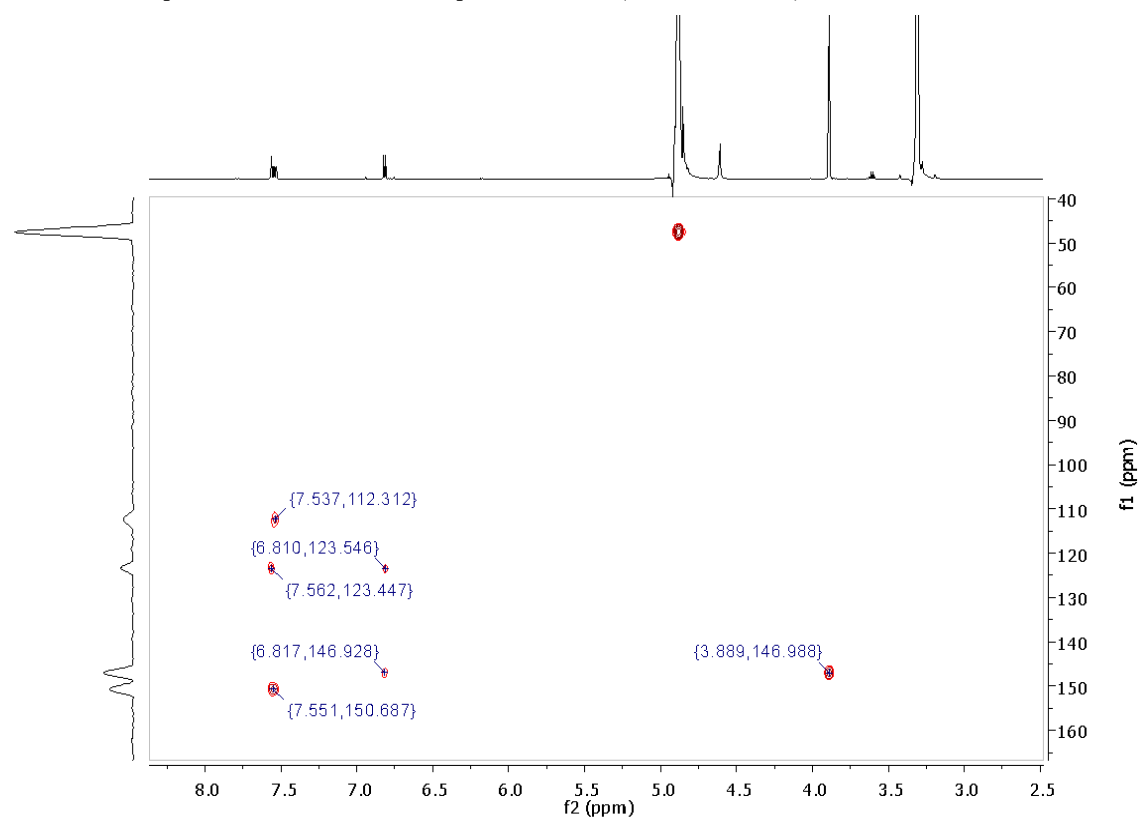


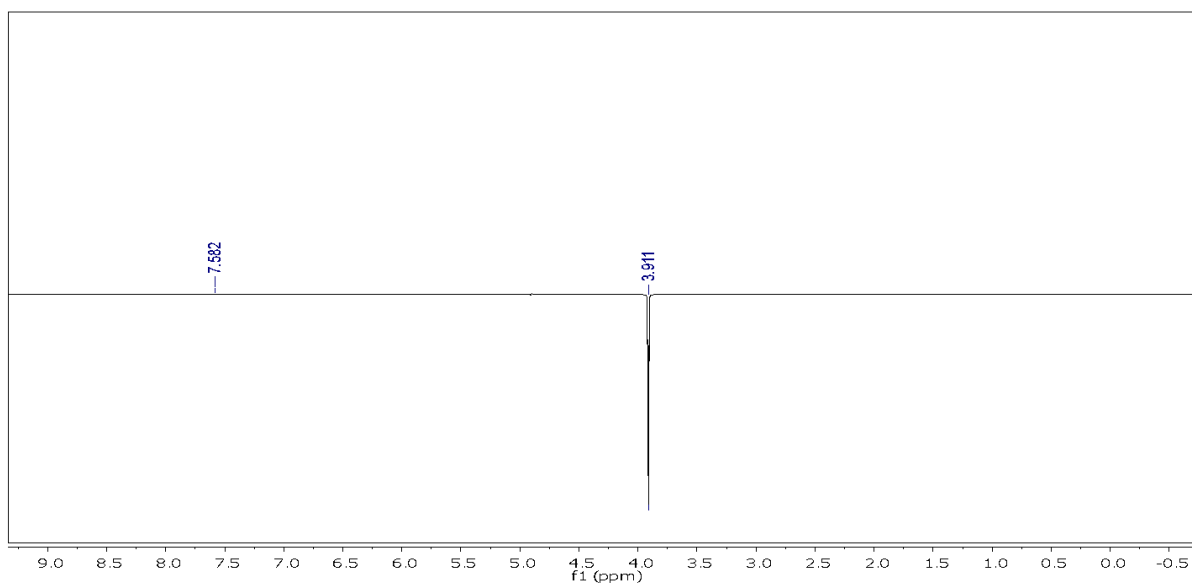
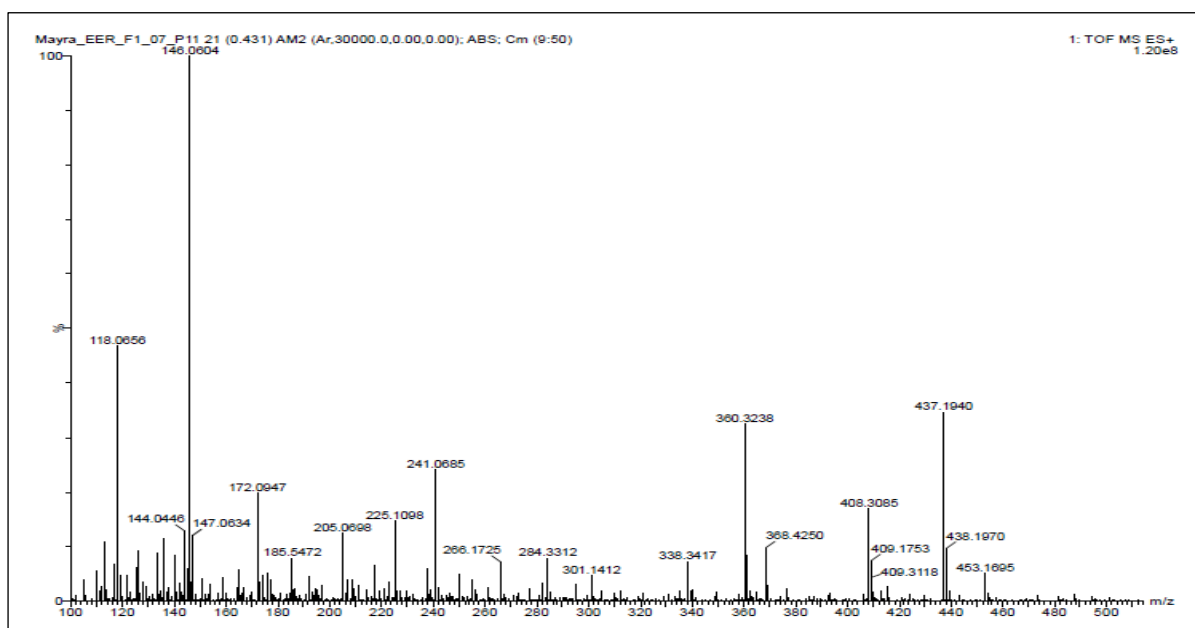
APÊNDICE 61 - Mapa de contornos COSY ampliado de **XIII** (CD_3OD , 14,1 T)



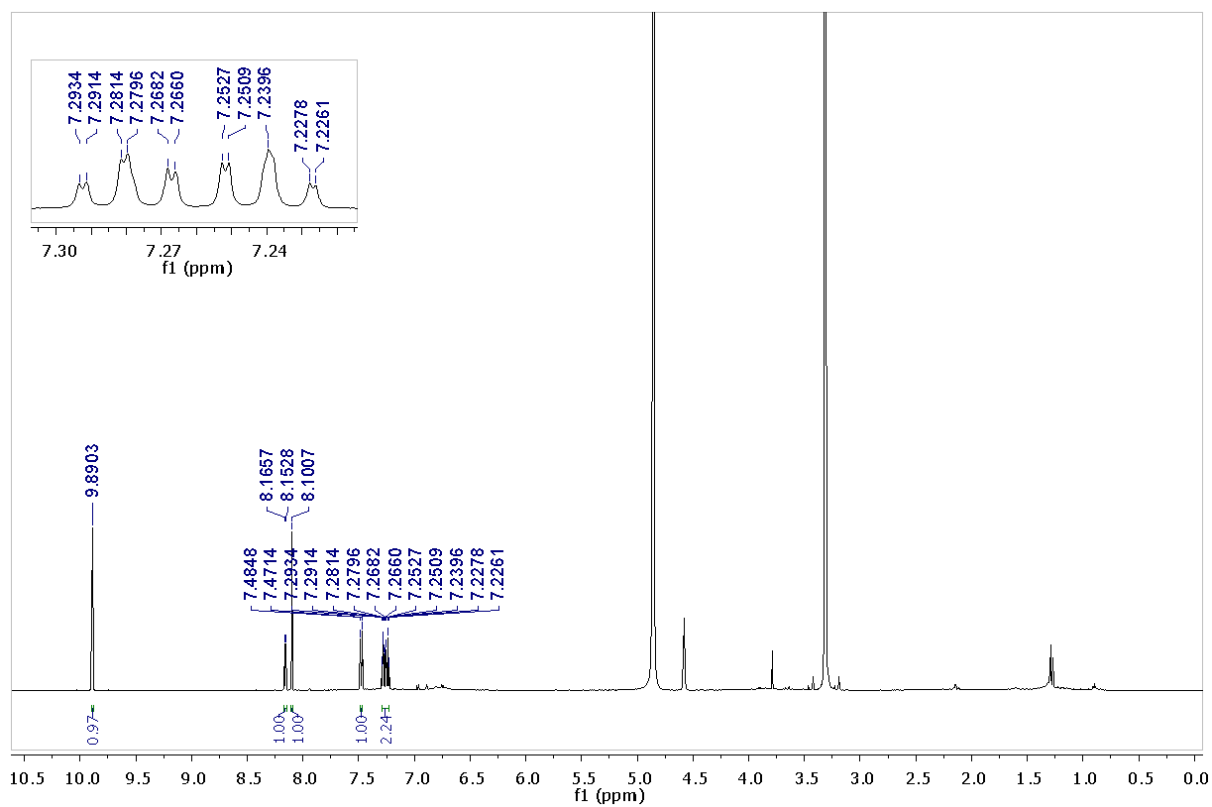
APÊNDICE 62 - Mapa de contornos HSQC ampliado **XIII** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 63 - Mapa de contornos HMBC ampliado **XIII** (CD₃OD, 14,1 T)

APÊNDICE 64 - Espectro de RMN de ^1H de **XIV** (CD_3OD , 14,1 T)**APÊNDICE 65** - Mapa de contornos COSY ampliado de **XIV** (CD_3OD , 14,1 T)

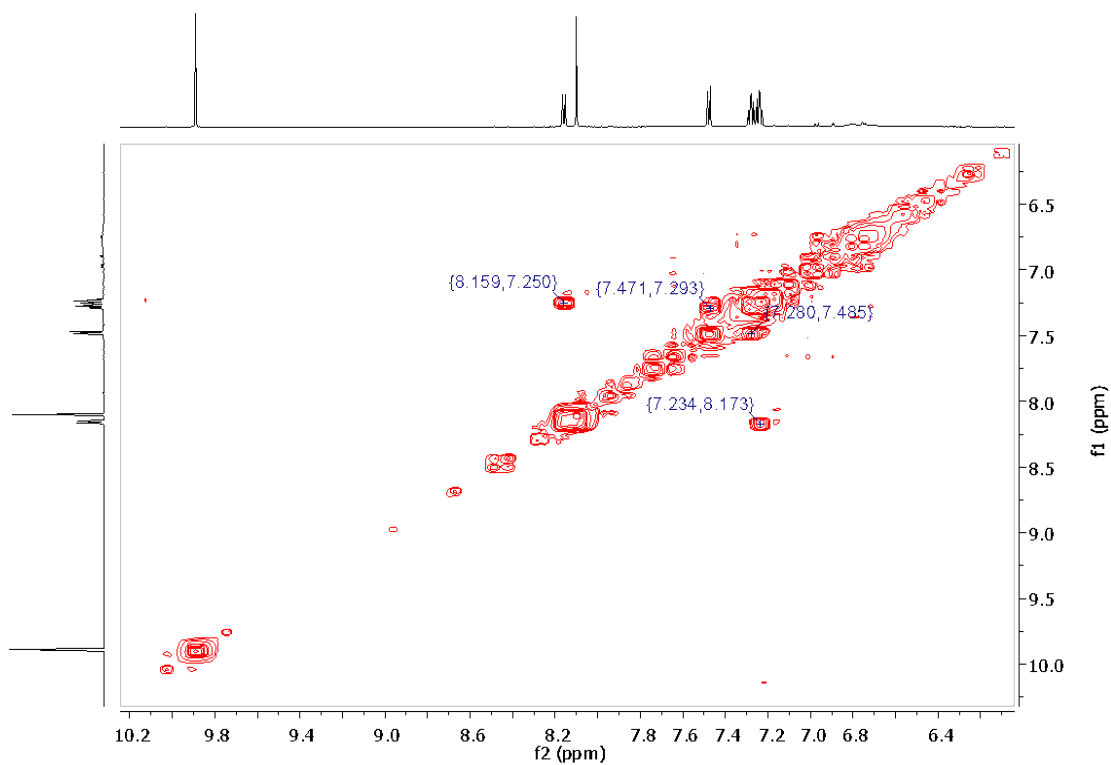
APÊNDICE 66 - Mapa de contornos HSQC ampliado de **XIV** (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 67 - Mapa de contornos HMBC ampliado de **XIV** (CD₃OD, 14,1 T)

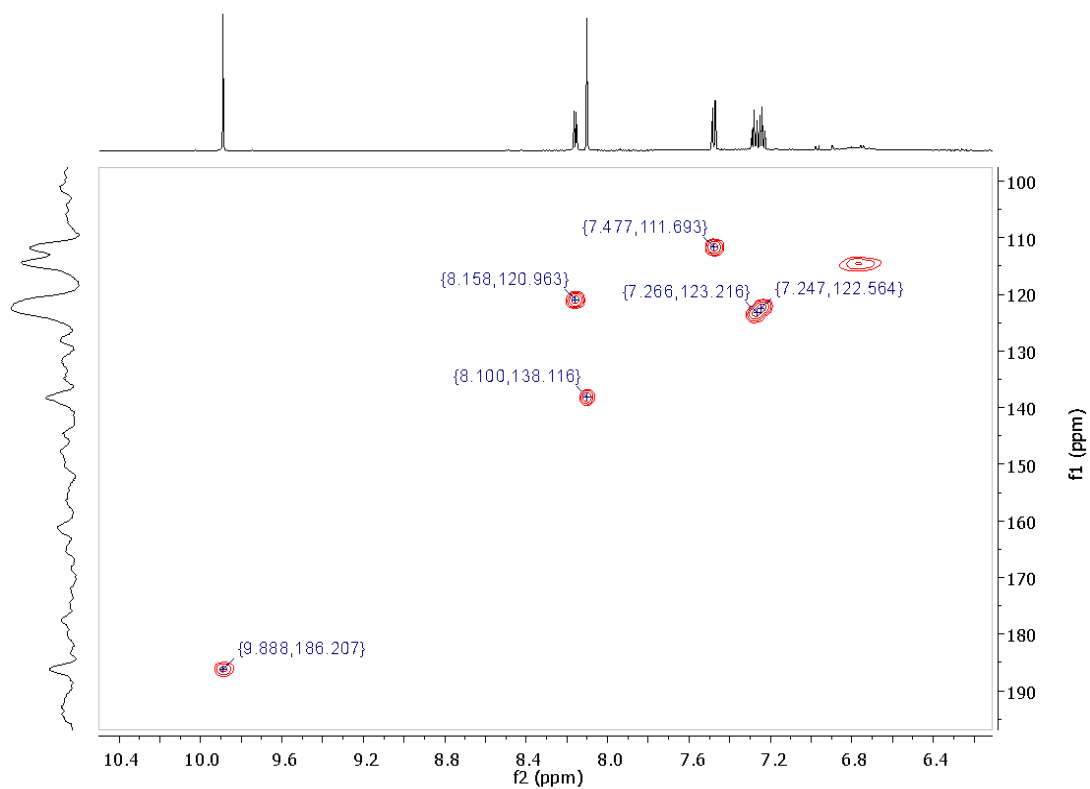
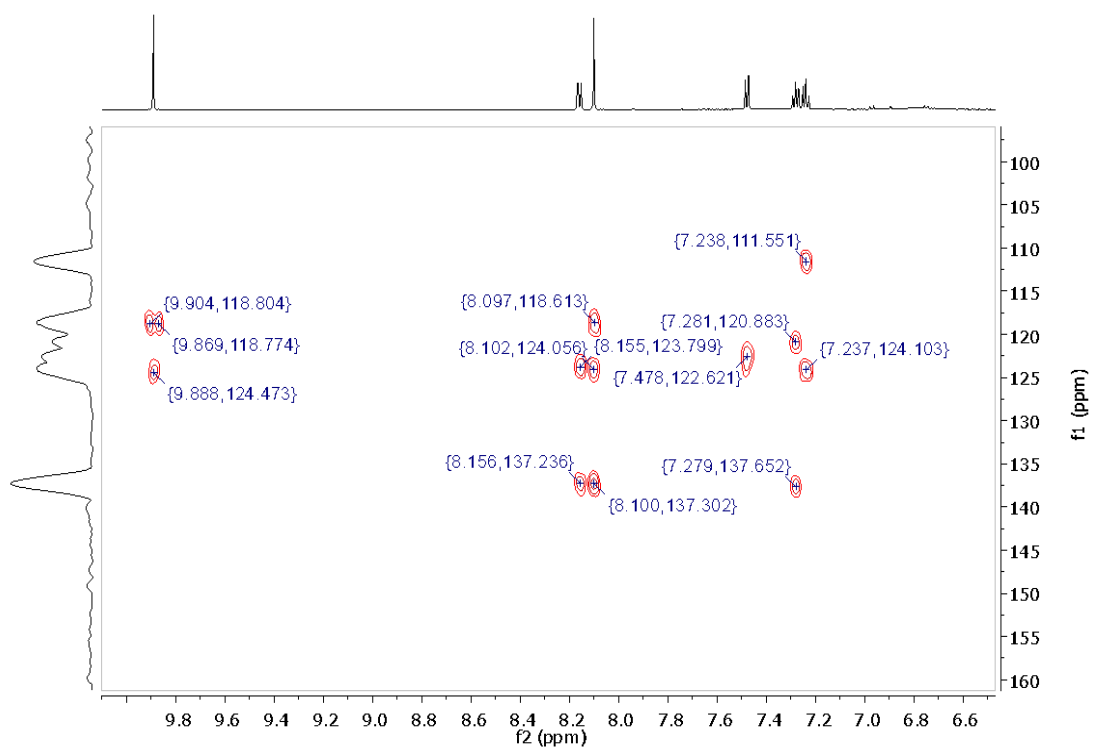
APÊNDICE 68 - Espectro de NOESY 1D de **XIV** com irradiação em δ 3,89 (CD₃OD, 14,1 T)**APÊNDICE 69** - Espectro de massas de alta resolução de **XV** (ESI, +1,20 eV)

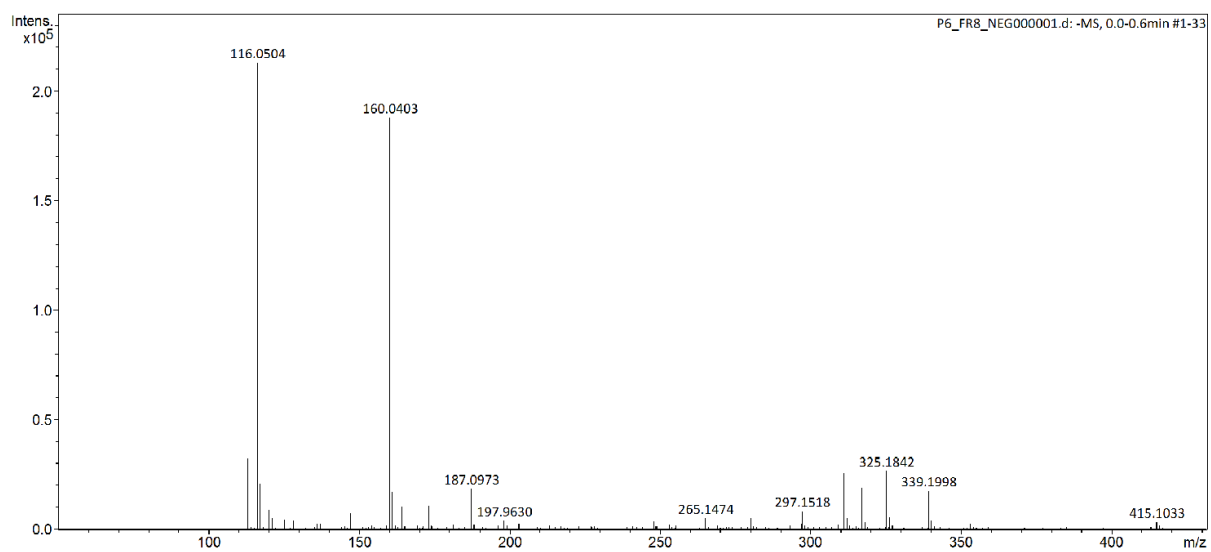
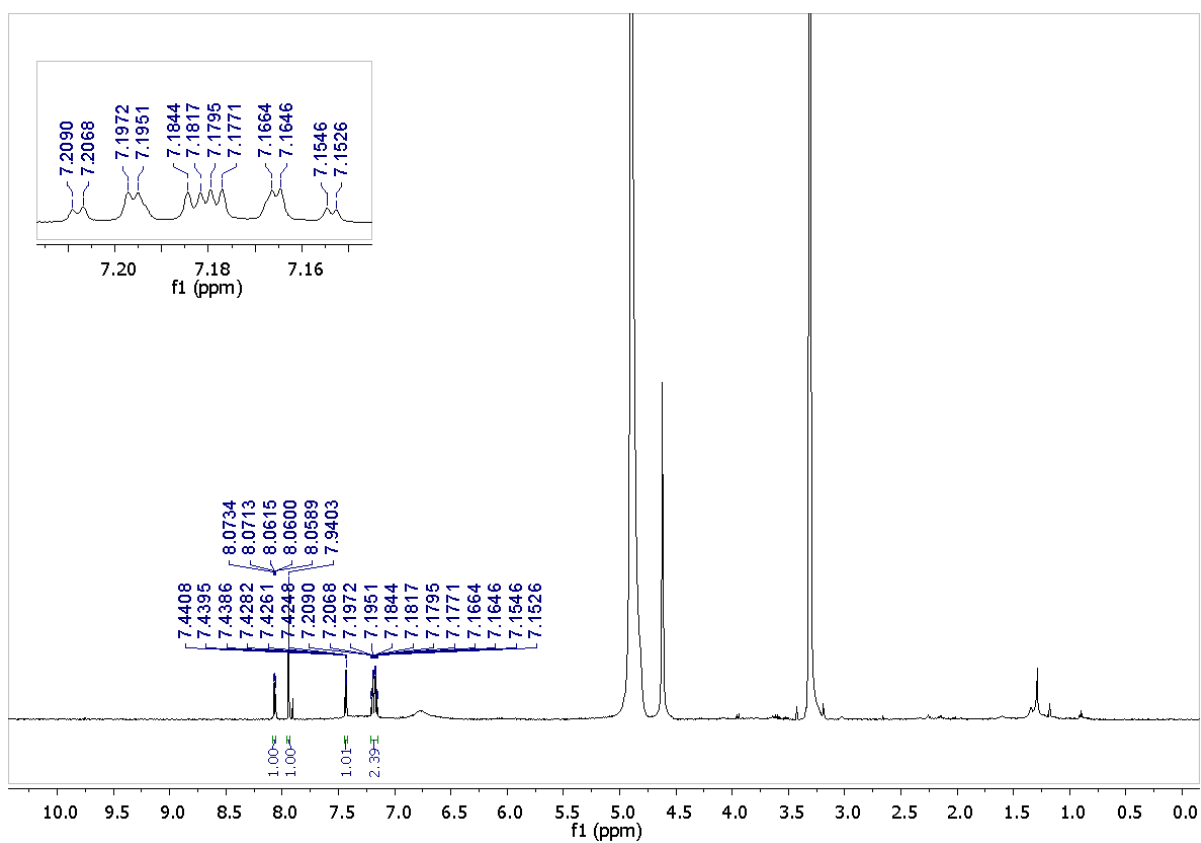
APÊNDICE 70 - Espectro de RMN de ^1H de XV (CD_3OD , 14,1 T)

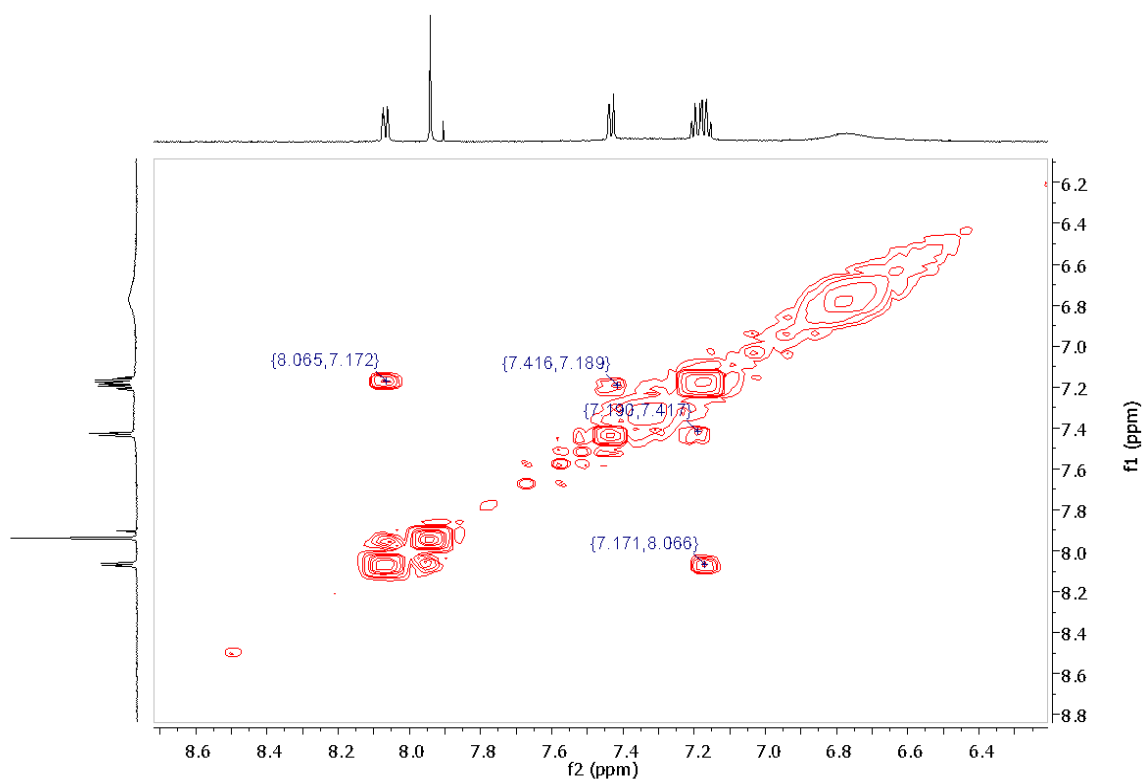
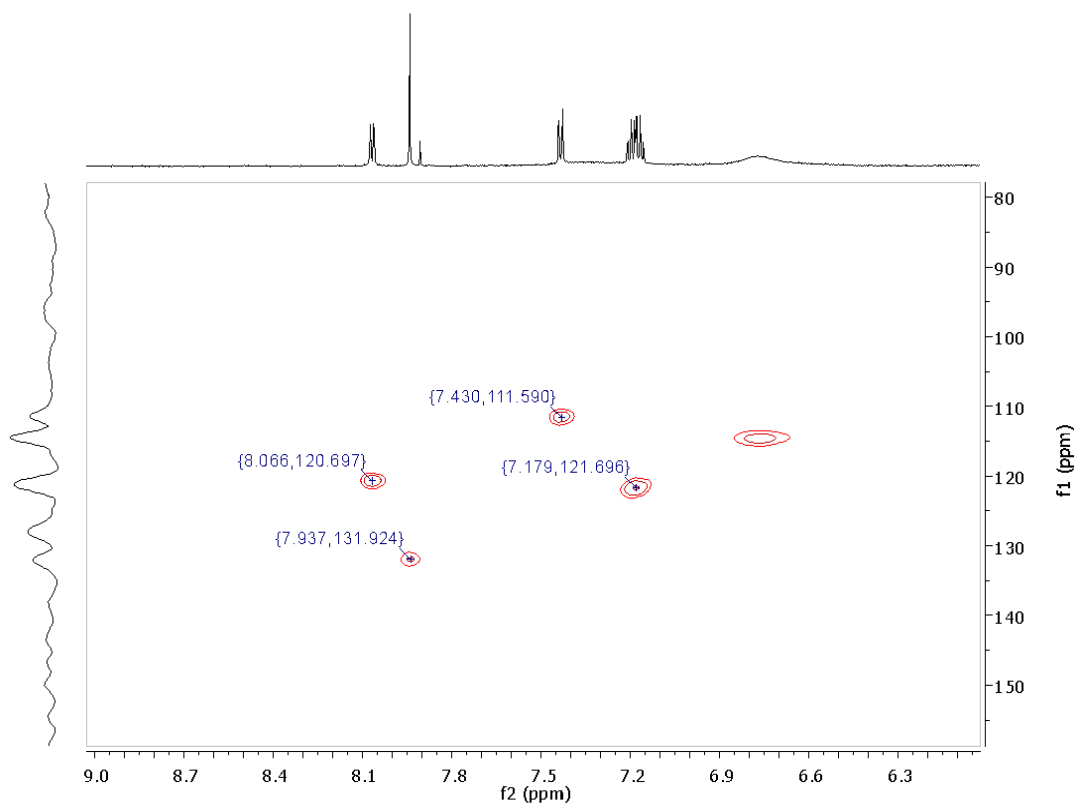


APÊNDICE 71 - Mapa de contornos COSY ampliado de XV (CD_3OD , 14,1 T)

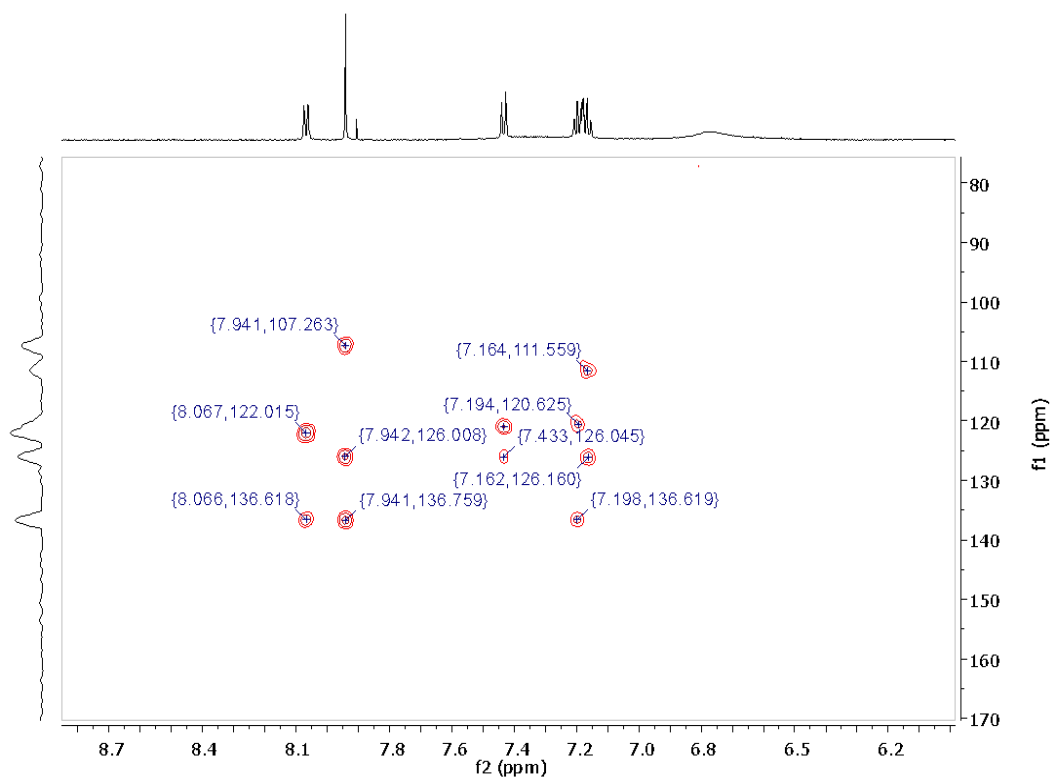


APÊNDICE 72 - Mapa de contornos HSQC ampliado de XV (CD₃OD, 141 T)APÊNDICE 73 - Mapa de contornos HMBC ampliado de XV (CD₃OD, 14,1 T)

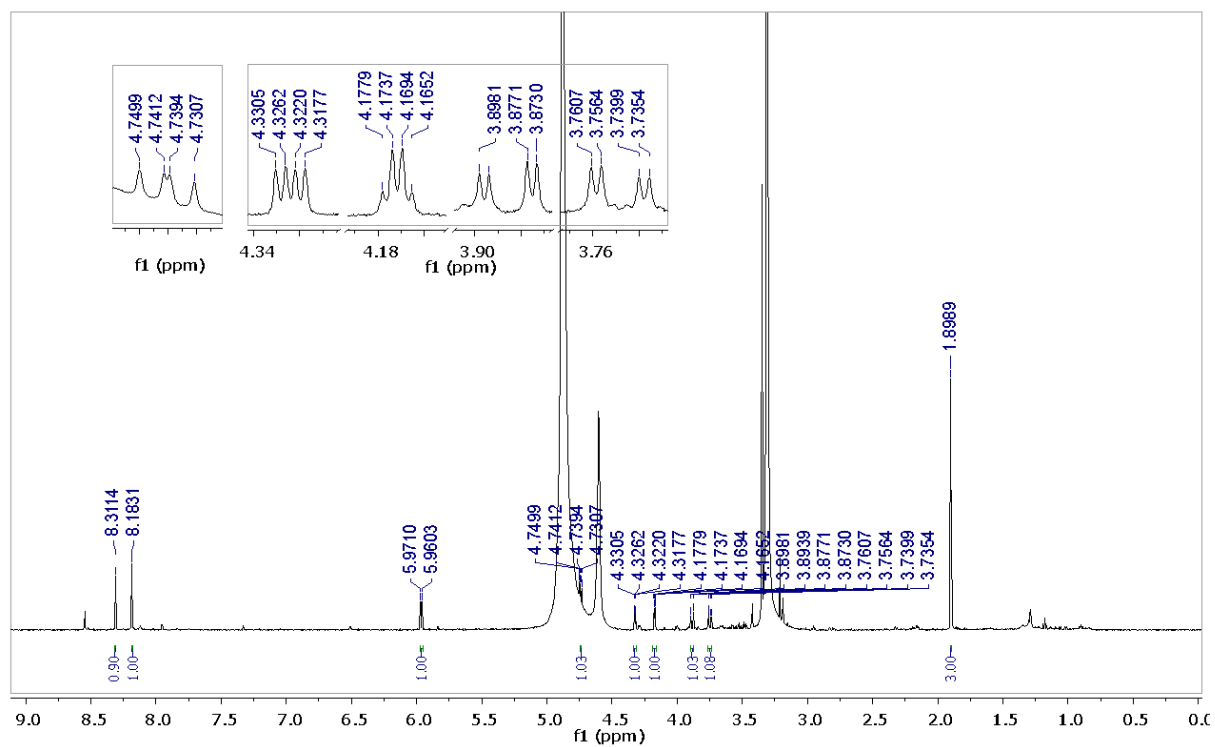
APÊNDICE 74 - Espectro de massas de alta resolução de XVI (ESI, -2,5 eV)

APÊNDICE 75 - Espectro de RMN de ^1H de XVI (CD_3OD , 14,1 T)


APÊNDICE 76 - Mapa de contornos COSY ampliado de XVI (CD₃OD, 14,1 T)APÊNDICE 77 - Mapa de contornos HSQC ampliado de XVI (CD₃OD, 14,1 T)

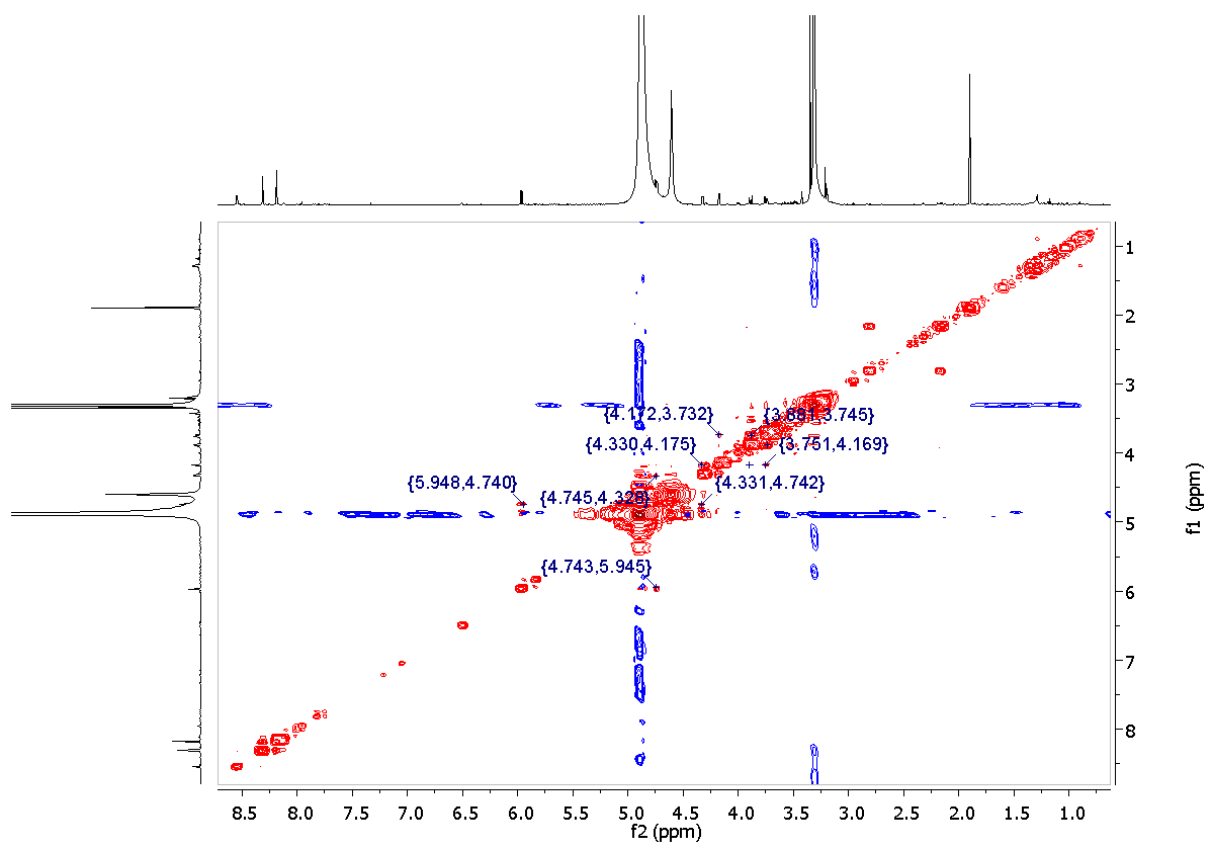
APÊNDICE 78 - Mapa de contornos HMBC ampliado de XVI (CD₃OD, 14,1 T)



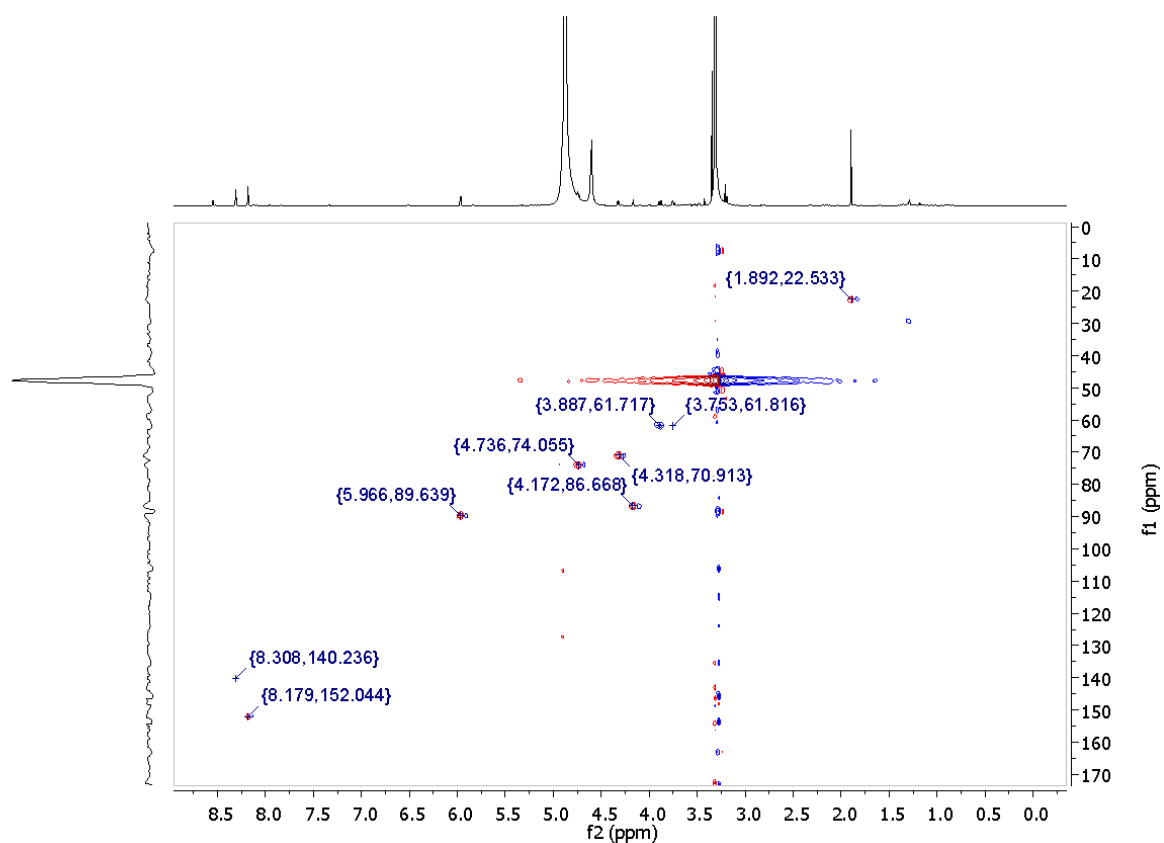
APÊNDICE 79 - Espectro de RMN de ¹H de XVII (CD₃OD, 14,1 T)

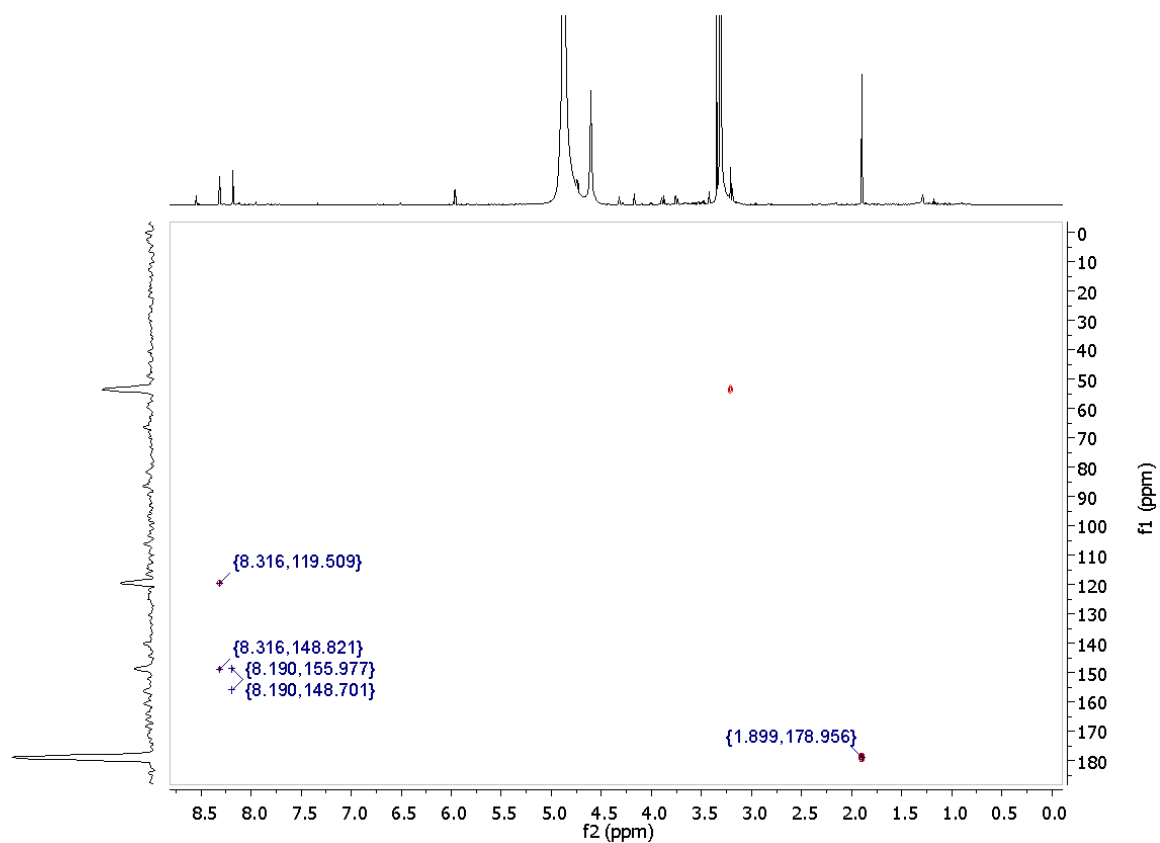


APÊNDICE 80 - Mapa de contornos COSY ampliado de **XVII** (CD₃OD, 14,1 T)

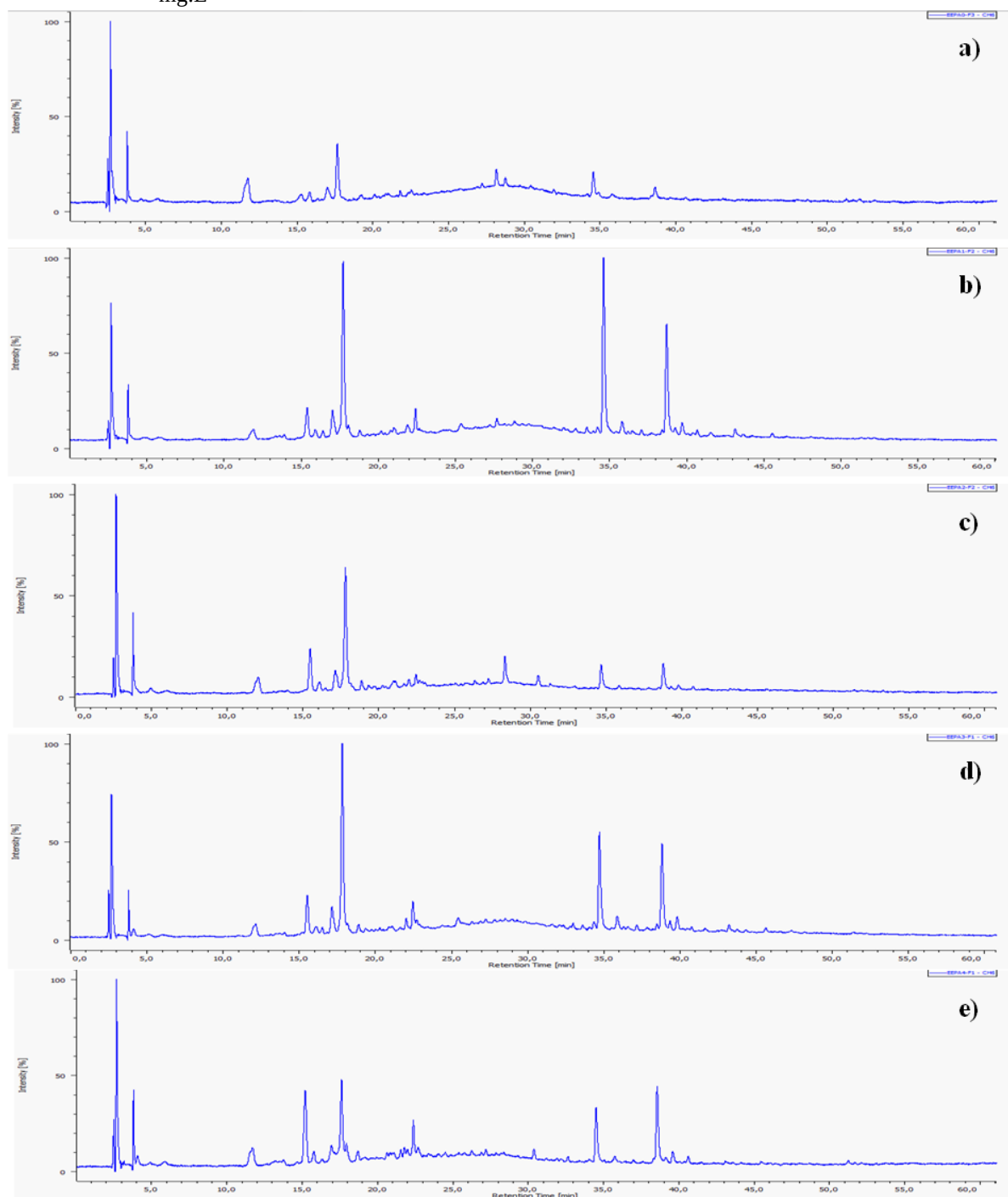


APÊNDICE 81 - Mapa de contornos HSQC de **XVII** (CD₃OD, 14,1 T)

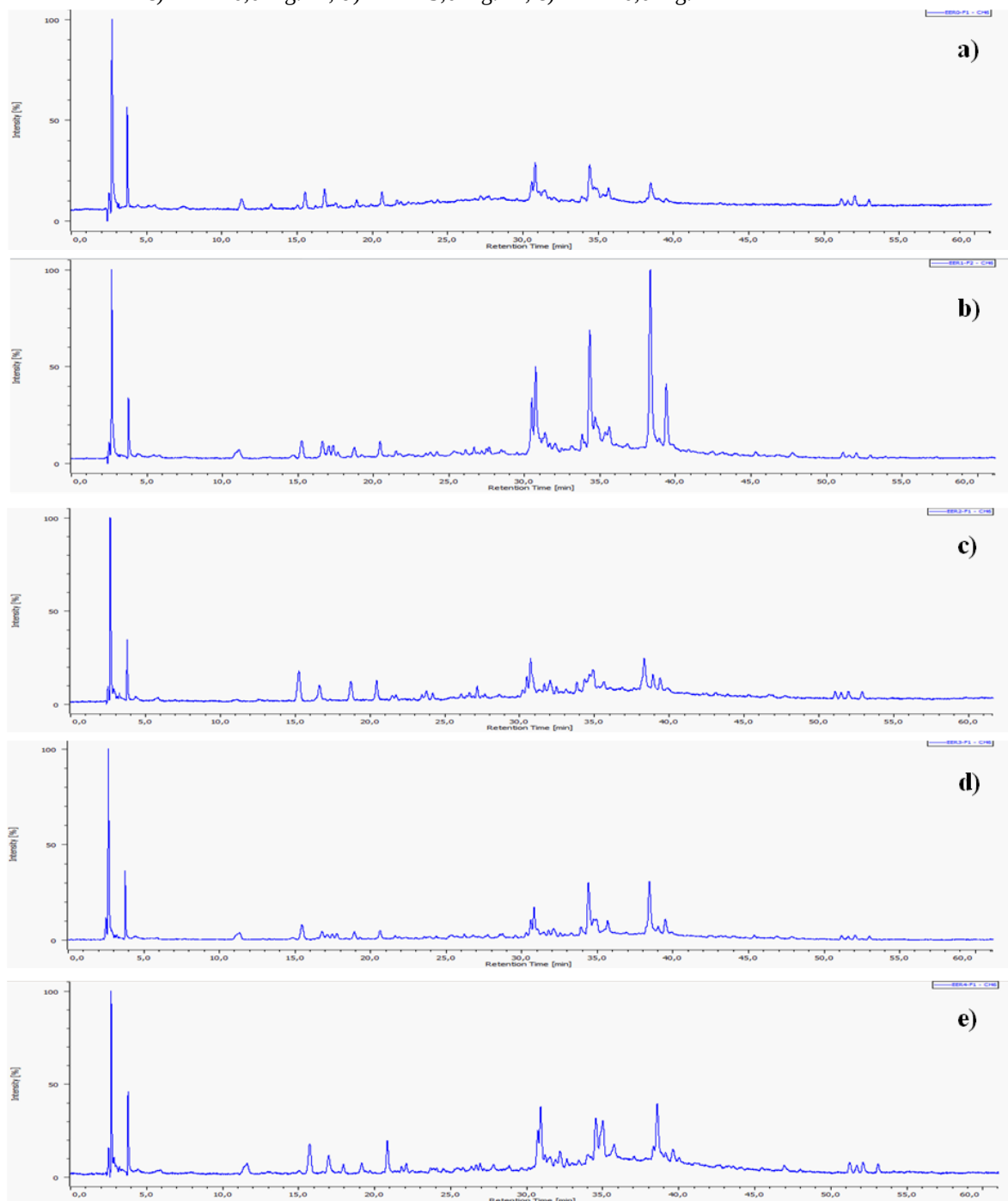


APÊNDICE 82 - Mapa de contornos HMBC de **XVII** (CD₃OD, 14,1 T)

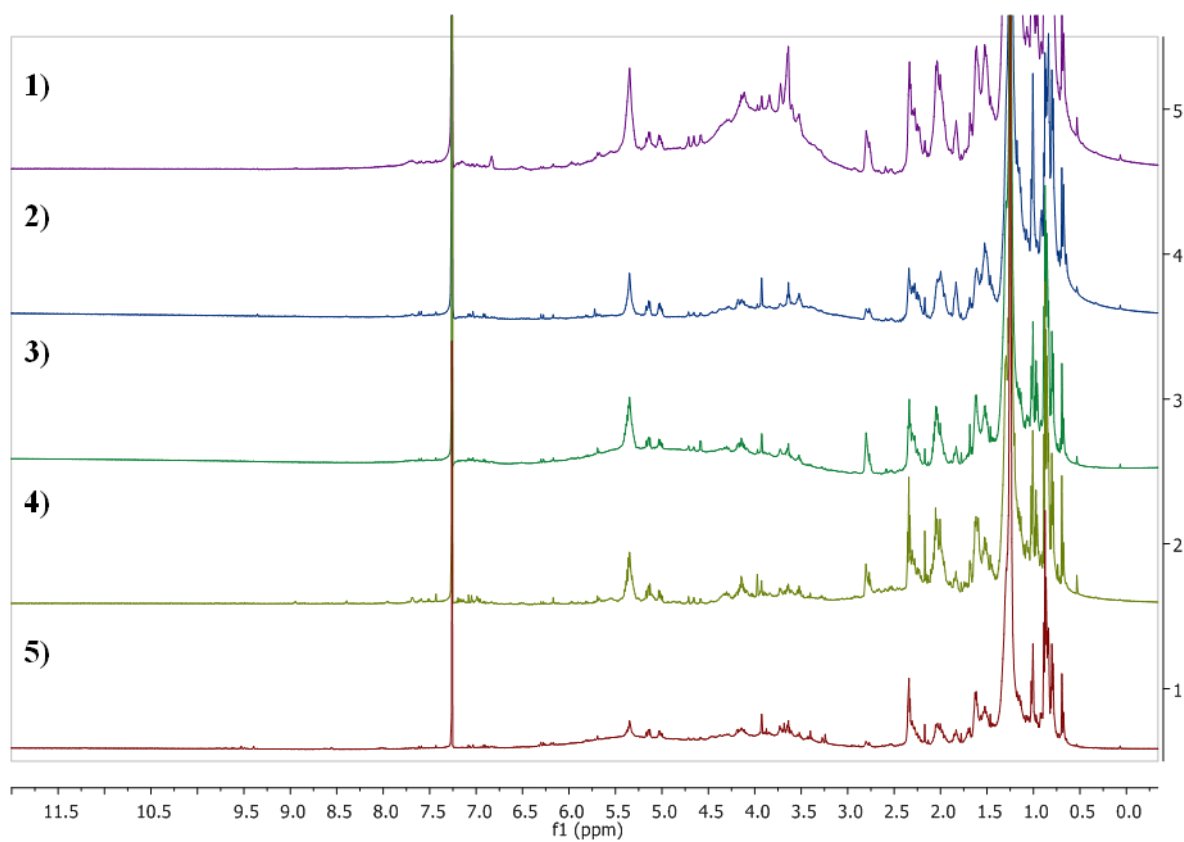
APÊNDICE 83 - Cromatogramas do gradiente exploratório dos extratos etanólicos selecionados da parte aérea de espécimes de *P. crassipes* cultivados na ausência e presença de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$. **a)** EEPA-0,0 mg.L^{-1} ; **b)** EEPA-5,0 mg.L^{-1} ; **c)** EEPA-10,0 mg.L^{-1} ; **d)** EEPA-15,0 mg.L^{-1} ; **e)** EEPA-20,0 mg.L^{-1}



APÊNDICE 84 - Cromatogramas dos extratos etanólicos selecionados das raízes de espécimes de *P. crassipes* cultivados na ausência e presença de Cd^{2+} , $\lambda = 274 \text{ nm}$. **a)** EER-0,0 mg.L^{-1} ; **b)** EER-5,0 mg.L^{-1} ; **c)** EER-10,0 mg.L^{-1} ; **d)** EER-15,0 mg.L^{-1} ; **e)** EER-20,0 mg.L^{-1}



APÊNDICE 85 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos etanólicos selecionados da parte aérea de espécimes de *P. crassipes* cultivados na presença e ausência de Cd^{2+} (CDCl_3 , 14,1 T). **1)** EER-20,0 mg.L^{-1} ; **2)** EER-15,0 mg.L^{-1} ; **3)** EER-10,0 mg.L^{-1} ; **4)** EER-5,0 mg.L^{-1} ; **5)** EER-0,0 mg.L^{-1}



APÊNDICE 86 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos etanólicos selecionados das raízes de espécimes de *P. crassipes* cultivados na presença e ausência de Cd^{2+} (CDCl_3 , 14,1 T). **1)** EER-20,0 mg.L^{-1} ; **2)** EER-15,0 mg.L^{-1} ; **3)** EER-10,0 mg.L^{-1} ; **4)** EER-5,0 mg.L^{-1} ; **5)** EER-0,0 mg.L^{-1}

