



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



ESTUDO QUÍMICO DE *Aeschynomene filosa*- LEGUMINOSAE

Alene Côrtes de Queiroz e Silva

Co-Orientadora Dra. Luzinátia Ramos Soares

Orientador Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Campo Grande – 2014



ESTUDO QUÍMICO DE *Aeschynomene filosa* - LEGUMINOSAE

Alene Côrtes de Queiroz e Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

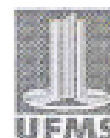
Co-Orientadora: Dra. Luzinátia Ramos Soares

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Campo Grande –Junho/2014



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação () – Tese () – Qualificação

ALUNO(A)
ALENE CÔRTEZ DE QUEIROZ E SILVA

TÍTULO DO TRABALHO
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Aeschynomene Filosa</i> - LIGUMINOSAE

Dissertação de Mestrado em Química, submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Cursos de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 51/2014) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Walmir Silva Garcez	UFMS	
Roberto da Silva Gomes	UFGD	
Ana Camila Micheletti	UFMS	

Campo Grande, 18 de julho de 2014.

*Com muito amor, dedico este trabalho à
minha mãe, Lília Côrtes de Queiroz.*

*Uma mãe amável, batalhadora e
sonhadora!*

A Deus, por me proteger, guiar e amparar nos momentos tristes.

À minha família, em especial minha querida mãezinha, Lília Côrtes de Queiroz, pelo carinho e apoio, por sempre me fazer seguir em frente.

À minha co-orientadora, Luzinátia Ramos Soares, pela compreensão e valiosos conhecimentos. Obrigada pela amizade e por ter me mostrado, nos momentos difíceis, qual o melhor caminho seguir.

Ao meu orientador, Walmir Silva Garcez, pelos conhecimentos ensinados. Obrigada por confiar a mim a realização deste trabalho.

À Patrícia de Oliveira Figueiredo, pela preciosa amizade e pelos nossos *happy hours*, que proporcionaram momentos de descontrações essenciais para realização deste trabalho.

Aos amigos, Andressa Baldissera, Fernando Henrique, Nariane Ferreira, Natascha Freitas, Paulo Fernandes e Taís Leonel pelo apoio e amizade incondicional.

A Jeferson Nazaro, Vali J. Pott, Suzana Neves Moreira e Walmir S. Garcez, pela coleta do material vegetal.

À aluna de iniciação científica Carolina Schiavon da Silva Mauro, pela ajuda, dedicação e atenção na realização deste trabalho.

À Edilene D. Rodrigues pela amizade e pelos valiosos ensinamentos de RMN.

Ao técnico Luiz Leonardo de Souza Viana pela ajuda prestada no HPLC e pela obtenção dos espectros de massas.

À técnica Luciana Marçal Ravaglia, pela realização dos experimentos de rotação ótica e RMN.

Aos técnicos Vinícius Palaretti e Jacqueline Mendonça pela obtenção dos espectros de RMN-2D e massas.

Aos amigos de laboratório Danilo Tófoli, Luís Henrique de O. Almeida, Mariana Fujita, Nathália Oyama, Pedro Henrique Simas, Ulana Sarmento e Kátia Wolff pelos momentos

AGRADECIMENTOS

de descontração. Em especial, ao Alex Fonseca pela ajuda prestada nos momentos de maior tensão desta dissertação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, ao CNPq, a PROPP/UMS e à FUNDECT, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, obrigada.

*Suba o primeiro degrau com fé. Não é
necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.*

Martin Luther King

RESUMO

As plantas aquáticas desempenham papel importante nos ecossistemas onde ocorrem e muitas são utilizadas na medicina popular. *Aeschynomene filosa* Mart. ex Benth. (Leguminosae) é uma macrófita aquática que não foi, até o momento, investigada sob o ponto de vista de sua composição química. Plantas da família Leguminosae, em geral, são ricas em metabólitos secundários, muitos deles bioativos, o que torna relevante o estudo químico desta planta. Esta dissertação trata do estudo químico da parte aérea de *Aeschynomene filosa*, coletada numa região permanentemente alagada próxima a Campo Grande/ MS. O estudo da parte aérea da planta foi desenvolvido utilizando-se técnicas clássicas de extração com etanol, partição e de cromatografia. Os procedimentos cromatográficos de fracionamento e purificação de compostos realizados com as fases hexânica e acetato de etila, provenientes da partição do extrato etanólico, levaram ao isolamento de nove substâncias. Estas tiveram suas estruturas elucidadas ou foram identificadas como sendo: (6aS,11aS)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**), (6aS,11aS)-3-hidróxi-9-dimetoxipterocarpano ou (+)-medicarpina (**2**), cafeato de docosila (**3**), cafeato de tetracosila (**4**), estigmasterol (**5**), quercetina (**6**), 3-O- α -L-arabinofuranosíl quercetina (**7**), 3-O- β -D-glucopiranosíl quercetina (**8**) e 3-O- β -D-galactopiranosíl quercetina (**9**). Destas substâncias, **1** é inédita na literatura, enquanto **2**, **3**, **4**, **8** e **9** estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Aeschynomene* e **5**, **6** e **7** já haviam sido caracterizadas anteriormente no gênero. O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi submetido à avaliação da atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e a toxicidade frente à *Artemia salina*, mostrando-se inativo em ambos os testes.

Palavras-chave: *Aeschynomene filosa*, pterocarpanos, flavonoides glicosilados



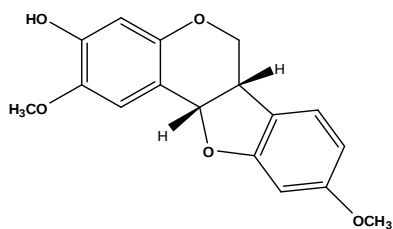
ABSTRACT

Aquatic plants play an important role in the ecosystems in which they occur and many of them are used in folk medicine. *Aeschynomene filosa* Mart. ex Benth. (Leguminosae) is an aquatic macrophyte that has not been investigated from the point of view of their chemical composition. Leguminosae plants are generally rich in secondary metabolites, and many of which are bioactive, highlighting the relevancy of this plant chemical study. This dissertation deals with the chemical study of the aerial part of *Aeschynomene filosa*, collected on a permanently flooded region near to Campo Grande/MS. The study of the aerial part of the plant was developed using classical techniques of extraction with ethanol, partitioning and chromatography. The chromatographic fractionation and purification procedures carried out with hexane and ethyl acetate phases, these ones obtained from the partitioning of the ethanol extract, led to the isolation of nine substances. The substances structures were elucidated or identified as: (6aS,11aS)-3-hydroxy-2,9-dimethoxypterocarpan (**1**), (6aS,11aS)-3-hydroxy-9-methoxypterocarpan (**2**), docosyl caffeate (**3**), tetracosyl caffeate (**4**), stigmasterol, (**5**), quercetin (**6**), quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside (**7**), quercetin-3-O- β D-glucopyranoside (**8**) e quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (**9**). Among them, **1** is unprecedented in the literature, while **2**, **3**, **4**, **8** and **9** are being reported for the first time in the *Aeschynomene* genus and **5**, **6** and **7** had already been characterized in this genus. The ethanol extract of the aerial part of *Aeschynomene filosa* was submitted to two bioassays (larvicidal activity against *Aedes aegypti* and toxicity against *Artemia salina*) and it was not active in these tests.

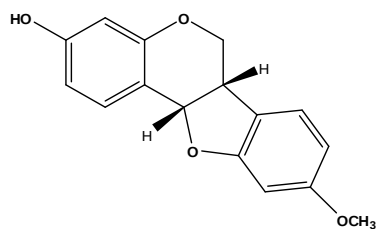
Keywords: *Aeschynomene filosa*, pterocarpan, glycosylated flavonoids.



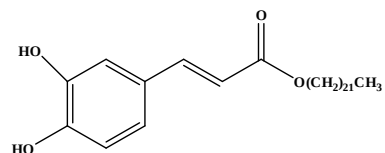
Substâncias Isoladas de *Aeschynomene filosa*.



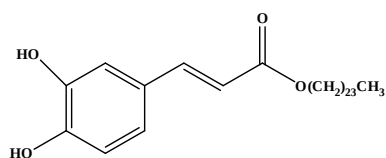
(6a*S*,11a*S*)-3-hidroxi-2,9-dimetoxipterocarpano (1)



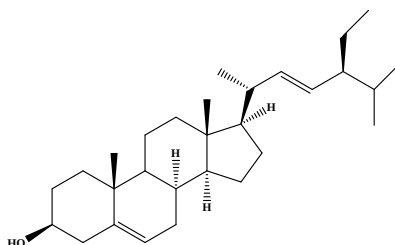
(6a*S*,11a*S*)-medicarpina (2)



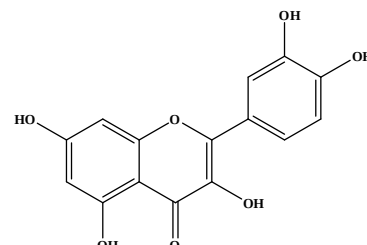
cafeato de docosila (3)



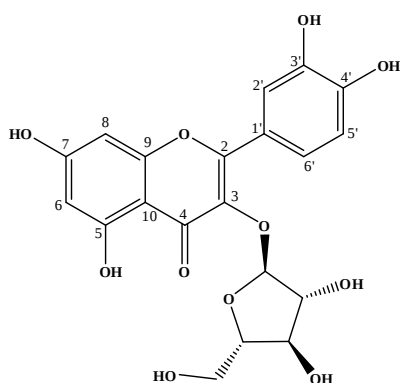
cafeato de tetracosila (4)



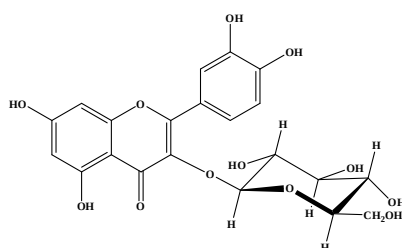
estigmasterol (5)



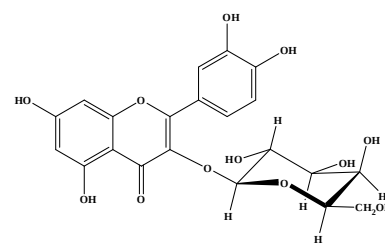
quercetina (6)



3-O-α-L-arabinofuranosil quercetina (7)



3-O-β-D-glucopiranosil quercetina (8)



3-O-β-D-galactopiranosil quercetina (9)



Sumário

1	INTRODUÇÃO -----	1
1.1	Família Leguminosae-----	2
1.2	Gênero <i>Aeschynomene</i> -----	3
1.3	Espécie <i>Aeschynomene filosa</i> Mart. ex Benth.-----	4
2	OBJETIVOS-----	1
2.1	Objetivo Geral-----	1
2.2	Objetivos Específico-----	1
3	PARTE EXPERIMENTAL-----	7
3.1	Especificações dos materiais e equipamentos utilizados-----	7
3.2	Coleta e Identificação do Material Vegetal-----	8
3.3	Obtenção e Partição do Extrato Etanólico-----	8
3.4	Estudo Químico da Fase Hexânica-----	9
3.4.1	Estudo químico da fração AFH- 10-----	9
3.4.1.1	Estudo Químico da fração AFH10- 7, proveniente da fração AFH- 10-----	10
3.4.1.2	Estudo Químico da fração AFH10- 8, proveniente da fração AFH- 10-----	10
3.5	Estudo Químico da Fase Acetato de Etila-----	12
3.5.1	Estudo químico da fração AFA-1.2-----	12
3.5.1.1	Estudo Químico da fração FA12- 8, proveniente da fração AFA- 1.2-----	12
3.6	Estudo Químico da Fase Hidrometanólica-----	14
3.7	Atividades Biológicas-----	15
3.7.1	Ensaio de letalidade sobre <i>Artemia salina</i> -----	15
3.7.2	Ensaio da Atividade Larvícida contra <i>Aedes aegypti</i> -----	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	17
4.1	(6aS, 11aS) 3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (1)-----	18
4.2	(6aS,11aS)-3-hidróxi-9-metoxipterocarpano (2)-----	30
4.3	Pterocarpanos-----	41
4.4	Cafeato de docosila (3) e Cafeato de tetracosila (4)-----	43
4.1	Estigmasterol (5)-----	49
4.2	Quercetina (6)-----	53
4.3	3-O- α -L-arabinofuranosil quercetina (7)-----	59



4.4	3-O- β -D-glicopiranosíl quercetina (8) e 3-O- β -D-galactopiranosíl quercetina (9)-----	66
4.5	Avaliação das Atividades Biológicas-----	75
4.5.1	Avaliação da letalidade sobre <i>Artemia salina</i> -----	75
4.5.2	Avaliação da atividade larvicida contra o <i>Aedes aegypti</i> -----	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	79
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	80



Lista de Tabelas

Tabela 1 - Levantamento bibliográfico do gênero <i>Aeschynomene</i>	3
Tabela 2 - Frações provenientes da fase hexânica em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh).	9
Tabela 3 - Frações provenientes da fase acetato de etila [cromatografia em coluna com sílica C-18 (40-60 mesh)].	12
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC de 1	21
Tabela 5 - Dado de RMN 1D e 2D de 2	32
Tabela 6 - Dado de RMN de ^1H e ^{13}C de 2 e da (+)-medicarpina (HERATH <i>et.al</i> , 1997). 33	
Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C de AH10- 11 e da literatura (GIBBONS <i>et.al</i> , 1999)... 45	
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C de 5 e do Estigmasterol (Kojima <i>et.al</i> , 1990).	50
Tabela 9 - Dado de RMN de ^1H e ^{13}C de 6 e da quercetina (GÜVENALP & DEMIREZER, 2005).....	55
Tabela 10 – Valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C da aglicona de 7 e da quercetina (WENKERT & GOTTLIEB, 1977).....	60
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 7 e da avicularina (LU & FOO, 1997).	62
Tabela 12 – Valores de descolamento químico de RMN de ^{13}C da aglicona de 8 e 9 e da Quercetina (6).	67
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H de 8 e 9 e de isoquercitrina e hiperina (KAZUMA* <i>et al.</i> ; 2003, GÜVENALP & DEMIREZER** , 2005).	69
Tabela 14 - Dados de RMN de ^{13}C de 8 e 9 e de isoquercitrina e hiperina (KAZUMA* <i>et al.</i> ; 2003, GÜVENALP & DEMIREZER** , 2005).	70



Lista de Espectros

Espectro 1 – Espectro de RMN de ^{13}C da Fase Hidrometanólica (MeOH/ capilar D_2O)	14
Espectro 2 - Espectro de massas de alta resolução, ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo de 1 .	22
Espectro 3 - Espectro na região do Infravermelho de 1 (Pastilha KBr).	23
Espectro 4 - Espectro de RMN de ^1H de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	23
Espectro 5 - Espectro de RMN de ^{13}C de 1 (CDCl_3 , 100 MHz).	24
Espectro 6 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de 1 (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).	24
Espectro 7 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de 1 (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).	25
Espectro 8 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 1 (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).	25
Espectro 9 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 1 na região de 7,2 – 5,5 ppm(CDCl_3 , 500 e 100 MHz).	26
Espectro 10 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 1 na região de 4,3 – 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).	26
Espectro 11 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	27
Espectro 12 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	27
Espectro 13 - Espectro de <i>J-resolved</i> de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	28
Espectro 14 – Expansão do espectro de <i>J-resolved</i> de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	28
Espectro 15 - Expansão do espectro de <i>J-resolved</i> de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).	29
Espectro 16 - Espectro na região do Infravermelho de 2 (Pastilha de KBr).	34
Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).	34
Espectro 18 - Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (CDCl_3 , 75 MHz).	35
Espectro 19 - Espectro de RMN DEPT 135° de 2 (75 MHz, CDCl_3).	35
Espectro 20 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de 2 (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).	36
Espectro 21 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de 2 (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).	36



Espectro 22 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 2 (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).....	37
Espectro 23 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 2 na região de 7,5 – 6,3 ppm (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).	37
Espectro 24 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de 2 na região de 5,6 – 3,5 ppm (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).	38
Espectro 25 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	38
Espectro 26 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	39
Espectro 27 - Espectro de <i>J-resolved</i> de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	39
Espectro 28 – Ampliação do espectro de <i>J-resolved</i> de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).	40
Espectro 29 - Ampliação do espectro de <i>J-resolved</i> de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).	40
Espectro 30 - Cromatograma da fração AFH10- 11 e os espectro de massas (EI^-) de 3 e 4 , respectivamente.	46
Espectro 31 - Espectro na região do Infravermelho de 3 e 4 (Pastilha de KBr).....	47
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H de 3 e 4 (CDCl_3 , 300MHz).....	47
Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C de 3 e 4 (CDCl_3 , 75 MHz).....	48
Espectro 34 - Espectro de RMN DEPT 135° de 3 e 4 (75 MHz, CDCl_3).....	48
Espectro 35 - Cromatograma da fração AFHF- 11 e o espectro de massas (EI^-) de 5	51
Espectro 36 - Espectro de RMN de ^1H de 5 (CDCl_3 , 300 MHz).....	51
Espectro 37 - Espectro de RMN de ^{13}C de 5 (CDCl_3 , 75 MHz)	52
Espectro 38 – Espectro de Massas (EI^-) de 6	56
Espectro 39 - Espectro na região do Infravermelho de 6 (Pastilha de KBr).	56
Espectro 40 - Espectro de RMN de ^1H de 6 (MeOD , 300 MHz).	57
Espectro 41 - Espectro de RMN de ^{13}C de 6 (MeOD , 75 MHz).	57
Espectro 42 - Espectro de RMN DEPT 135° de 6 (MeOD , 75 MHz).....	58
Espectro 43 - Espectro na região do Infravermelho de 7 (Pastilha KBr).	63
Espectro 44 - Espectro de RMN de ^1H de 7 ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).	63
Espectro 45 - Espectro de RMN de ^{13}C de 7 ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz).	64
Espectro 46 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 7 ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz).....	64



Espectro 47 - Espectro de RMN DEPT 135° de 7 (DMSO- <i>d</i> 6, 75 MHz).	65
Espectro 48 - Espectro na região do Infravermelho de 8 e 9 (Pastilha KBr).	71
Espectro 49 - Espectro de RMN de ¹ H de 8 e 9 (MeOD, 300 MHz).	71
Espectro 50 - Espectro de RMN de ¹³ C de 8 e 9 (MeOD, 75 MHz).	72
Espectro 51 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de 8 e 9 na região de 167 – 135 ppm (MeOD, 75 MHz).	72
Espectro 52 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de 8 e 9 na região de 124 – 94 ppm (MeOD, 75 MHz).	73
Espectro 53 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de 8 e 9 na região de 79 – 61 ppm (MeOD, 75 MHz).	73
Espectro 54 - Espectro de RMN DEPT 135° de 8 e 9 (MeOD, 75 MHz).	74



Lista de Fluxogramas e Figuras

Figura 1 – <i>Aeschynomene filosa</i> Mart. Ex Benth. (LIMA et al., 2006) ¹ -----	4
Figura 2 - Região da coleta (A). Estados onde é encontrada no Brasil (B) ² . -----	4
Fluxograma 1 - Sequência de fracionamento da fase hexânica. -----	11
Fluxograma 2 - Sequência de fracionamento da Fase Acetato de Etila -----	13
Figura 3 - Esqueleto flavonoídico do tipo pterocarpano. -----	18
Figura 4 – Estruturas propostas para 1 . -----	19
Figura 5 - (6aS,11aS)-3- hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (1). -----	20
Figura 6 - Estrutura parcial de 2 e Estrutura molecular de 1 . -----	30
Figura 7 - (6aS,11aS)-Medicarpina (2). -----	31
Figura 9 - Cafeato de docosilo (3)e cafeato de tetracosilo (4).-----	44
Figura 10 - Estigmasterol (5)-----	49
Figura 11 - Quercetina (6). -----	54
Figura 12 - 3-O- α -L-arabinofuranosil quercetina (7).-----	61
Figura 13 - Estrutura Química da Isoquercitrina (8) e da Hiperina (9).-----	68



Lista de Abreviaturas e Siglas

Acetona- <i>d</i> 6	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etila
Anfo B	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Análítica
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG/EM	Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLO	Cloranfenicol
CL ₅₀	Concentração Letal Média
<i>d</i>	Dubleto
DI	Inserção Direta
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
<i>ddd</i>	duplo Duplo Dubleto
DEPT	<i>Distortionless enhancenment by polarization transfer</i>
<i>dl</i>	Dubleto Largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
D ₂ O	Água deuterada
EI ⁺	Impacto de Elétron
EM	Espectro de Massas
EtOH	Etanol
HEX	Hexano



HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>J-resolved</i>	<i>J-resolved spectroscopy</i>
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega - Hertz
mult	multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação Massa Carga
NP	Difenilborinato de 2-aminoetila em MeOH
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PEG	Polietilenoglicol em EtOH
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto Largo
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta



1 INTRODUÇÃO

As plantas se constituem, historicamente, na principal fonte primária de substâncias biológica e farmacologicamente ativas. Elas produzem e acumulam centenas de micromoléculas para a sua defesa, regulação e adaptação, sendo, portanto, biologicamente ativas. Muitas substâncias produzidas por plantas possuem atividades contra insetos, fungos, bactérias e patógenos em geral, como uma forma de defesa principalmente nos ambientes tropicais e equatoriais, onde a biodiversidade de microrganismos, insetos e animais é prolífera. São essas substâncias que o homem aprendeu a utilizar como medicamento desde os tempos remotos e que têm despertado o interesse da indústria farmacêutica nos dias atuais (O'NEILL, 1993).

As plantas aquáticas desempenham importante papel nos ecossistemas onde ocorrem (NIERING, 1985) e também são de interesse econômico, como apícola, ornamental, têxtil, alimentar, forrageiro, medicinal, despoluidor, conservacionista, etc. (POTT & POTT, 2000). Muitas destas são utilizadas na medicina popular, podendo-se citar a *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro), utilizada para tratar problemas renais e hepáticos (GUARIM NETO, 1987), *Caperonia castaneifolia* (Erva-de-bicho-branca) e *Nymphaea jamesoniana* (Flor-da-noite), úteis no tratamento de úlceras crônicas (CORREA, 1926; CORREA, 1931), *Victoria amazonica* (Forno-d'água), usada como depurativa e cicatrizante (van der BERG, 1986) e *Polygonum punctatum* (Erva-de-bicho), utilizada no tratamento de gonorréia (CORREA, 1909) e pedra na vesícula (RUTTER, 1990). Há também na literatura citações de macrófitas aquáticas com propriedades tóxicas, como por exemplo, *Ipomoea carnea* (Algodão-bravo) (POTT & POTT, 2000), *Lobelia aquatica* (Lobélia-do-charco) (POTT & POTT, 2000) e *Polygonum acuminatum* (Fumo-bravo) (KISSMANN & GROTH, 1995). Em estudos químicos realizados com algumas plantas aquáticas foi caracterizada a presença de esteróides/triterpenóides, taninos, saponinas (HONDA *et al.*, 1990; VELASQUEZ, 1994), alcalóides (LAKSHMAN, 1987), cianoglicosídeos (RAMAMOORTHY & ZARDINI, 1987), ácido tânico e nicotina (VIEIRA, 1992). Desta forma, pode-se observar que macrófitas aquáticas podem ser fontes ricas para a obtenção de metabólitos secundários, porém, pouco se sabe ainda sobre a composição química destas plantas.



1.1 Família Leguminosae

Leguminosae, também conhecida como Fabaceae, é a terceira maior família das angiospermas, com aproximadamente 730 gêneros e 19.400 espécies (MABBERLY, 1997; LEWIS *et al.*, 2005). O Brasil é o país da América do Sul onde esta é considerada uma das mais ricas em espécies, compreendendo cerca de 2.100 espécies e 188 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, distribuídos em quase todas as formações vegetacionais (BARROSO *et al.*, 1991, LIMA, 2000).

Plantas da família Leguminosae são conhecidas por sua habilidade em associar-se a bactérias fixadoras de nitrogênio (SPRENT, 2001) e por recuperar áreas degradadas, utilizando a própria vegetação para proteger o solo da erosão (BERTONI & LOMBARDI NETO 2008).

Quimicamente esta família pode ser caracterizada por uma variedade de metabólitos secundários, tais como: alcaloides (BOLZANI *et al.*, 1995), flavonoides (BORGES-ARGÁEZ *et al.*, 2000), compostos fenólicos, terpenóides (SILVA *et al.*, 2006), e policetídeos (SOB *et al.*, 2008).



1.2 Gênero *Aeschynomene*

O gênero *Aeschynomene*, pertencente à família Leguminosae, é constituído por aproximadamente 350 espécies, sendo a maioria delas hidrófitas (incluindo tanto herbáceas quanto arbustivas), que se encontram distribuída nos trópicos e em locais relativamente mais quentes das zonas temperadas (RUDD, 1995; 1981). No continente americano foram registrados ou encontrados 160 espécies e no Brasil cerca de 50 espécies (FERNANDES, 1996).

Representantes de *Aeschynomene* podem servir de alimento para bovinos (BRANDÃO, 1992) e para fauna nativa (POTT & POTT, 2000); muitas espécies aquáticas fornecem madeira leve, que pode ser utilizada na produção de papel, pólvora, chapéu ou construção de jangadas (CORRÊA, 1931; 1969; MABBERLEY, 1988). Algumas espécies são fixadoras de nitrogênio (JAMES *et al.* 2001), enquanto outras são invasoras (LORENZI, 1982), tóxicas (KISSMANN & GROTH, 1999), apícolas, medicinais ou ornamentais (POTT & POTT, 1994; 2000).

Quimicamente este gênero é pouco investigado, tendo sido encontrados apenas cinco estudos químico, e destes, dois foram realizados no Brasil (IGNOATO *et al.*, 2012; LATORRE *et al.*, 2011), um realizado nos Estados Unidos (FULLAS *et al.*, 1996), um realizado na China (CHEN *et al.*, 2011), e por fim, um realizado no México (CAAMAL-FUENTES *et al.*, 2013). As espécies estudadas foram *A. fascicularis*, *A. fluminensis*, *A. indica* e *A. mimosifolia*. Destes estudos foram isolados esteroides, flavonoides, neoflavonoide, pterocarpanos, rotenoides e triterpenos, conforme consta na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Levantamento bibliográfico do gênero *Aeschynomene*.

Classes Isoladas	Partes Estudadas	Atividades Biológicas	Planta	Referência
Pterocarpanos	Casca das raízes		<i>Aeschynomene fascicularis</i>	CAAMAL-FUENTES <i>et al.</i> , 2013
Esteroides, flavonoides, Triterpenos	Planta		<i>Aeschynomene indica</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2011
Neoflavonoides	Raiz		<i>Aeschynomene mimosifolia</i>	FULLAS <i>et al.</i> , 1996
Flavonoides, Esteroides	Galhos e Folhas	Anti-inflamatória	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	IGNOATO <i>et al.</i> , 2012
Rotenoides	Sementes	Neurotóxica	<i>Aeschynomene indica</i>	LATORRE <i>et al.</i> , 2011



1.3 Espécie *Aeschynomene filosa* Mart. ex Benth.

Aeschynomene filosa Mart. ex Benth. apresenta duas sinonímias botânicas: *Aeschynomene laxa* Gleason e *Aeschynomene tenerrima* B.L. Rob (TROPICOS.ORG., 2014). (Figura 1)

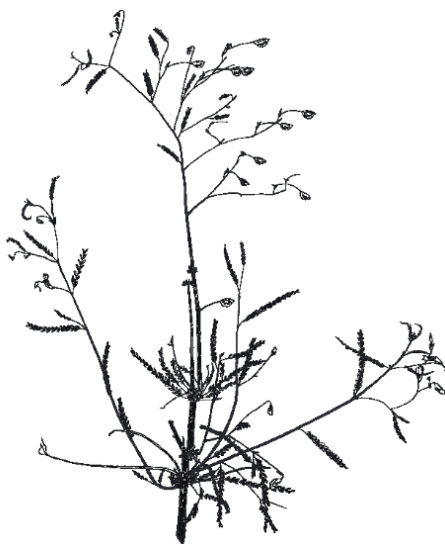


Figura 1 – *Aeschynomene filosa* Mart. Ex Benth. (LIMA et al., 2006)¹

Esta espécie se desenvolve em regiões alagadas, e no Brasil pode ser encontrada nos estados do Amapá, Pará, Roraima, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (LIMA & OLIVEIRA, 2014) (Figura 2).

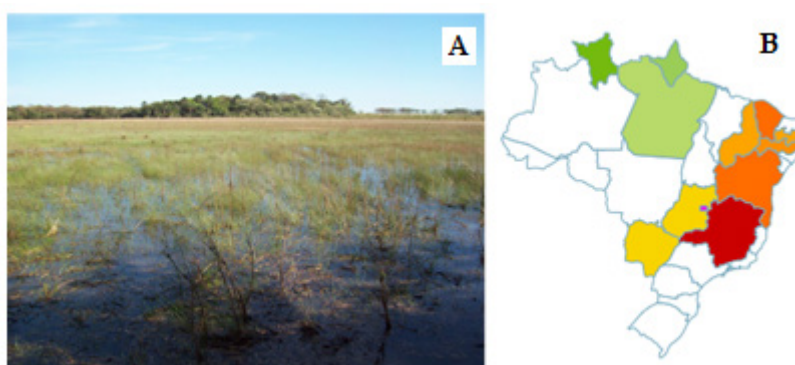


Figura 2 - Região da coleta (A). Estados onde é encontrada no Brasil (B)².

¹LIMA, L. C. P.; SARTORI, A. L. B.; POTT, V. J. *Aeschynomene* L. (Leguminosae, Papilionoideae, Aeschynomene) no Estado de Mato Grosso do Sul. *Hoehnea*, v. 33, n. 4, p. 419-453, 2006.

²Disponível em: <http://migre.me/jaHcf>



Até o presente momento não há na literatura estudos químicos ou biológicos relativos a esta espécie. Estas informações tornam mais interessantes o estudo químico de *A. filosa* sob o ponto de vista quimiosistemático e, também, na busca de metabólitos secundários inéditos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o estudo químico de plantas aquáticas de Mato Grosso do Sul visando à descoberta de substâncias bioativas.

2.2 Objetivos Específico

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa*, coletada em Campo Grande - MS, visando o isolamento e identificação e/ou elucidação estrutural dos metabólitos secundários presentes.
- Avaliar a citotoxicidade frente *Artemia salina* do extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa*.
- Avaliar a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* do extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa*.



3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Especificações dos materiais e equipamentos utilizados

Foram utilizadas para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas solventes do grau PA (Merck, Vetec, QM e Synth) e equipamentos como rotaevaporador R3 (BUCHI) e balança analítica (Gehaka).

Nos processos cromatográficos foram utilizados:

- Gel de sílica do tipo 60G e/ou 60GF₂₅₄ (de 5 a 40 µm) (Merck).
- Gel de sílica do tipo 60, partículas 40-63 µm (Merck); 70-230 µm (Merck), 400-230µm (Merck) e Sephadex LH- 20 (Sigma-Aldrich).
- Os fracionamentos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados em cromatógrafo Shimadzu LC-6AD e detector UV/VIS Shimadzu SPDV-6AV, utilizando coluna fase reversa C-18 Phenomenex Luna 25x250, partícula 5 µm.

A revelação dos cromatogramas em placas de camada delgada analítica foi feita empregando-se solução a 2 % de sulfato de cério em H₂SO₄ 2N, solução 1% de difenilborinato de 2-aminoetila em MeOH (NP) , solução 5% de polietilenoglicol em EtOH (PEG) e através de inspeção à luz UV (monitor UV de mão modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura, utilizando-se sílica com indicador fluorescente.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300, a 300MHz e 75 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente, localizado no Instituto de Química – UFMS e também em um espectrômetros Bruker DRX-500, a 500MHz e 125 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente, localizado na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP-SP. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ¹H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN ¹³C. As amostras foram solubilizadas em CDCl₃, Acetona- d₆, MeOD e DMSO-d₆ das marcas Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL) e Aldrich.

O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS-MS) foi obtido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP-SP em Modelo Ultra TOF-Q (BRUKER



DALTONICS), com ionização por electrospray. Já os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos por impacto de eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 5000, DI-50, localizado do Instituto de Química – UFMS.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com aparelho espectrofotométrico Bomem Michelson MB série, na forma de filme, utilizando janela de NaCl ou disco prensado em KBr.

A rotação específica foi medida em polarímetro digital Perkin-Elmer 341, filtro de Na (589 nm) em cela de 1 dm.

No teste de letalidade sobre *A. salina* foram usados: ovos de *Artemia salina* (Maramar – alta eclosão), sulfato de quinidina (SIGMA), DMSO 0,5 % (Merck) e sal marinho (Enterprise Co).

Para o teste da atividade larvicida foram usados: ovos do mosquito *Aedes aegypti* da linhagem Rockfeller; estufa BOD ($T = 27 \pm 2$ °C; $UR = 70 \pm 5\%$); ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex); DMSO 5 %.

3.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal

O material vegetal foi coletado em uma área alagada no município de Campo Grande – MS pela Prof^a. Me. Vali Joana Pott (DBI/UFMS) e a aluna de doutorado Suzana Neves Moreira (DBI/UFMS) e colaboração do Prof. Dr. Walmir Silva Garcez (IQUI/UFMS). A identificação botânica, também, foi realizada pela Me. Vali Joana Pott e a exsicata (CGMS - 33491) deste espécime encontra-se depositada no Herbário CGMS, da UFMS.

3.3 Obtenção e Partição do Extrato Etanólico

A parte aérea da planta foi separada da raiz, seca, moída (1.384,2 g) e submetida a uma extração via percolação com etanol a temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida até consistência xaroposa, fornecendo o extrato etanólico bruto (136,2 g), do qual foram separados 3,4 g para realização de testes biológicos. Parte do extrato etanólico (80,0 g) foi submetido a partições líquido-líquido entre metanol/água (9:1) e hexano, seguido por acetato de etila, dando origem a três fases: hexânica (10,2 g), acetato de etila (32,2 g) e hidrometanólica (34,9 g).



3.4 Estudo Químico da Fase Hexânica

O material proveniente da fase hexânica (10,2 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel 60 (70-230 mesh) [242,6 g], eluída seguindo um gradiente de polaridade crescente com hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 13 frações (**AFH - 1** à **AFH - 13**), conforme consta na **Tabela 2**.

Tabela 2- Frações provenientes da fase hexânica em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh).

Frações	Eluente	Massa (mg)
AFH-1	Hexano 100%	718,0
AFH-2	Hex/ AcOEt 10%	60,7
AFH-3	Hex/ AcOEt 10%	9,5
AFH-4	Hex/ AcOEt 20%	1,1
AFH-5	Hex/ AcOEt 20%	13,3
AFH-6	Hex/ AcOEt 30%	3.100,0
AFH-7	Hex/ AcOEt 30%	3.100,0
AFH-8	Hex/ AcOEt 30%	1.300,0
AFH-9	Hex/ AcOEt 50%	817,0
AFH-10	Hex/ AcOEt 50%	540,5
AFH-11	Hex/ AcOEt 50%	875,5
AFH-12	Acetato de Etila 100%	1.200,0
AFH-13	Metanol 100%	2.100,0

3.4.1 Estudo químico da fração AFH- 10

O perfil cromatográfico e a análise do espectro de RMN de ^1H desta fração evidenciou a presença de constituintes de interesse. Assim, a fração **AFH- 10** (540,5 mg) foi inicialmente submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída em CHCl_3 , resultando em 56 frações de 10,0 mL cada. Após análise por CCDA, reveladas com sulfato de cério IV, as frações que apresentaram perfis semelhantes foram agrupadas, dando origem a dezesseis frações (**AFH10- 1** à **AFH10- 16**).

A fração **AFH10- 11** (12,0 mg) apresentou-se como um sólido amarelo e na análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, observou-se uma única mancha alongada de coloração roxa. Os espectros massas e de RMN ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de



uma mistura de dois ésteres do ácido cafeico, identificados como sendo o cafeato de docosila (3) e cafeato de tetracosila (4).

A fração **AFH10- 15** (3,8 mg) apresentou-se com um sólido amarelo e após análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, observou-se uma única mancha de coloração rosa. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de uma substância pertencente à classe dos pterocarpanos, sendo identificada o (6aS, 11aS) 3-hidróxi-9-metoxipterocarpano (2), conforme o fluxograma 1.

As frações **AFH10- 7** e **AFH10- 8** também foram estudadas e o procedimento utilizado no estudo químico de cada uma é descrito a seguir.

3.4.1.1 Estudo Químico da fração AFH10- 7, proveniente da fração AFH- 10

A fração **AFH10- 7** (139,0 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel “Flash” (200-400 mesh), utilizando-se um gradiente de polaridade crescente de Hex/AcOEt/MeOH (89:10:1) a MeOH (100%), resultando em 102 frações de 10,0 mL cada. Após análise por CCDA, reveladas com sulfato de cério IV, as frações que apresentaram perfis semelhantes foram agrupadas, dando origem a 28 frações (**AFHF- 1** à **AFHF- 28**).

A fração **AFHF- 11** (10,0 mg) apresentou-se como um sólido amarelo e após análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, observou-se uma única mancha de coloração roxa. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de um esteroide, identificado como sendo o estigmasterol (5), conforme consta no fluxograma 1.

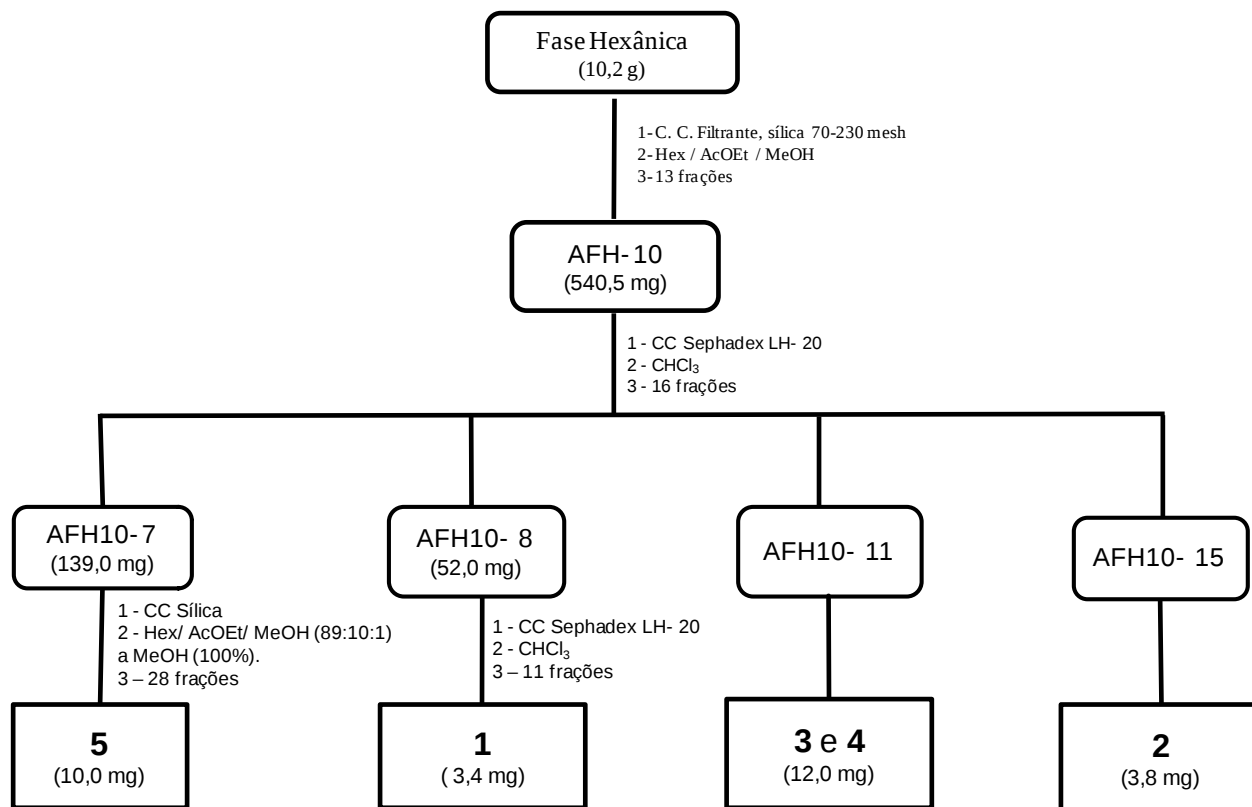
3.4.1.2 Estudo Químico da fração AFH10- 8, proveniente da fração AFH- 10

A fração **AFH10- 8** (52,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída em CHCl_3 , resultando em 45 frações de 10,0 mL cada. Após análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, as frações que apresentaram perfis semelhantes foram agrupadas, dando origem a 11 frações (**AH8-1** à **AH8-11**).

A fração **AH8- 2** (3,4 mg) apresentou-se como um sólido alaranjado e após análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, observou-se uma única mancha de coloração amarela. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de um pterocarpano,



identificado como sendo o (6aS, 11aS) 3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**), conforme o fluxograma 1.



Fluxograma 1 - Sequência de fracionamento da fase hexânica.



3.5 Estudo Químico da Fase Acetato de Etila

Parte da fase acetato de etila (6,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna com sílica C-18 (40 - 60 mesh) e pressão reduzida, eluída em MeOH/H₂O (4:6) à CHCl₃ 100%, resultando em cinco frações. Estas foram identificadas como **AFA-1** a **AFA-5**, conforme consta na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Frações provenientes da fase acetato de etila [cromatografia em coluna com sílica C-18 (40-60 mesh)].

Frações	Eluente	Volume (mL)	Massa (mg)
AFA-1	MeOH/H ₂ O 4:6	500	1.500,0
AFA-2	MeOH/H ₂ O 6:4	400	1.000,0
AFA-3	MeOH/H ₂ O 8:2	400	1.360,0
AFA-4	MeOH	400	1.150,0
AFA-5	CHCl ₃	300	218,9

3.5.1 Estudo químico da fração AFA-1.2

As frações **AFA-1** e **AFA-2**, após análise por CCDA, reveladas com sulfato de cério IV, foram reunidas, originando a fração **FA-12** (2,5 g). Esta foi inicialmente submetida a uma coluna cromatográfica em Sephadex LH-20, eluída em MeOH, resultando em 16 frações (**FA12- 1** à **FA12- 16**) de 100,0 mL cada, conforme consta no fluxograma 2.

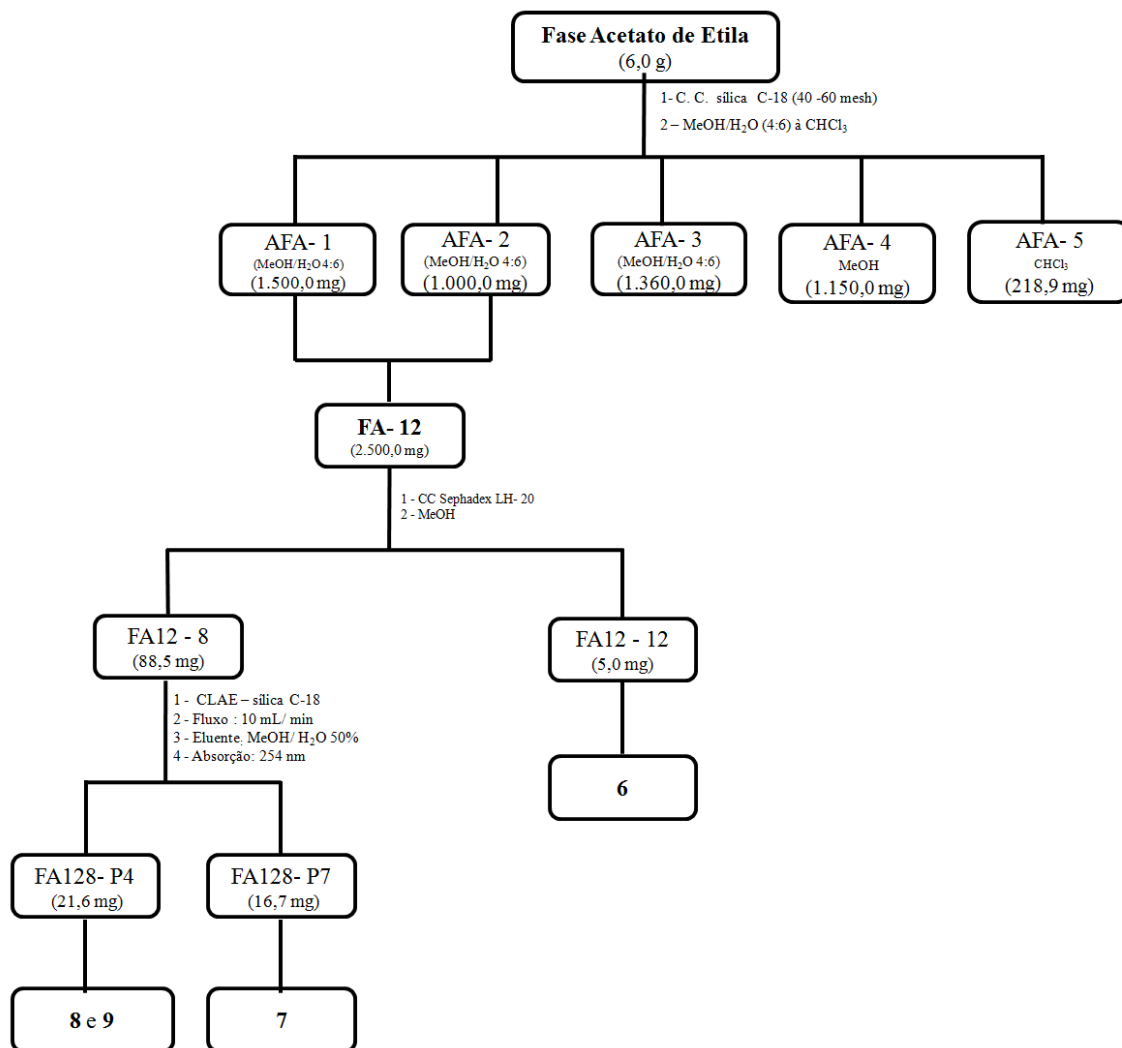
A fração **FA12- 12** (5,0 mg), apresentou-se com um sólido amarelo e após análise por CCDA, revelada com sulfato de cério IV, observou-se uma única mancha de cor amarelo-ouro. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C indicaram tratar-se de um flavonoide, identificado como sendo a quercetina (**6**).

3.5.1.1 Estudo Químico da fração FA12- 8, proveniente da fração AFA-1.2

A fração **FA12- 8** (88,5 mg) foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa em coluna cromatográfica C-18 (absorção em 254 nm e fluxo 10 mL/min), eluída em MeOH/H₂O 50%, resultando no isolamento de três substâncias. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C indicaram tratar-se de três flavonoides glicosilados, identificados como sendo: 3-O- α -L-arabinofuranosíl quercetina (**7**) (**FA128- P7**: 16,7 mg),



3-O- β -D-glucopiranosíl quercetina (**8**) (**FA128- P4**: 21,6 mg) e 3-O- β -D-galactopiranosíl quercetina (**9**) (**FA128- P4**: 21,6 mg), conforme consta no fluxograma 2.

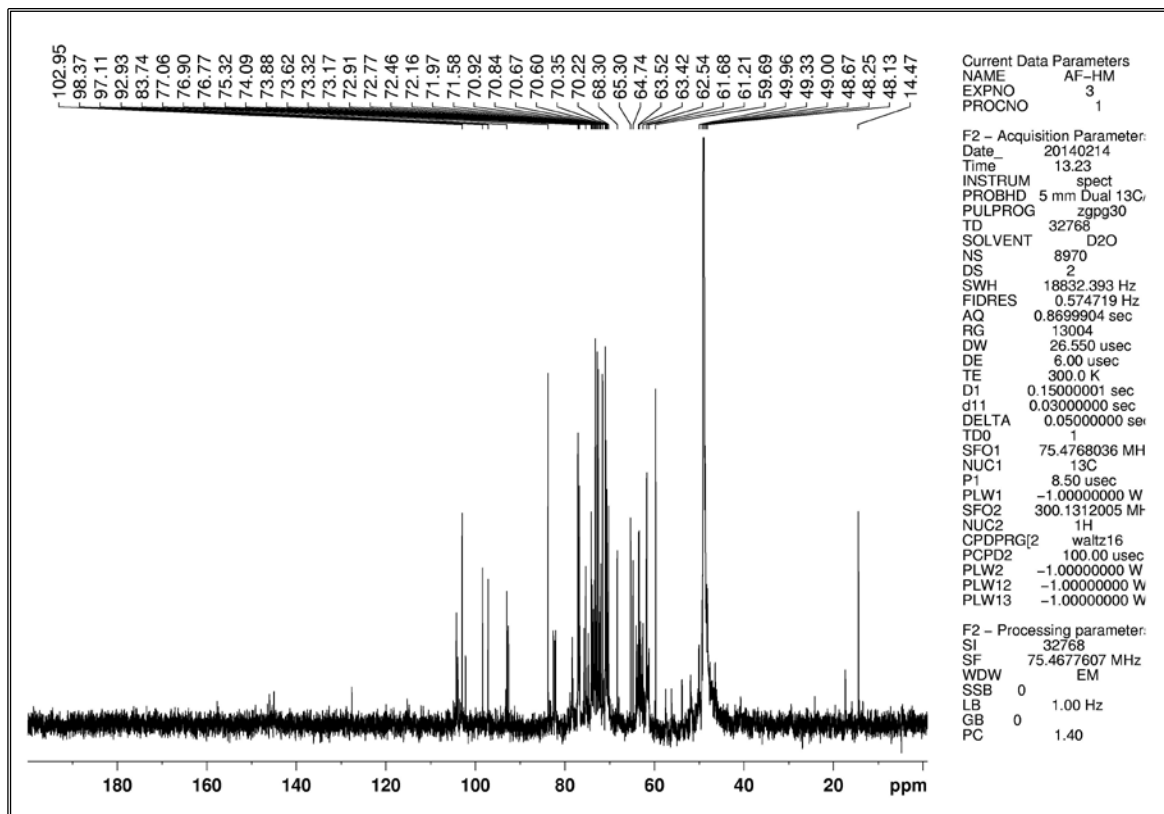


Fluxograma 2 - Sequência de fracionamento da Fase Acetato de Etila



3.6 Estudo Químico da Fase Hidrometanólica

Após obtenção e análise do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 1) da fase hidrometanólica observou-se que a mesma é constituída basicamente por carboidratos e, em função disso, decidiu-se não dar continuidade ao estudo desta fase.



Espectro 1 – Espectro de RMN de ^{13}C da **Fase Hidrometanólica** (MeOH/ capilar D_2O)



3.7 Atividades Biológicas

O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi avaliado em relação a suas atividades biológicas.

3.7.1 Ensaio de letalidade sobre *Artemia salina*

O teste *in vitro* de toxicidade geral foi realizado por meio do microcrustáceo *Artemia salina* de acordo com uma adaptação da metodologia de Meyer *et al.* (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 38 g L⁻¹. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25 °C.

O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi diluído em DMSO 1% e, em seguida, foram realizadas diluições deste em solução salina nas seguintes concentrações: 125, 250, 500, 1000 µg/mL. Com auxílio de uma pipeta e contadas macroscopicamente, dez larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaios contendo o extrato diluído. Para o controle positivo foi utilizado quinidina dissolvida em DMSO 1% e no negativo apenas DMSO 1%. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas de incubação.

3.7.2 Ensaio da Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*

O ensaio da atividade larvicida contra *A. aegypti* foi realizado de acordo com protocolo descrito na literatura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981). Os ovos de *A. aegypti* inicialmente foram fornecidos pelo IBEX/ Entomologia/ LAFICAVE/ IOC/ FIOCRUZ- RJ e atualmente a criação de *A. aegypti* é mantida no Laboratório de Bioensaios anexo ao LP-1, com autorização do Comitê de ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o número de protocolo 469/2012.

O extrato etanólico da parte aérea de *A. filosa* (20,0 mg) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5%) sob agitação em ultra-som e, posteriormente foi acrescentado 20,0 mL de água isenta de cloro, logo em seguida, foram realizadas diluições desta solução nas seguintes concentrações: 125, 250, 500, 1000 µg/mL. Estas soluções



foram distribuídas em quadruplicata nos copos plásticos (5,0 mL), à temperatura ambiente. Em cada copo plástico foram adicionadas dez larvas do terceiro ínstar. Paralelamente, todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle negativo, utilizando solução aquosa de DMSO 0,5%.

Após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, à temperatura de 27 ($\pm$ 2°C), foi contado o número de larvas mortas, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com pipeta Pasteur. Para a obtenção dos valores de CL₅₀, utilizou-se o método de análise Probit.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento das fases hexânica e acetato de etila, provenientes do extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa*, levou ao isolamento de nove substâncias: dois pterocarpanos, (6aS,11aS)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**), (6aS,11aS)-3-hidróxi-9-dimetoxipterocarpano (**2**); dois ésteres do ácido cafeico, cafeato de docosila (**3**) e cafeato de tetracosila (**4**); um esteroide, estigmasterol (**5**); um flavonoide, quercetina (**6**) e três flavonoides glicosilados, 3-O- α -L-arabinofuranosíl quercetina (**7**), 3-O- β -D-glucopiranosíl quercetina (**8**) e 3-O- β -D-galactopiranosíl quercetina (**9**).

Foram avaliadas as atividades larvicidas contra o *Aedes aegypti* e a toxicidade frente à *Artemia salina* do extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* e os resultados obtidos dos ensaios revelaram que o extrato é inativo até a maior concentração testada (1000 $\mu\text{g/mL}$) para ambas as atividades.



4.1 (6aS, 11aS) 3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (1)

Na fração **AH8- 2** (parte experimental, item 3.4.1.2, pág. 10) foi caracterizada a substância **1**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 3, pág. 23), obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em $3417,6\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas no composto. Observou-se, também, uma absorção em $1623,9\text{ cm}^{-1}$, atribuída à presença de C=C de anéis aromáticos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 4, pág. 23) apresentou cinco sinais na região de hidrogênios de anéis aromáticos, sendo dois singletos em δ 6,54 e 6,97, três duplos dubletos em δ 6,45 ($J = 2,5$ e $0,8$ Hz), 6,46 ($J = 8,8$ e $2,5$ Hz) e 7,14 ($J = 8,8$ e $0,8$ Hz). Também foram observados dois singletos em δ 3,77 e 3,91, sugestivos de metoxilas ligadas a anel aromático, além de um dubleto em δ 5,49 ($J = 6,4$ Hz), dois duplos dubletos em δ 3,57 ($J = 10,8$ e $10,2$ Hz) e 4,22 ($J = 10,2$ e $4,2$ Hz) e um duplo duplo dubleto em δ 3,53 ($J = 10,8$; $6,4$ e $4,2$ Hz).

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 5, pág. 24) foi possível listar dezessete sinais de carbonos e com o auxílio do experimento de HSQC (Espectros 6 e 7, pág. 24 e 25), foi possível atribuir a multiplicidade destes como sendo: doze sinais relativos a carbonos de anel aromático, onde cinco são de CH (δ 96,8; 103,4; 106,1; 111,4; 124,6) e sete de C (δ 110,5; 119,1; 142,0; 147,2; 150,2; 160,7; 160,7). Foram também listados dois sinais relativos a carbonos metínicos sendo um oxigenado (δ 39,5 e 78,7) e um a carbono metilênico oxigenado em δ 66,5. A análise destes dados, associados aos observados no espectro de RMN de ^1H , sugeriu a presença de um esqueleto flavonoídico do tipo pterocarpano (**Figura 3**).

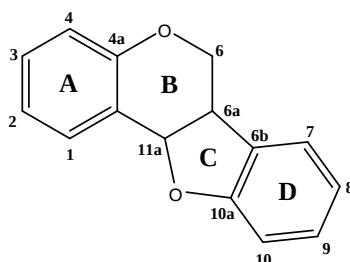


Figura 3 - Esqueleto flavonoídico do tipo pterocarpano.



No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Espectros 8, 9 e 10, pág. 25 e 26) foi observada uma correlação entre o hidrogênio em δ 7,14 (H-7) e o carbono C-6a (δ 39,5). Observou-se, também, um acoplamento de 8,8 Hz entre os hidrogênios a δ 7,14 e 6,46 e de 2,5 Hz entre este último e o hidrogênio a δ 6,45, indicativos de acoplamentos *orto* e *meta*, respectivamente. Assim, o sinal em δ 6,46 foi atribuído a H-8 e o em δ 6,45 a H-10. Ainda no experimento HMBC foram observadas as correlações entre os hidrogênios em δ 3,77 e 3,91 e os carbonos C-9 (δ 142,0) e C-2 (δ 160,7) respectivamente. Estes dados, juntamente com os relacionados na **Tabela 4** (pág. 21), permitiram realizar a atribuição inequívoca dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C de **1**.

No espectro de correlação homonuclear NOESY (Espectros 11 e 12, pág. 27), observou-se uma correlação entre os hidrogênios H-6a e H-11a, com constante de acoplamento de 6,4 Hz, sugerindo, assim, uma configuração *cis* para a junção dos anéis B e C, também, uma correlação entre os hidrogênios H-6a e H-6 β ($J = 4,2$ Hz).

A análise espectral de RMN uni- e bidimensionais (**Tabela 4**, pág. 21) permitiu a propor as estruturas abaixo para **1**. O espectro de massas de alta resolução com ionização por electrospray no modo positivo de **1** (Espectro 2, pág. 21) apresentou o pico do íon pseudo-molecular $[M + \text{H}]^+$ com razão m/z de 301,1092, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{H}$: 301,1075).

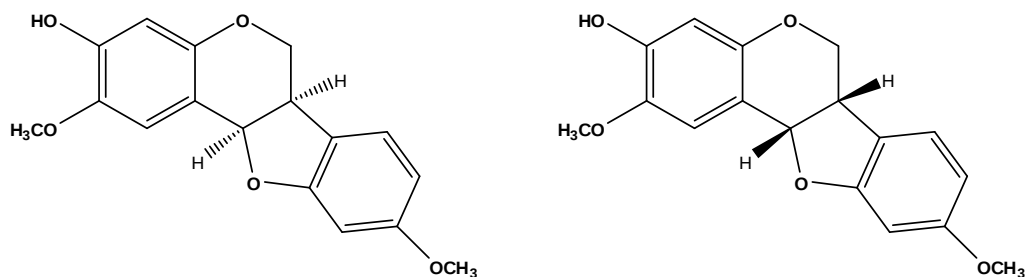


Figura 4 – Estruturas propostas para **1**.

A rotação óptica específica ($[\alpha]_{25}^D$) determinada para **1** foi $+91,2^\circ$ (c 0,2, CHCl_3), o valor positivo sugere uma estereoquímica absoluta *S* (6a*S*, 11a*S*) para os carbonos quirais do composto (HARBORNE & MABRY, 1982). Desta forma, a estrutura de **1** foi elucidada como sendo (6a*S*,11a*S*)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**Figura 5**).

Na literatura só há relatos do composto (6a*R*,11a*R*)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano, que apresenta $[\alpha]_D^{23} = -297^\circ$ (EtOH) (Pueppke & VanEtten 1974).



Assim, (6a*S*,11a*S*)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**) se constitui no enantiômero do composto já isolado e, portanto, é inédito na literatura.

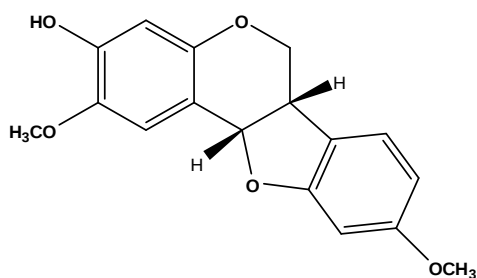


Figura 5 - (6a*S*,11a*S*)-3- hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**).



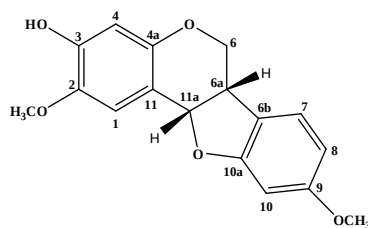


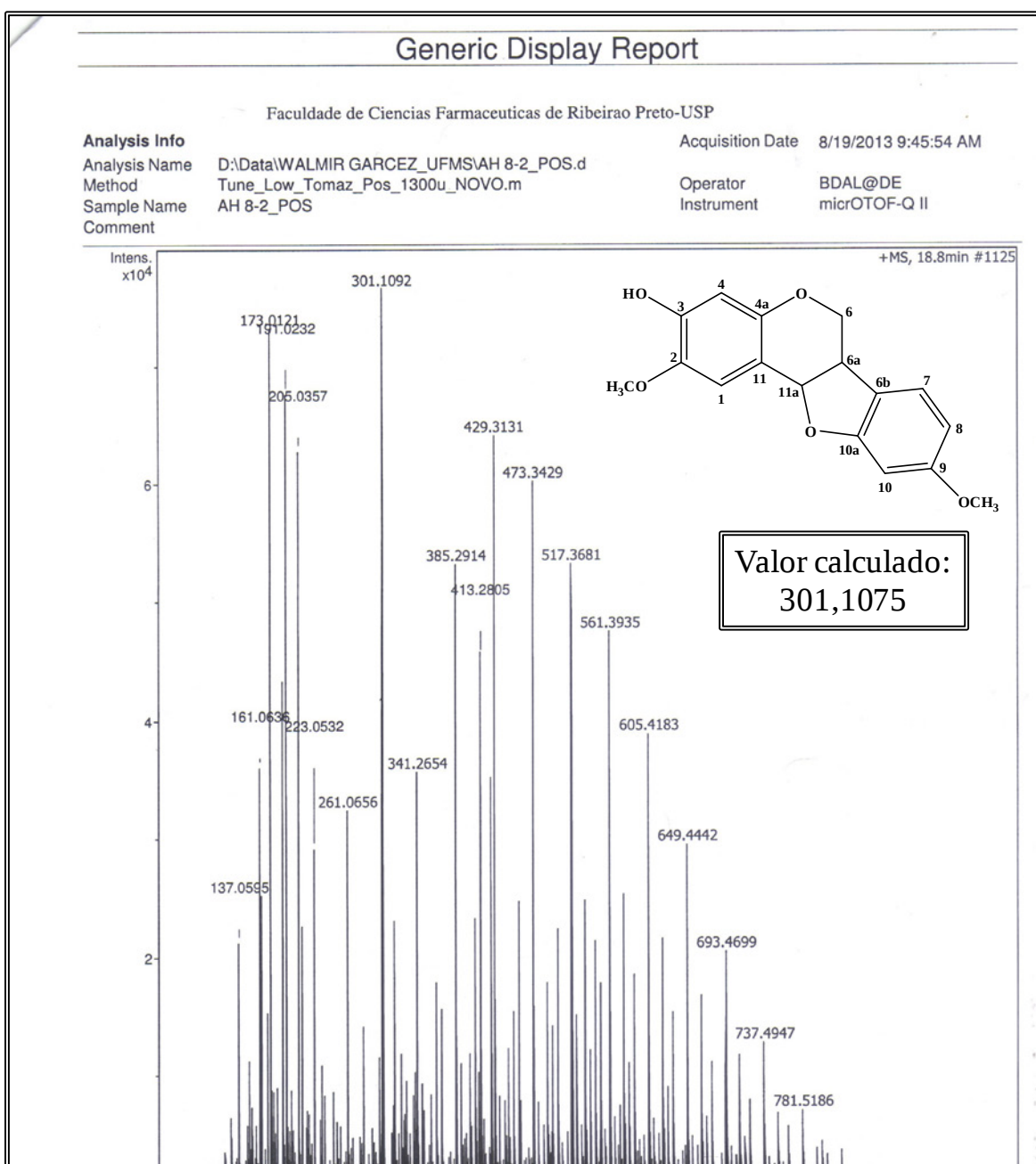
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC de **1**.

Nº	1		
Carb.	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz ^b	$\delta^{13}\text{C}^{\text{a}}$	HMBC (H→C) ^a
1	6,97 (1H; s)	111,4	C-2; C-3; C-4; C-4a; C-11; C-11a
2	-	142,0	-
3	-	150,2	-
4	6,54 (1H; s)	103,4	C-2; C-3; C-4a; C-11; C-11a
4a	-	147,2	
6	4,22 (H β ; dd; 10,2 e 4,2)	66,5	C-6a; C-6b; C-11a
	3,57 (H α ; dd; 10,8 e 10,2)		C6a; C-11a
6a	3,53 (1H; ddd; 10,8, 6,4 e 4,2)	39,5	C-6b; C-11a
6b	-	119,1	-
7	7,14 (1H; dd; 8,8 e 0,8)	124,6	C-6a; C-9; C-10; C-10a
8	6,46 (1H; dd; 8,8 e 2,5)	106,1	C-6b; C-9; C-10; C-10a
9	-	160,7	-
10	6,45 (1H; dd; 2,5 e 0,8)	96,8	C-6b; C-8; C-10a
10a	-	160,7	-
11	-	110,5	-
11a	5,49 (1H; d; 6,4)	78,7	C-1; C-6; C-6a; C-11
OMe	3,77 (3H; s)	55,3	C-9
OMe	3,91 (3H; s)	56,0	C-2

^aEspectros obtidos em CDCl_3 , 500/100 MHz

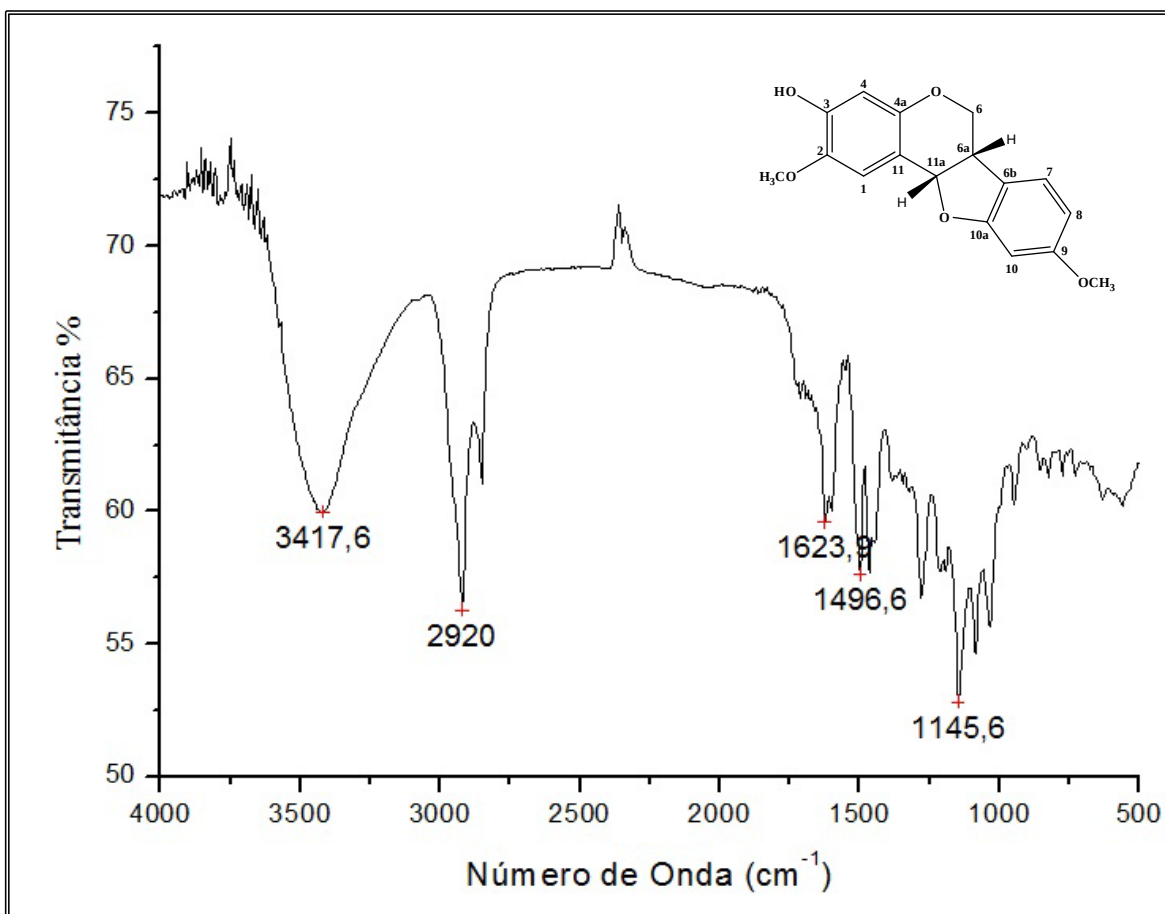
^bValores observados com o auxílio do experimento *J-resolved*



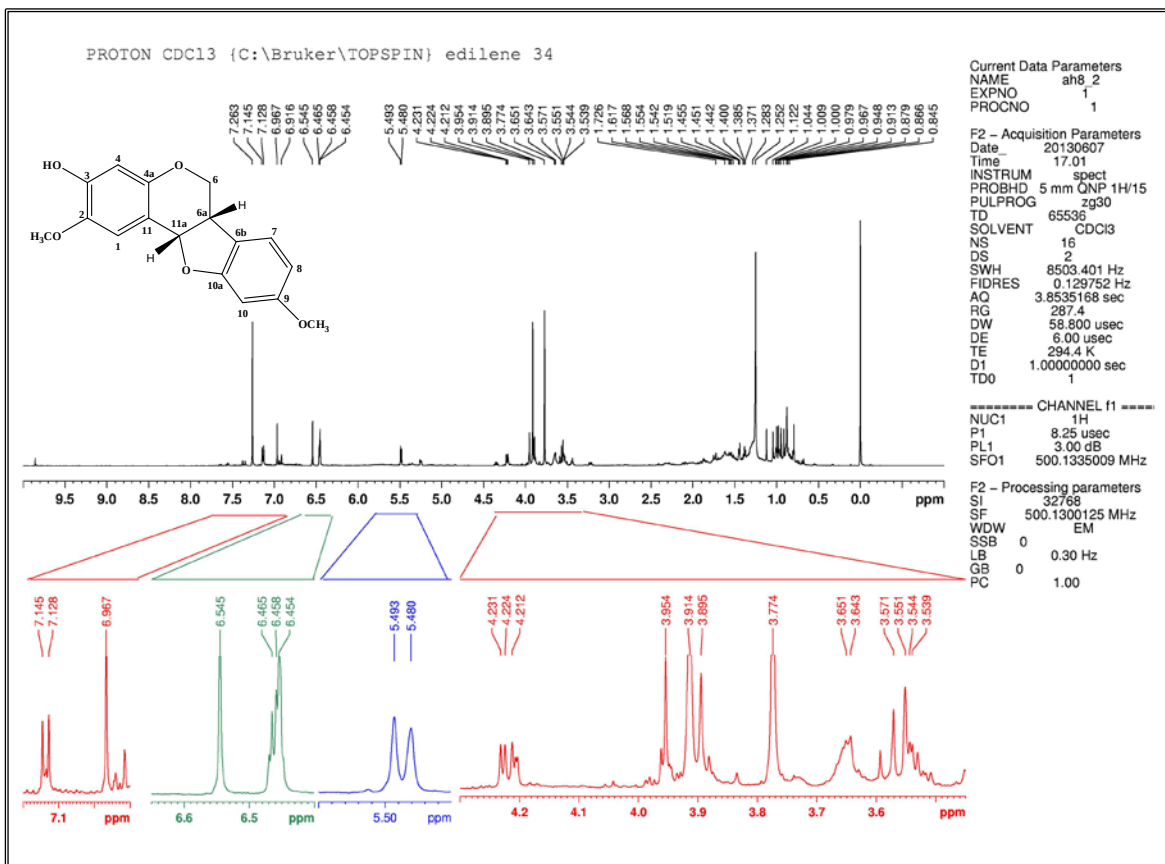


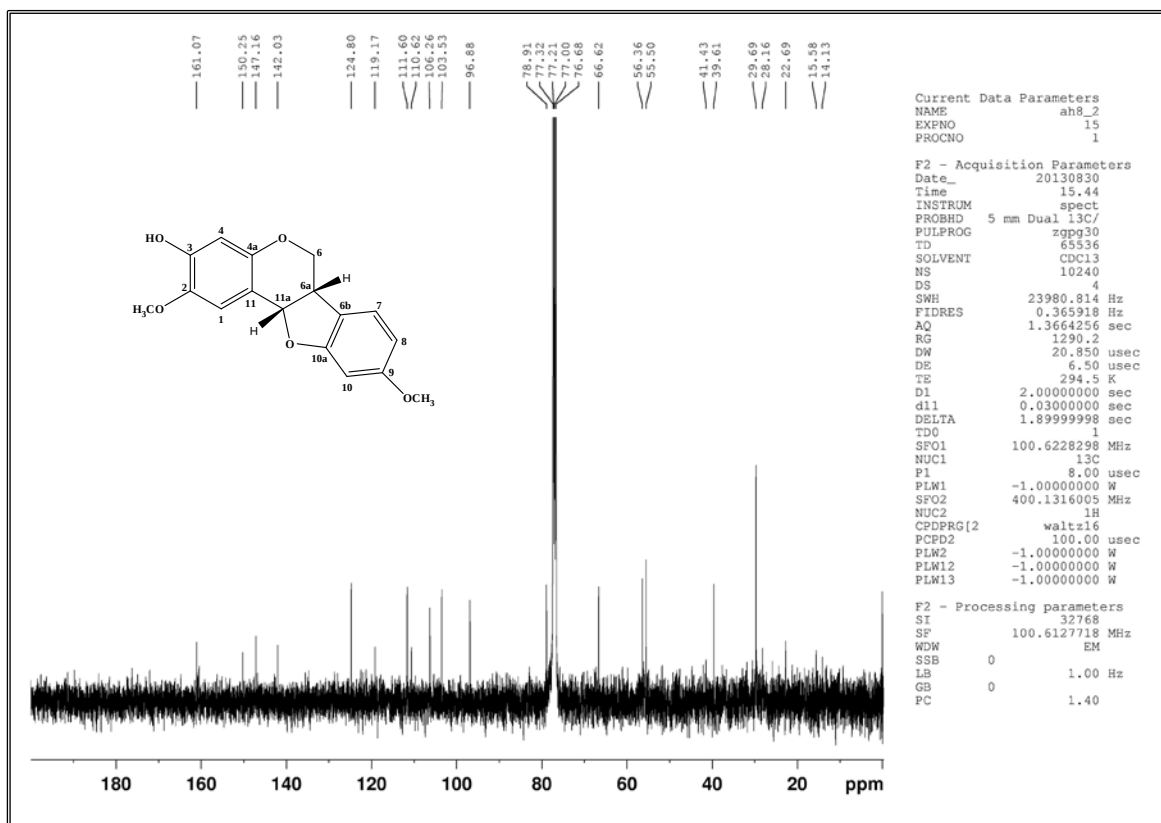
Espectro 2 - Espectro de massas de alta resolução, ionização por *electrospray* no modo positivo de **1**.



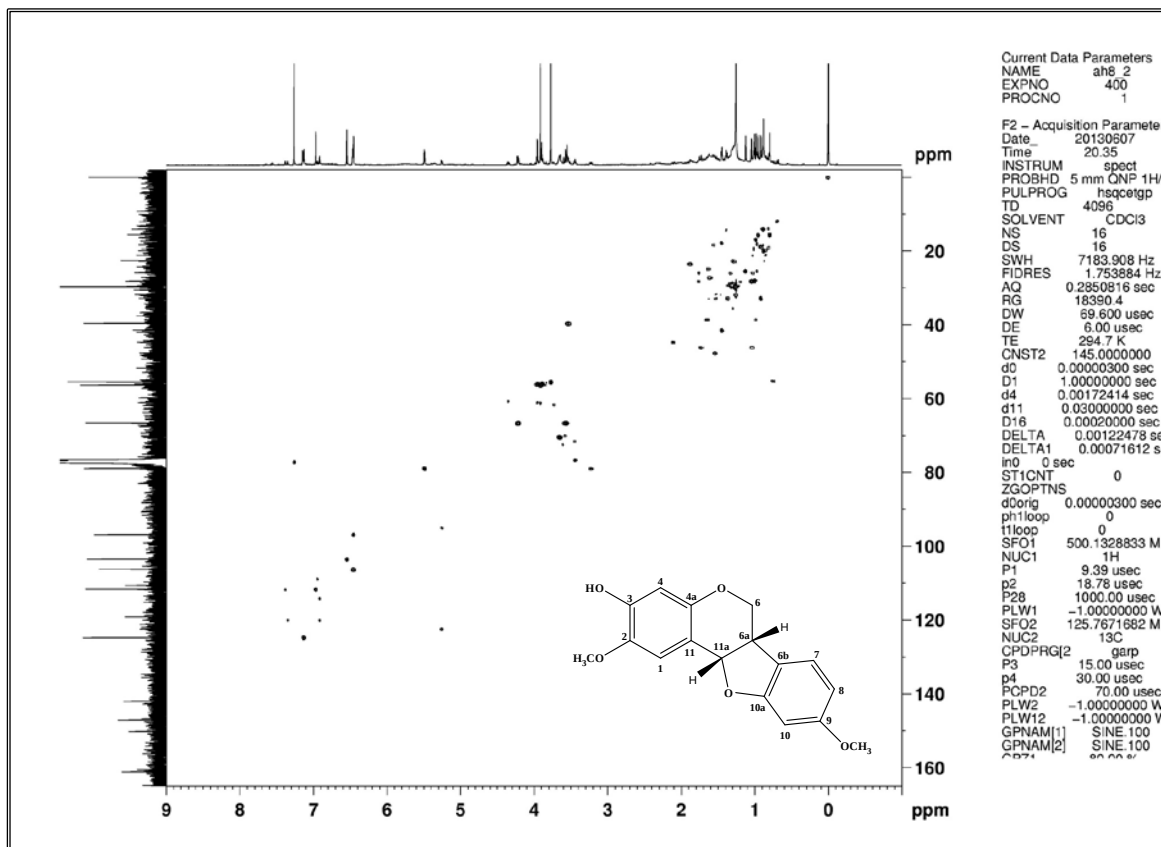


Espectro 3 - Espectro na região do Infravermelho de 1 (Pastilha KBr).

Espectro 4 - Espectro de RMN de ^1H de 1 (CDCl_3 , 500 MHz).

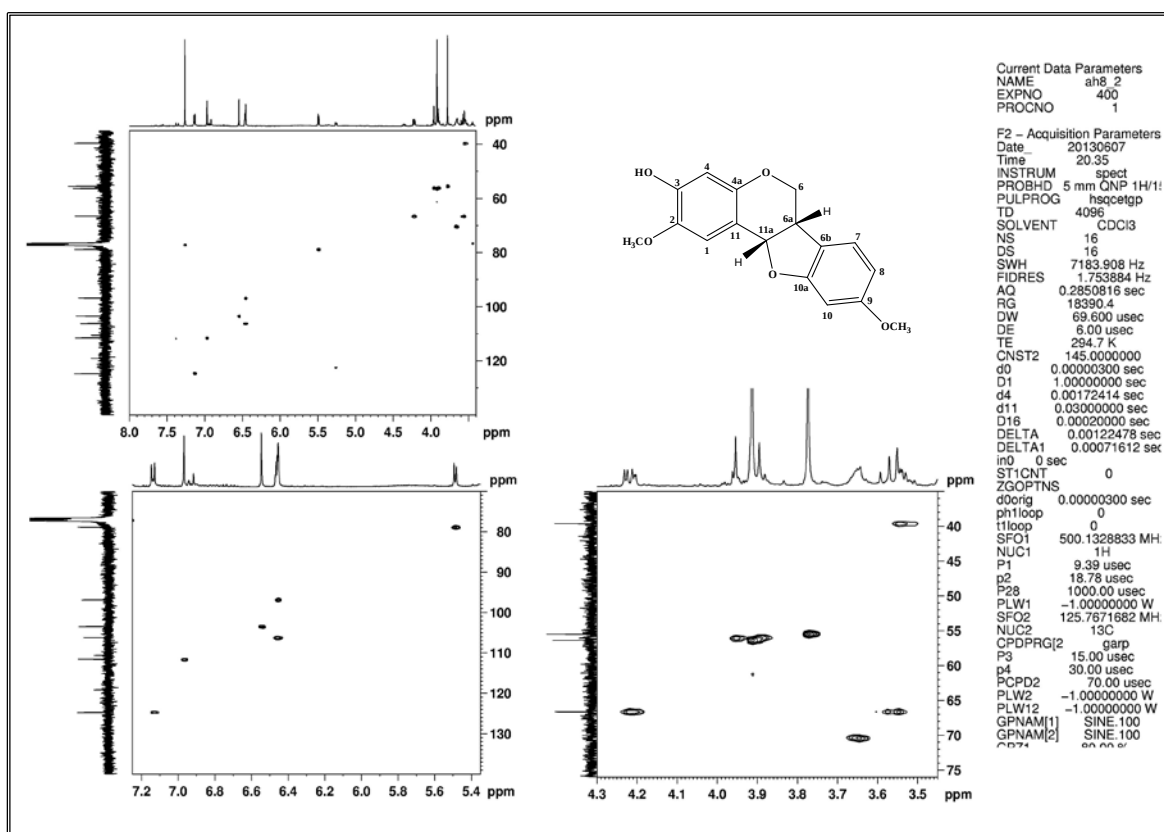


Espectro 5 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (CDCl_3 , 100 MHz).

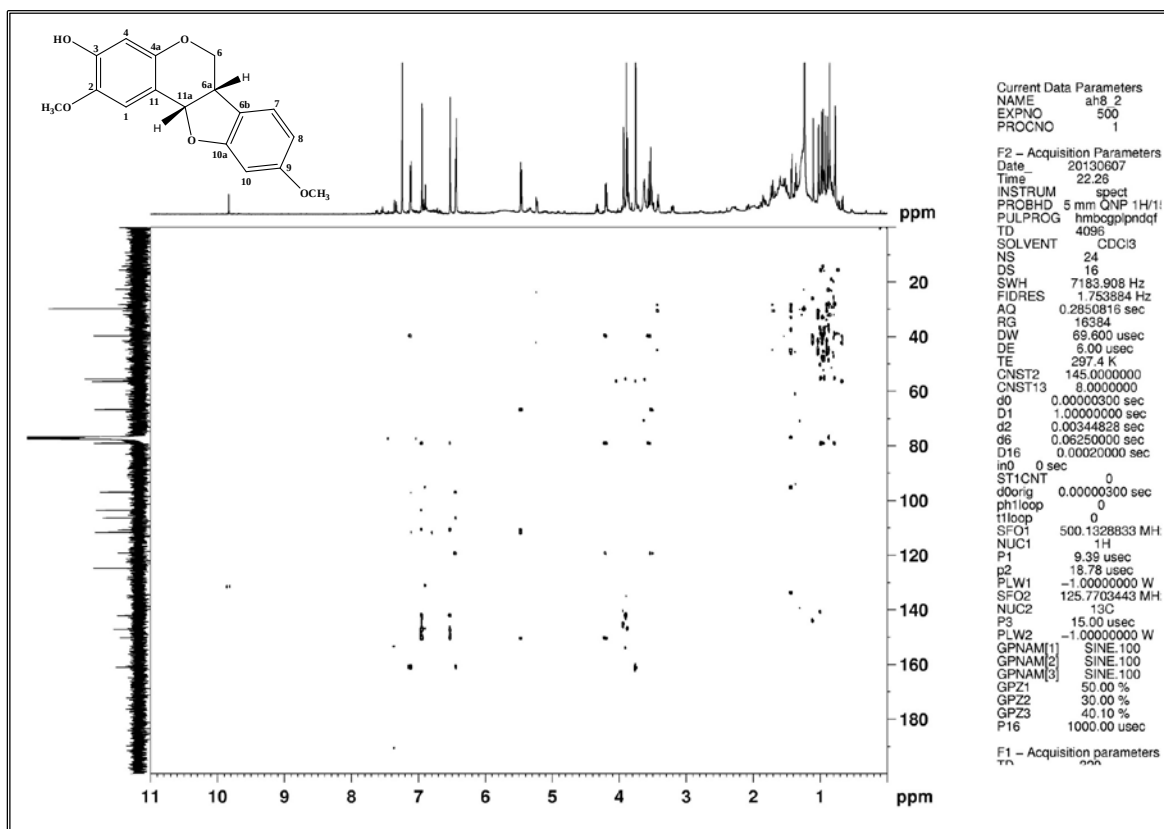


Espectro 6 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de **1** (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).



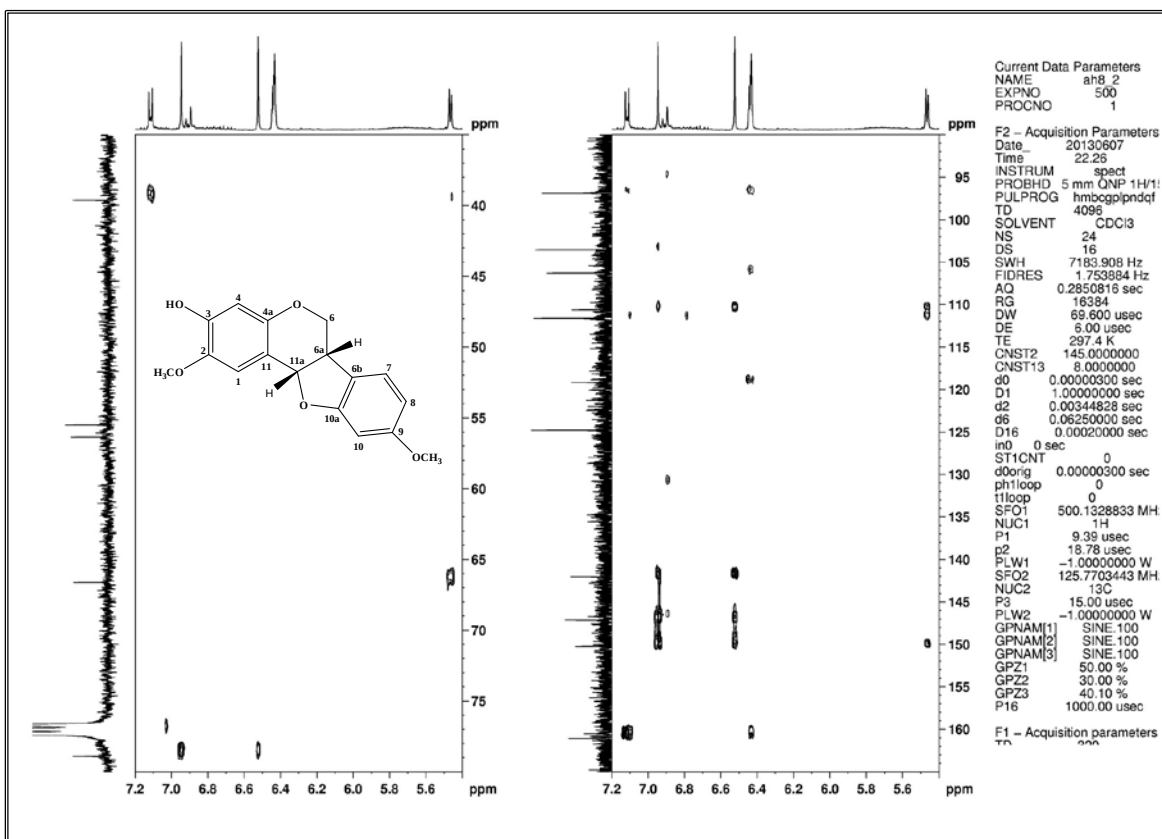


Espectro 7 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de 1 (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).

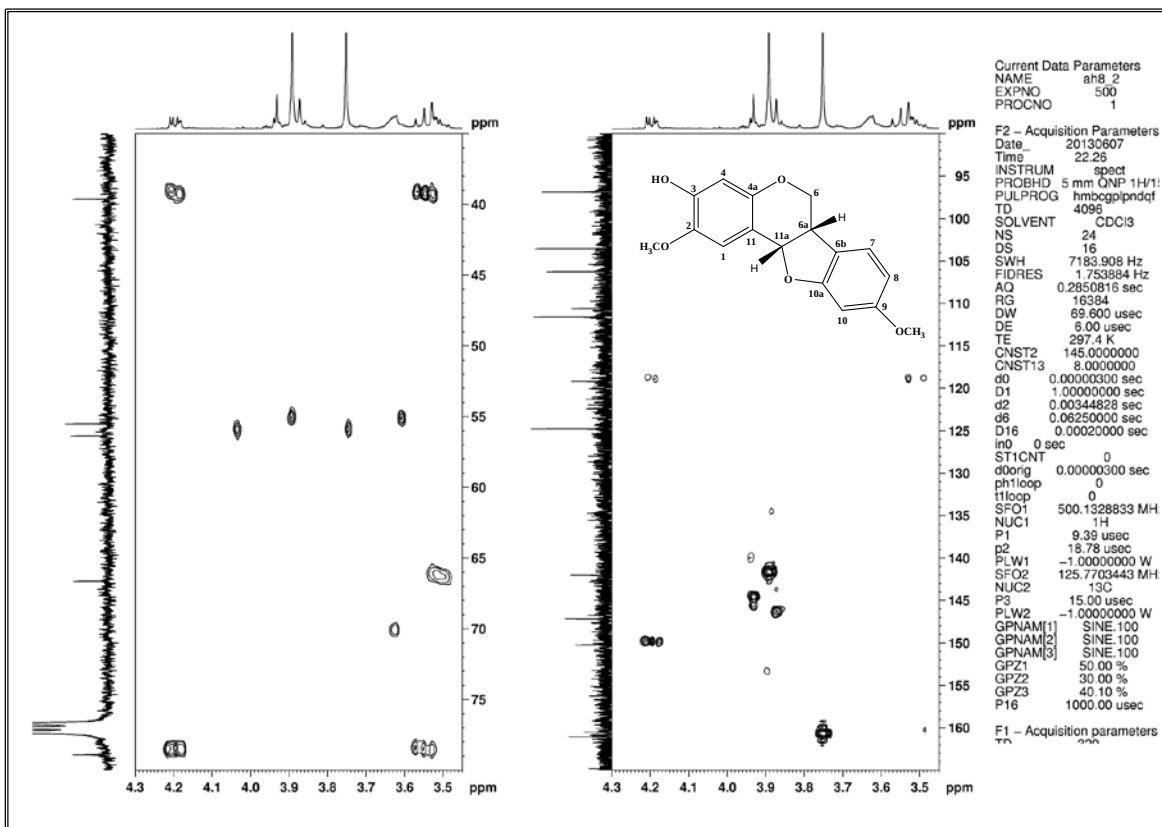


Espectro 8 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$ (n = 2 e 3) - HMBC de 1 (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).



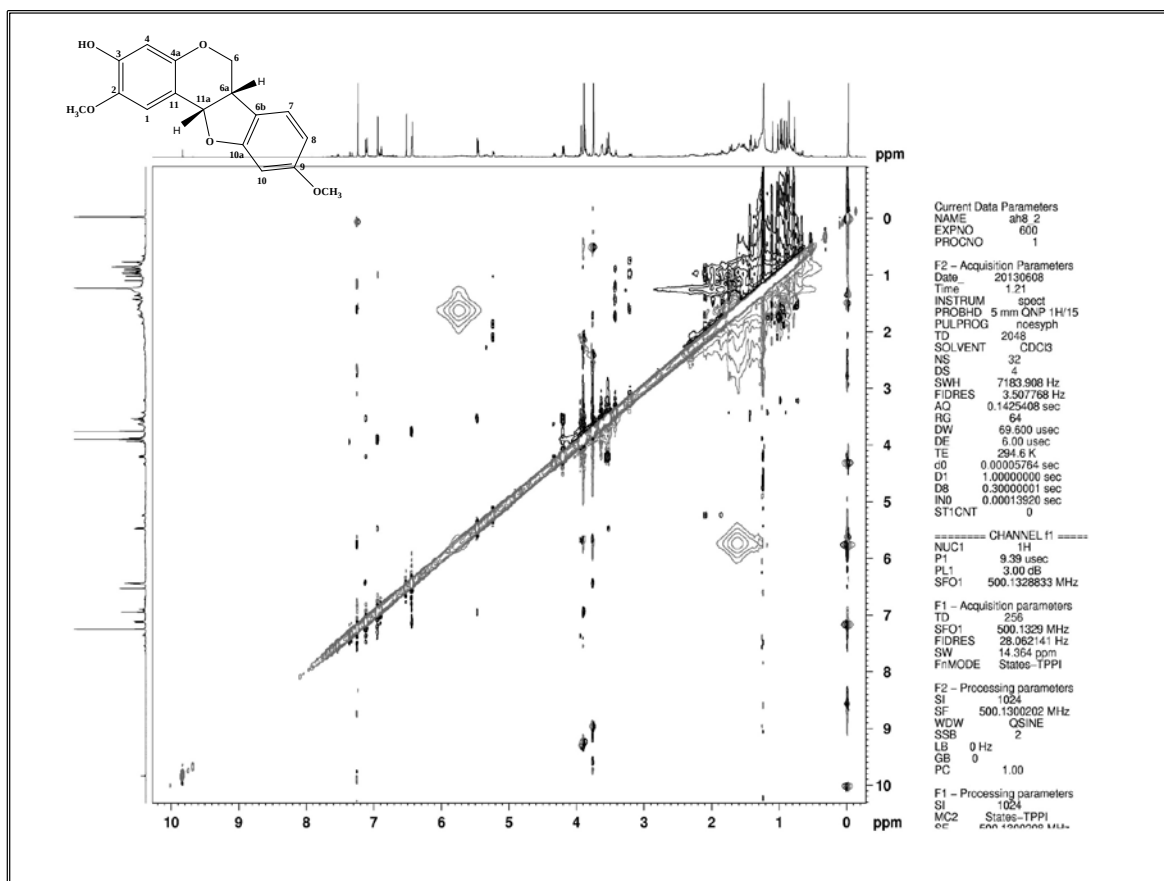


Espectro 9 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de **1** na região de 7,2 – 5,5 ppm(CDCl_3 , 500 e 100 MHz).

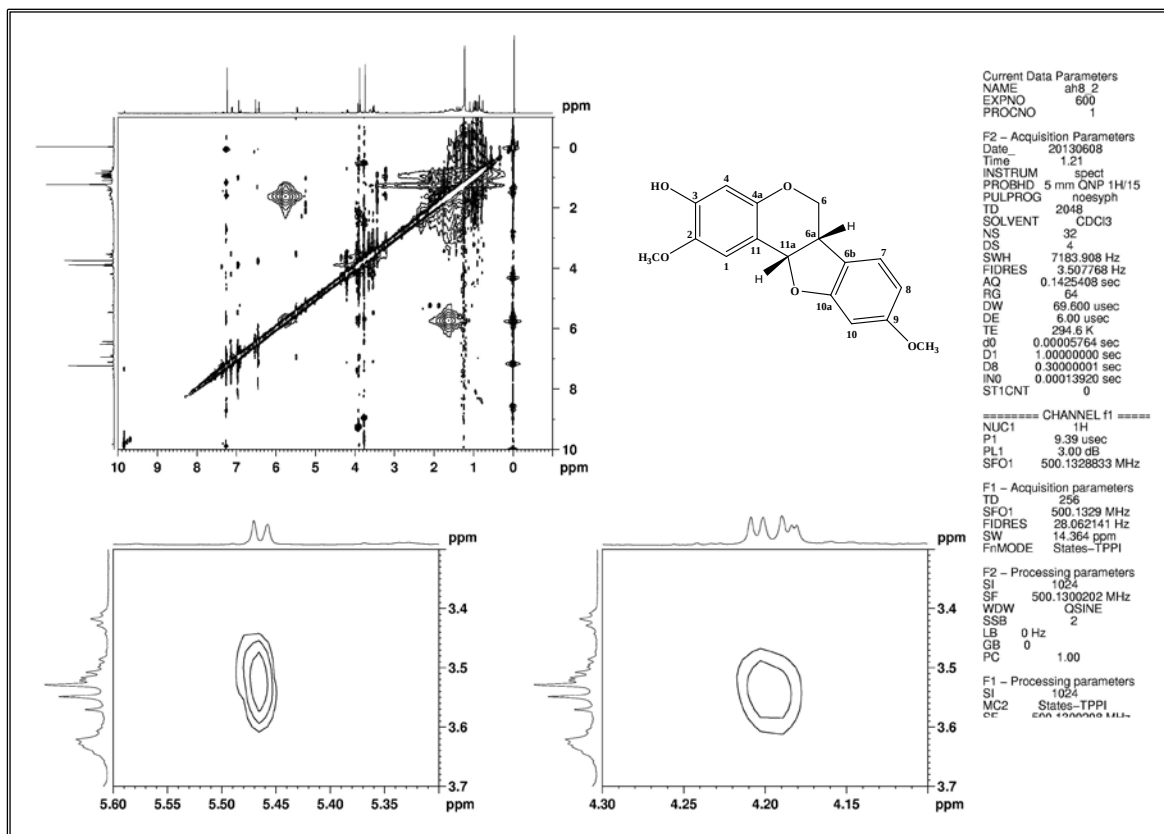


Espectro 10 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de **1** na região de 4,3 – 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 e 100 MHz).



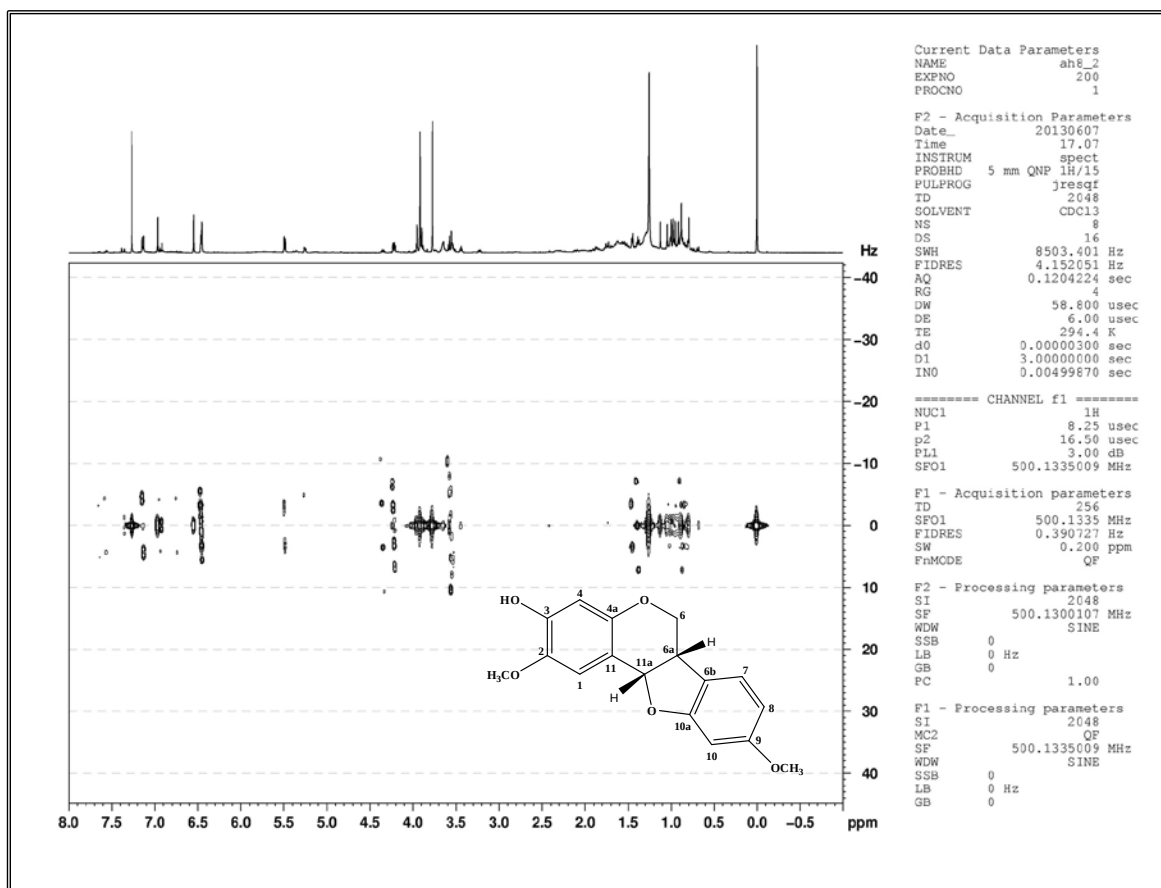


Espectro 11 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de 1 (CDCl_3 , 500 MHz)

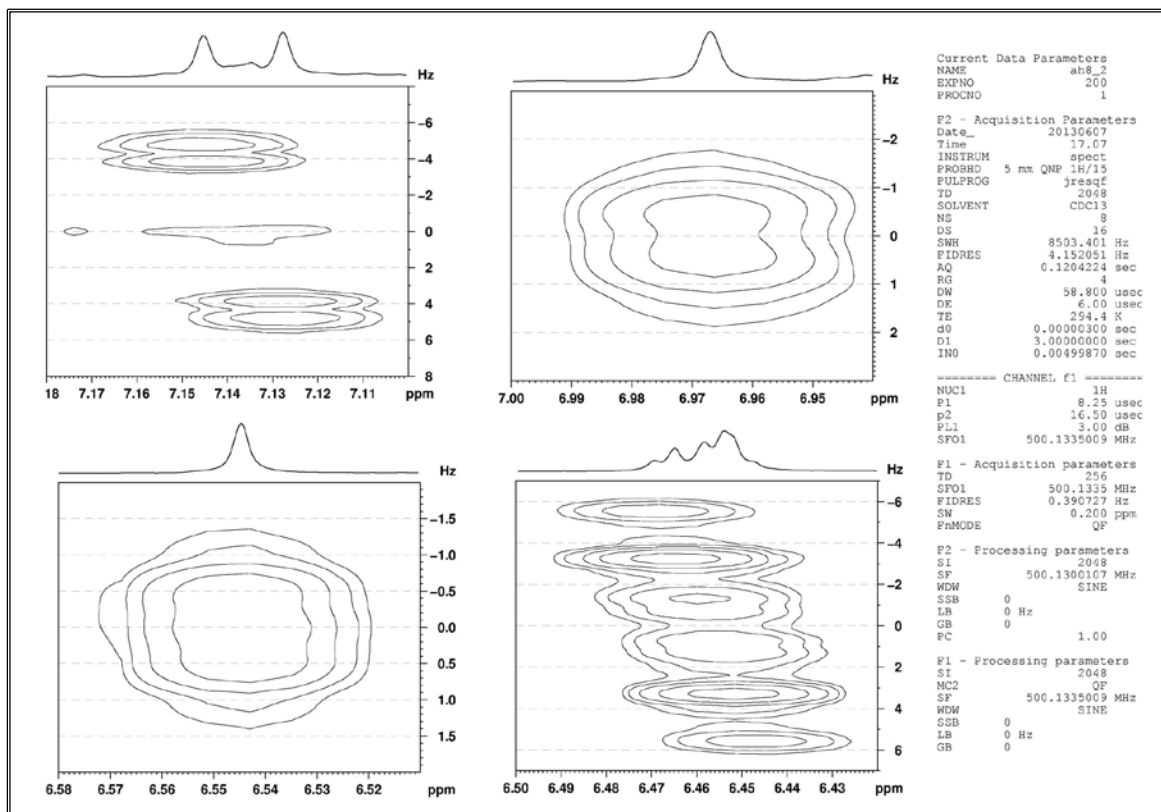


Espectro 12 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de 1(CDCl_3 , 500 MHz)



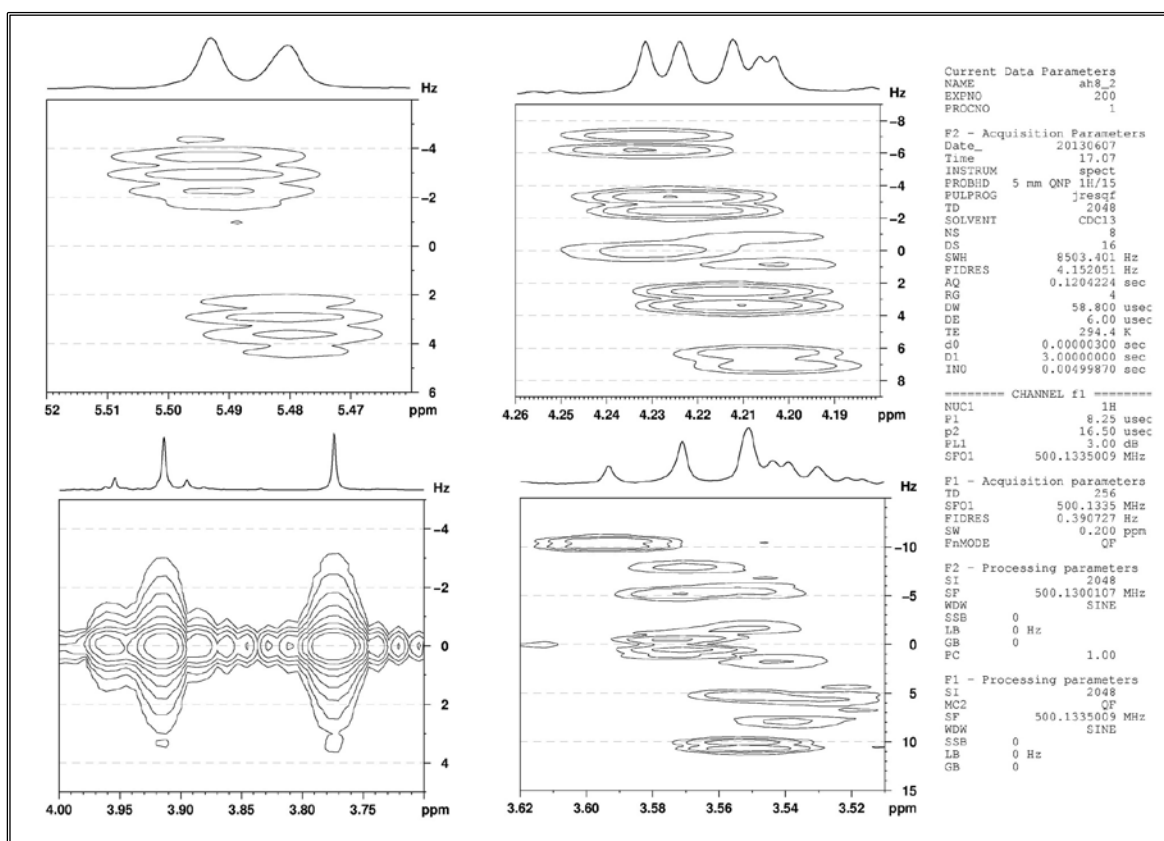


Espectro 13 - Espectro de *J*-resolved de **1** (CDCl₃, 500 MHz).



Espectro 14 – Expansão do espectro de *J*-resolved de **1** (CDCl₃, 500 MHz).





Espectro 15 - Expansão do espectro de *J-resolved* de **1** (CDCl₃, 500 MHz).



4.2 (6a*S*,11a*S*)-3-hidróxi-9-metoxipterocarpano (2)

Na fração AFH10- 15 (3,8 mg), (parte experimental, item 3.4.1, pág. 10), foi identificada a substância **2**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 16, pág. 34), obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em $3398,3\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas no composto. Observou-se, também, uma absorção em $1620,0\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à presença de C=C de aromáticos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Os dados espectrais de RMN de ^1H (Espectro 17, pág. 34) e RMN de ^{13}C (Espectro 18, pág. 35) de **2** mostraram-se bastante semelhantes aos de **1**, diferindo apenas, na parte relativa ao anel. Isto indica que **2**, também, possui um esqueleto flavonoídico do tipo pterocarpano, substituído com uma metoxila em C-9 no anel D, com diferenças nas substituições relativas ao anel A (**Figura 6**).

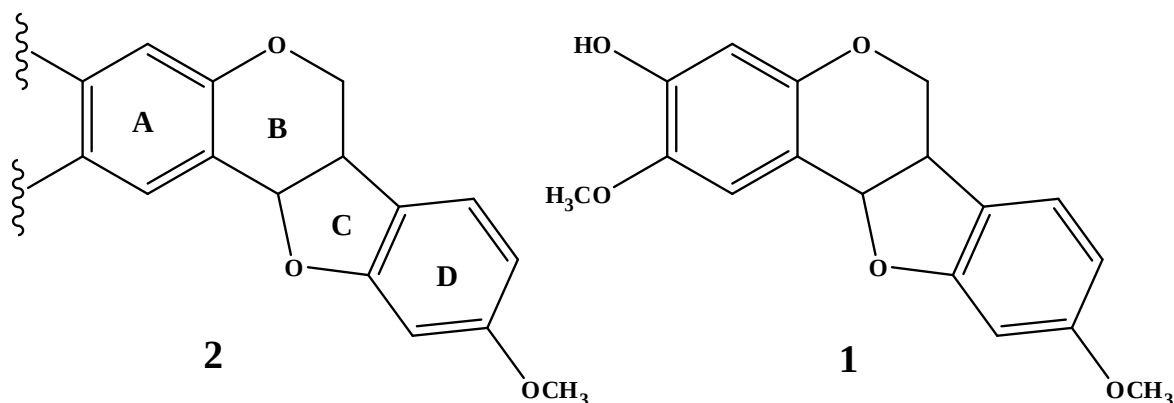


Figura 6 - Estrutura parcial de **2** e Estrutura molecular de **1**.

O anel A foi caracterizado no espectro de RMN de ^1H (Espectro 17, pág. 34) por dois dubletos em δ 7,39 ($J = 8,3\text{ Hz}$; H-1) e 6,42 ($J = 1,9\text{ Hz}$; H-4) e um duplo dubleto em δ 6,56 ($J = 8,3$ e $1,9\text{ Hz}$; H-2), enquanto no espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 18, pág. 35, **Tabela 5**, pág. 32) foram observados sinais em δ 132,2 (C-1); 109,8 (C-2); 157,1 (C-3); 103,7 (C-4); 156,7 (C-4) e 112,6 (C-11).

As diferenças de **2** em relação a **1** correspondem, principalmente, aos deslocamentos químicos dos sinais relativos à C-1, C-2 e C-3 e na ausência nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de um sinal relativo a metoxila ligada ao C-2 de **2**. A ausência deste sinal é compatível com a proteção de 32,2 ppm observada C-2 em **2**.



A rotação óptica específica ($[\alpha]_{25}^D$) determinada para **2** foi $+139,5^\circ$ (c 0,2, CHCl_3), como o valor é positivo sugeriu-se uma estereoquímica absoluta *S* para os centros quirais (6a*S*, 11a*S*) da estrutura (HARBORNE & MABRY, 1982).

Na comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **2** com os dados da literatura (HERATH *et.al*, 1998) observou-se que há uma boa correlação com os da (+)-medicarpina (**Tabela 6**, pág. 33). Assim, a substância **2** foi identificada como sendo o pterocarpano (6a*S*,11a*S*)-3-hidróxi-9-metilpterocarpano (**Figura 7**), também, conhecido como (+)-medicarpina ou (6a*S*,11a*S*)-Medicarpina, a qual está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Aeschynomene*.

(+)-medicarpina apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura, dentre elas, atividade antibacteriana (OH *et al.*, 2011), citotóxica (Li *et al.*, 2008) e antimitótica (MILITÃO *et al.*, 2005).

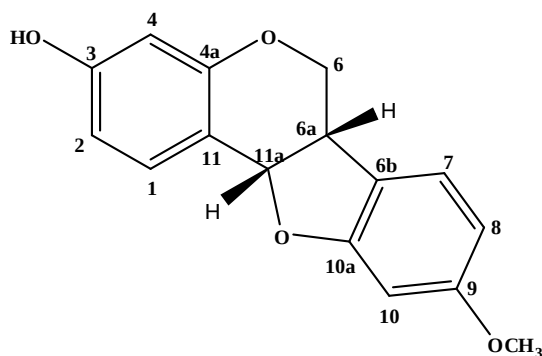


Figura 7 - (6a*S*,11a*S*)-Medicarpina (**2**).



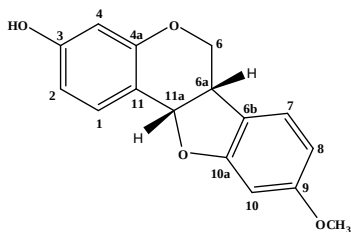


Tabela 5 - Dados de RMN 1D e 2D de 2.

Nº	2		
Carb.	δ_H^a , mult, J/Hz ^b	δ_C^a	HMBC ^a
1	7,39 (1H; d; 8,3)	132,2	C-4; C-4a; C-11a
2	6,56 (1H; dd; 8,3 e 1,9)	109,8	C-4; C-11
3		157,1	
4	6,42 (1H; d; 1,9)	103,7	C-2; C-11;
4a		156,7	
6	4,24 (H β ; dd, 11,1 e 5,2)	66,5	C-4a, C-6a, C-6b; C-11a
	3,62 (H α ; t, 11,1)		C-4a; C-6a; C-6b;
6a	3,53 (1H; ddd; 11,1, 6,3 e 5,2)	39,5	C-6; C-6b; C-10a
6b		119,1	
7	7,13 (1H; d; 8,5)	124,7	C-6a; C-9; C-10; C-10a
8	6,46 (1H; dd; 8,5 e 2,3)	106,4	C-6b; C-10;
9		161,1	
10	6,45 (1H; d; 2,3)	96,9	C-6b; C-8; C-10a
10a		160,7	
11		112,6	
11a	5,50 (1H; d; 6,3)	78,5	C-1; C-4a; C-6; C-11
O-CH ₃	3,75 (s)	55,5	

^aEspectros obtidos em CDCl₃, 500/75MHz^bValores observados com o auxílio do experimento *J-resolved*

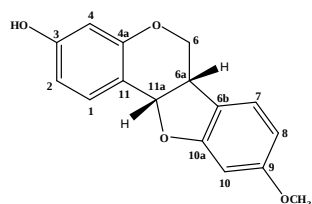


Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **2** e da (+)-medicarpina (HERATH *et.al*, 1997).

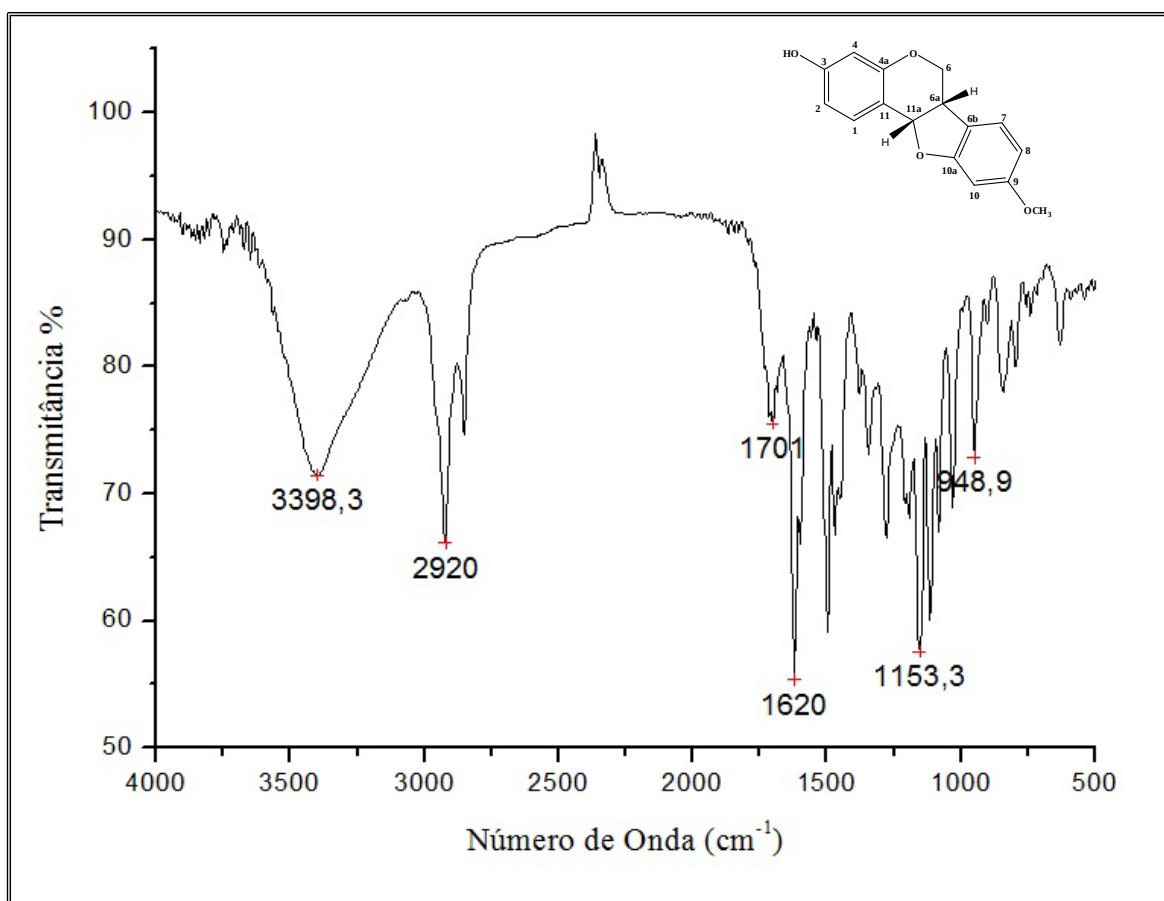
Nº	2		Medicarpina	
Carb.	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz^{b}	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$, mult, J/Hz^{b}
1	132,2	7,39 (1H; <i>d</i> ; 8,3)	132,6	7,41 (1H; <i>d</i> ; 8,4)
2	109,8	6,56 (1H; <i>dd</i> ; 8,3 e 1,9)	102,2	6,58 (1H; <i>dd</i> ; 8,4 e 2,4)
3	157,1		157,5	
4	103,7	6,42 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	104,1	6,44 (1H; <i>d</i> ; 2,4)
4a	156,7		157,1	
6	66,5	4,24 (H β ; <i>dd</i> , 11,1 e 5,2) 3,62 (H α ; <i>t</i> , 11,1)	67,0	4,26 (1H; <i>dd</i> ; 11,0 e 5,0) 3,64 (1H; <i>dd</i> ; 11,0 e 10,9)
6a	39,5	3,53 (1H; <i>ddd</i> ; 11,1, 6,3 e 5,2)	39,9	3,55 (1H; <i>ddd</i> ; 11,0, 6,7 e 5,1)
6b	119,1		119,5	
7	124,7	7,13 (1H; <i>d</i> ; 8,5)	125,2	7,15 (1H; <i>d</i> ; 8,9)
8	106,4	6,46 (1H; <i>dd</i> ; 8,5 e 2,3)	106,8	6,48 (1H; <i>m</i>)
9	161,1		161,1	
10	96,9	6,45 (1H; <i>d</i> ; 2,3)	97,3	6,48 (1H; <i>m</i>)
10a	160,7		161,5	
11	112,6		113,0	
11a	78,5	5,50 (1H; <i>d</i> ; 6,3)	79,0	5,52 (1H; <i>d</i> ; 6,8)
O-CH₃	55,5	3,75 (<i>s</i>)	55,9	3,79 (<i>s</i>)

^aEspectros obtidos em CDCl_3 , 500/75 MHz

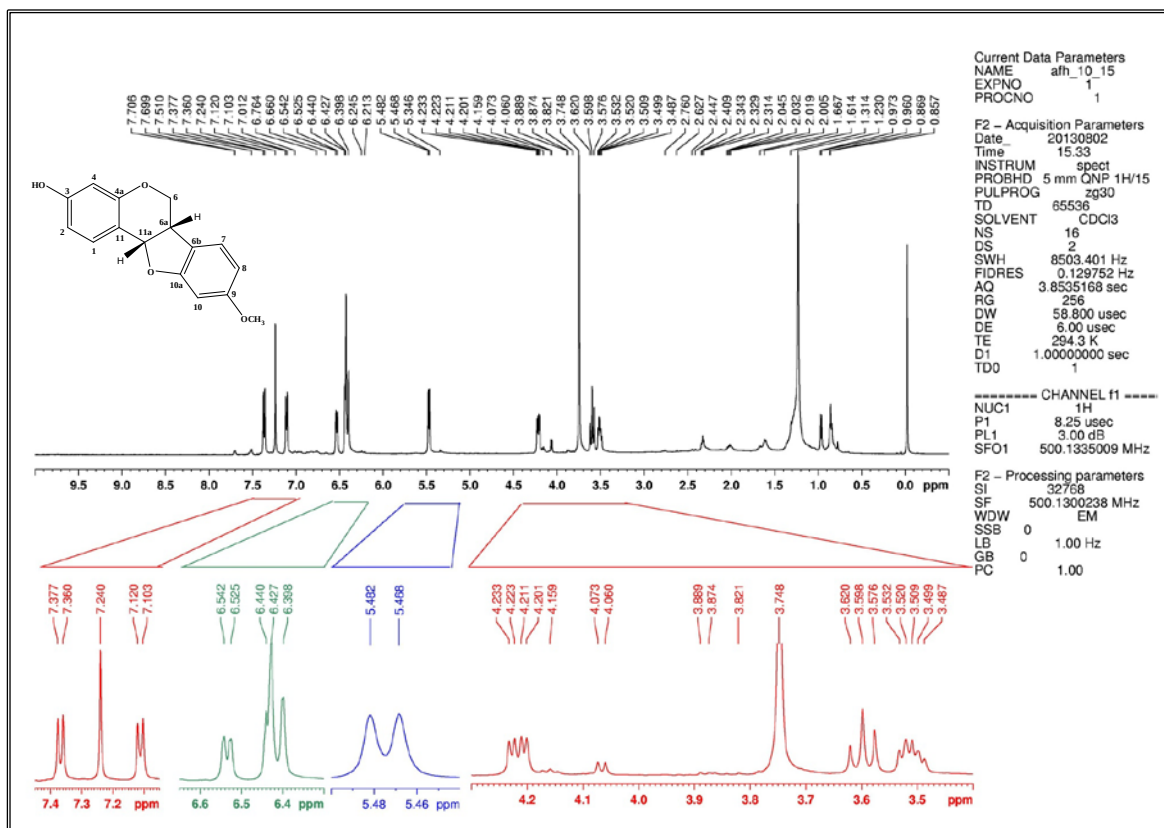
^bValores observados com o auxílio do experimento *J-resolved*

^cEspectros obtidos em CDCl_3 , 400/100 MHz



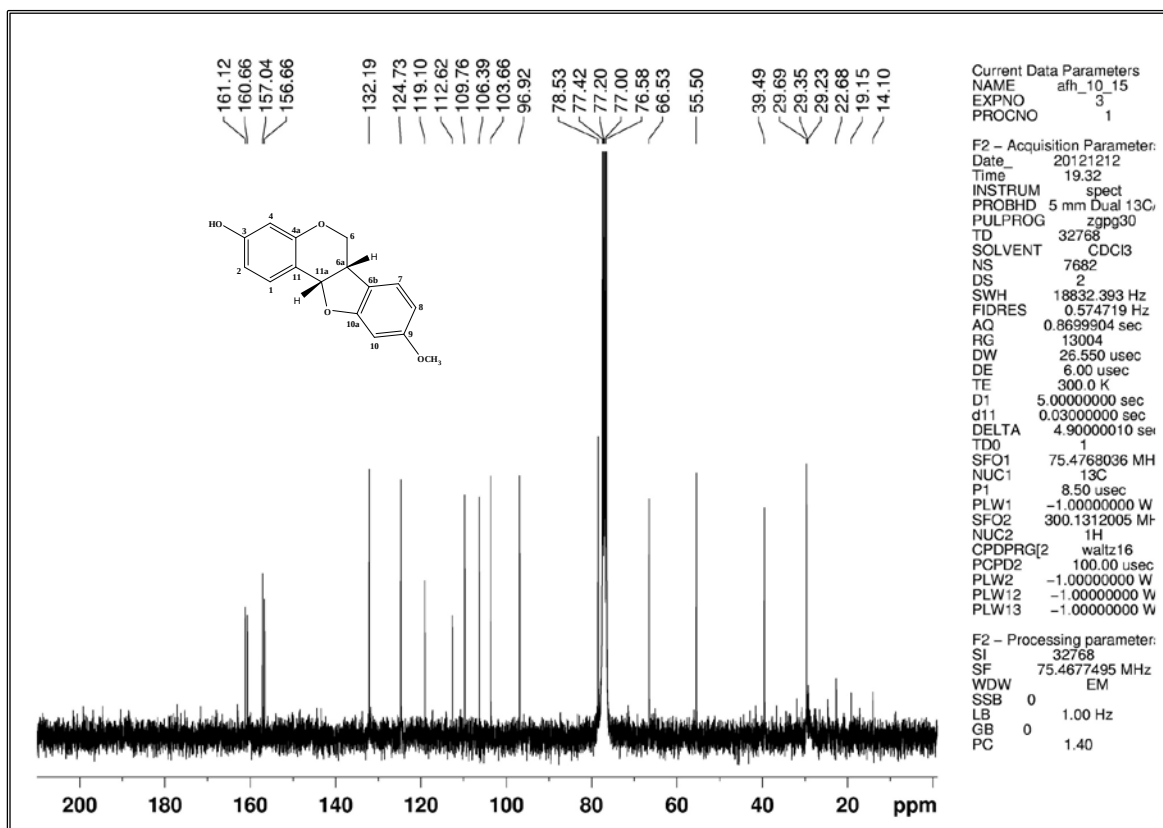
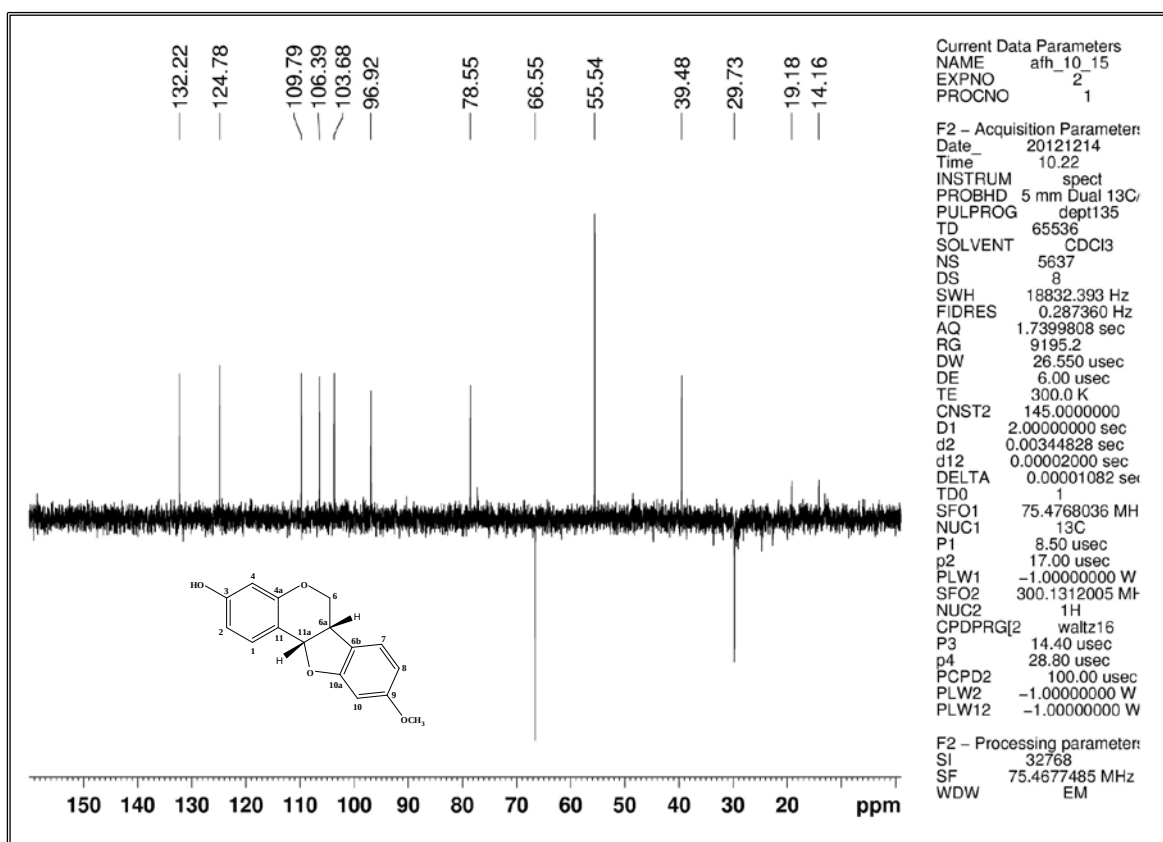


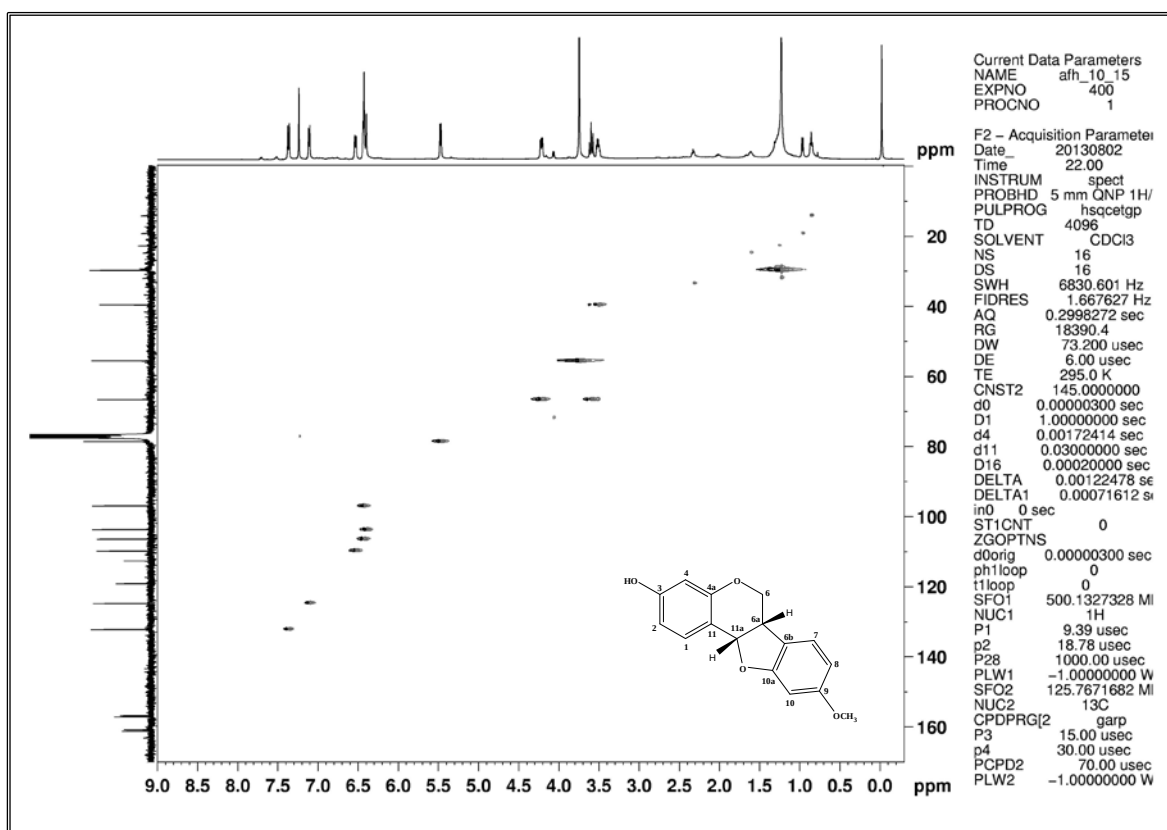
Espectro 16 - Espectro na região do Infravermelho de 2 (Pastilha de KBr).



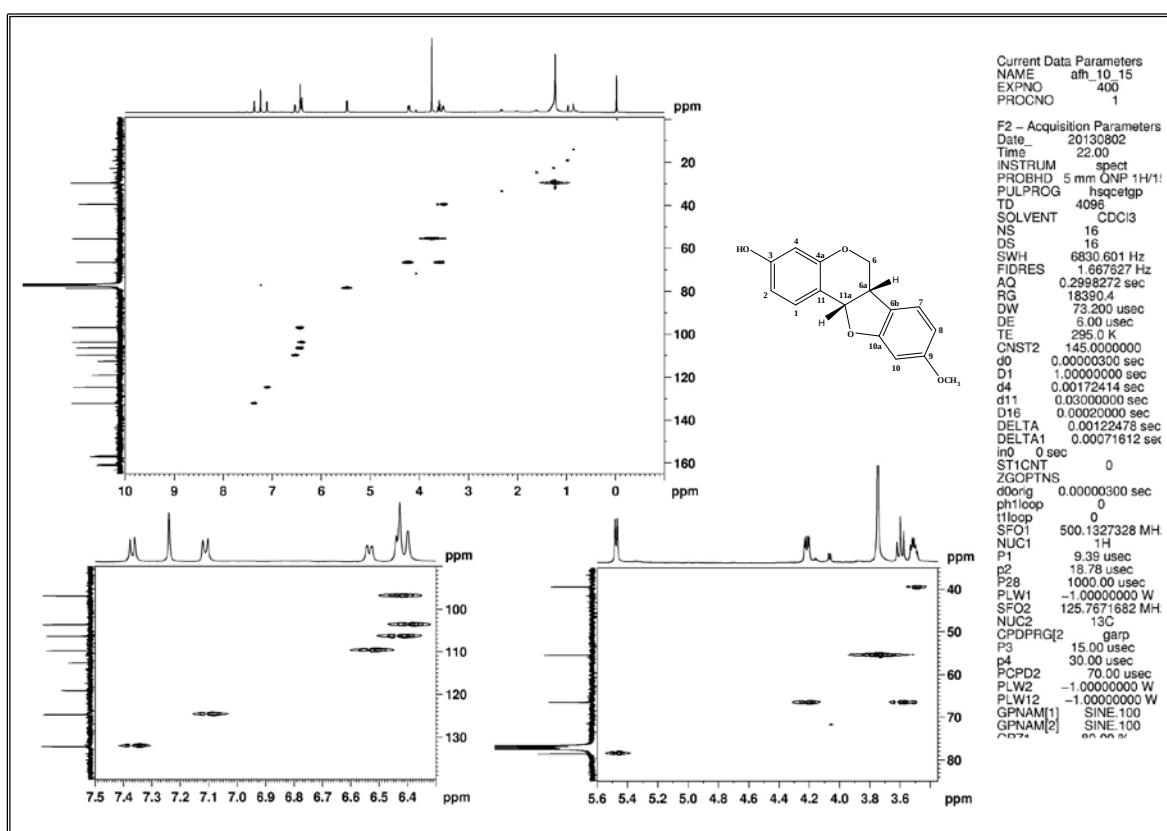
Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H de 2 (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 18 - Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (CDCl_3 , 75 MHz).Espectro 19 - Espectro de RMN DEPT 135° de 2 (75 MHz, CDCl_3).

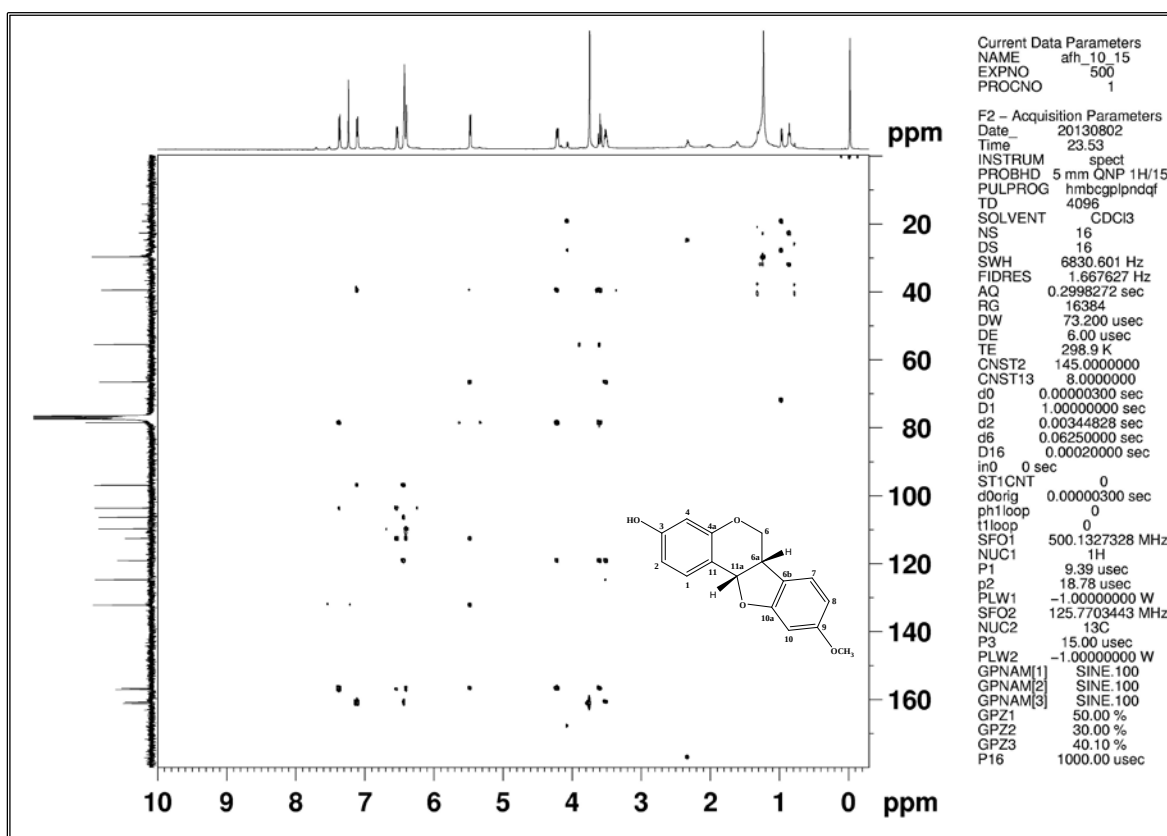


Espectro 20 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de **2** (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).

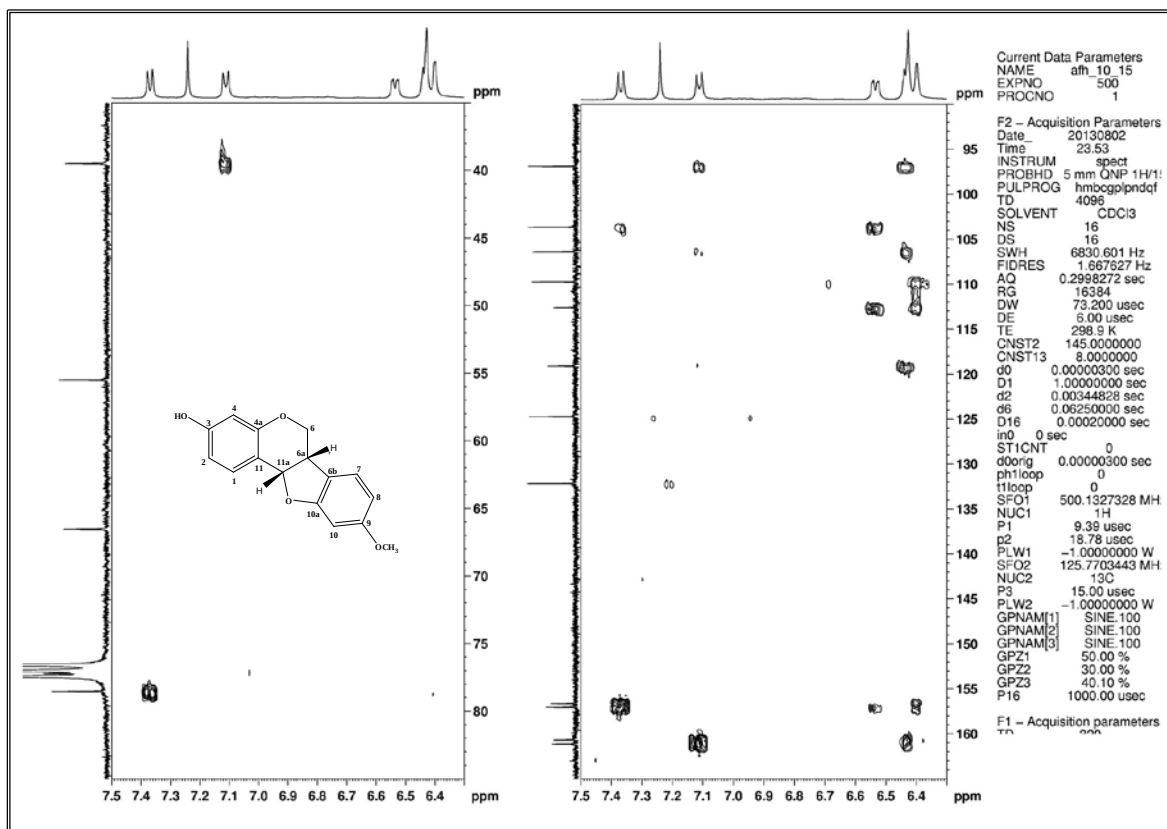


Espectro 21 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HSQC de **2** (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).



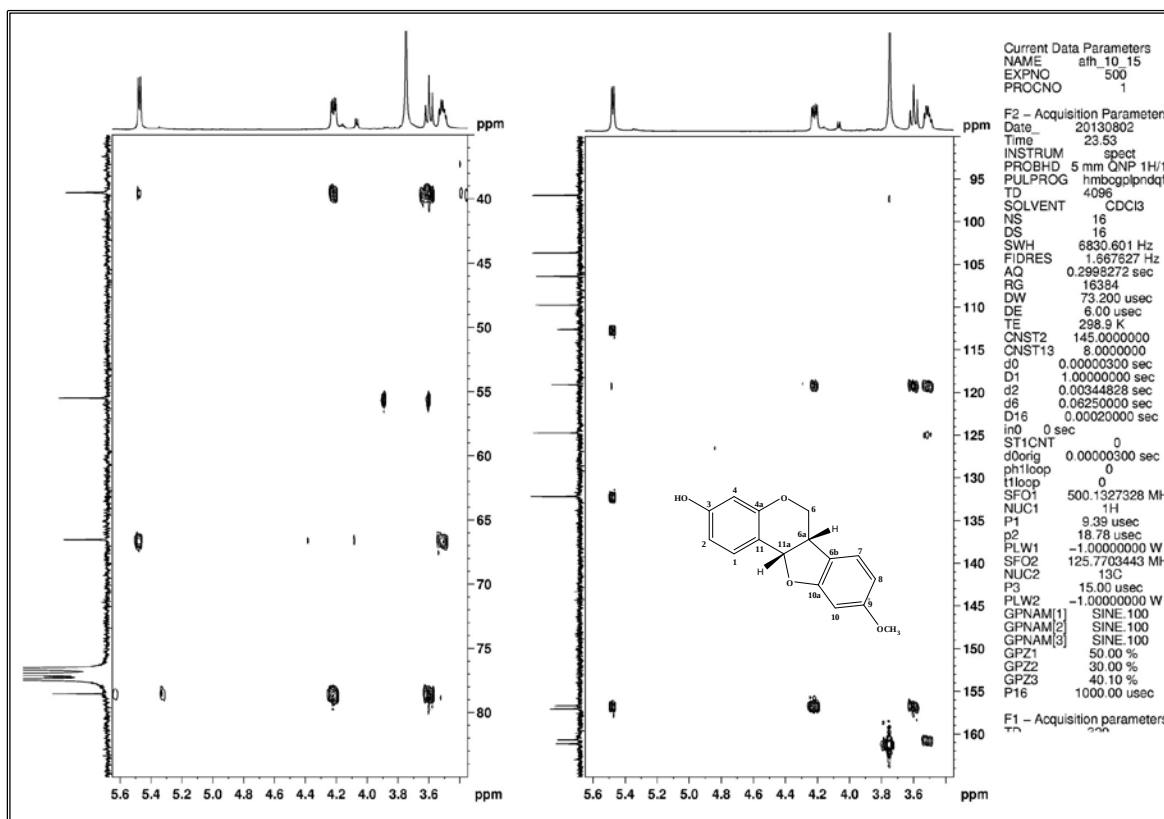


Espectro 22 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de **2** (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).

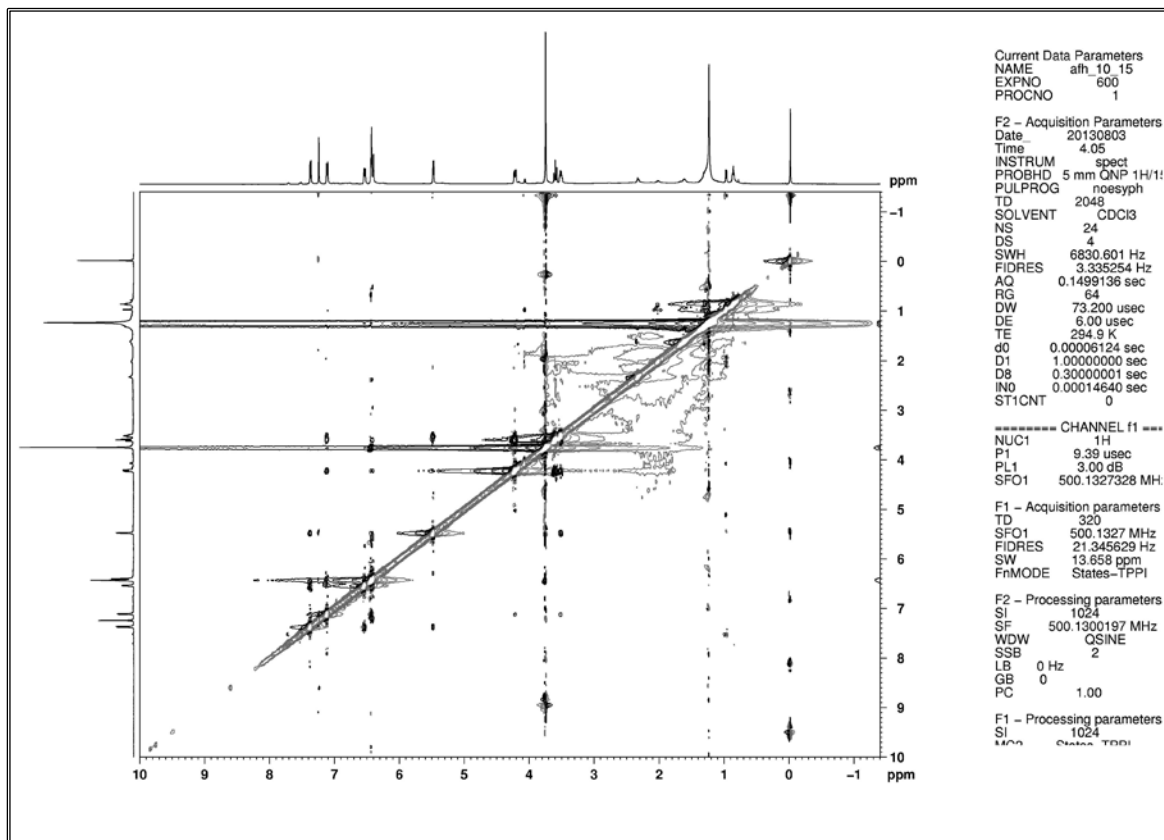


Espectro 23 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de **2** na região de 7,5 – 6,3 ppm (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).



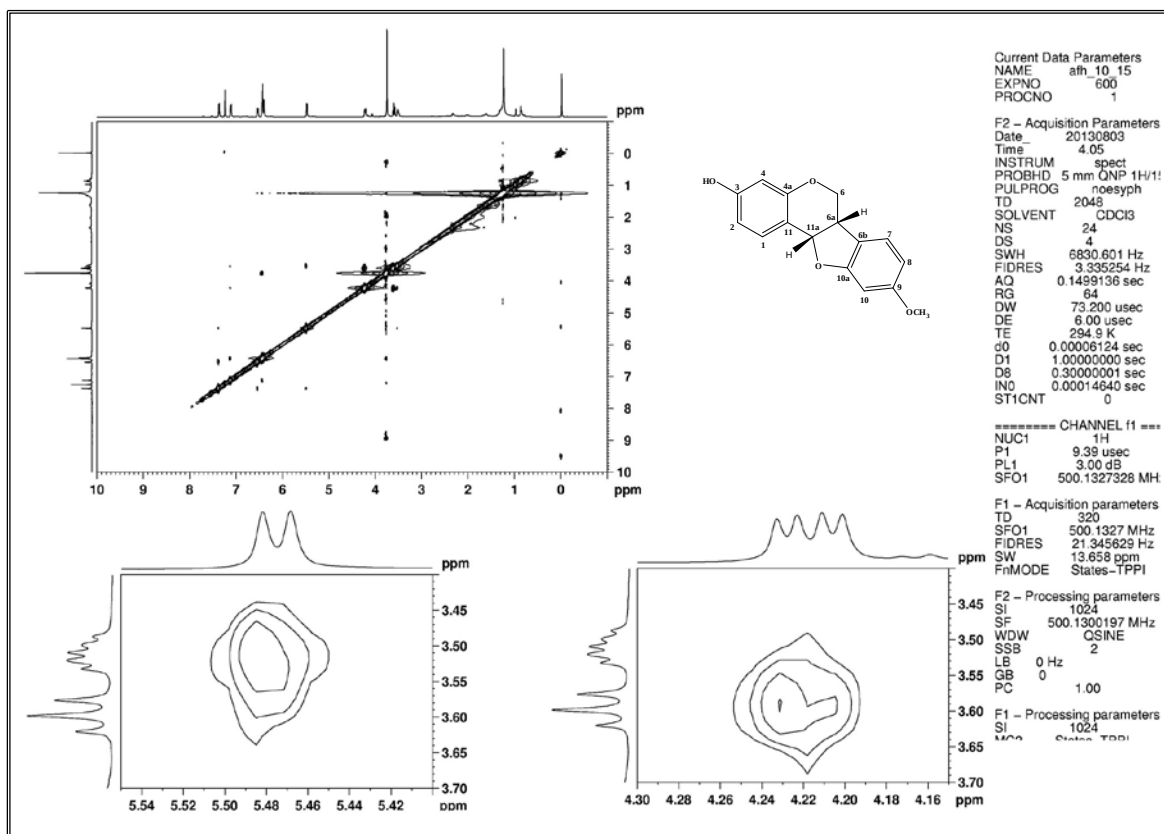


Espectro 24 - Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) - HMBC de **2** na região de 5,6 – 3,5 ppm (CDCl_3 , 500 e 75 MHz).

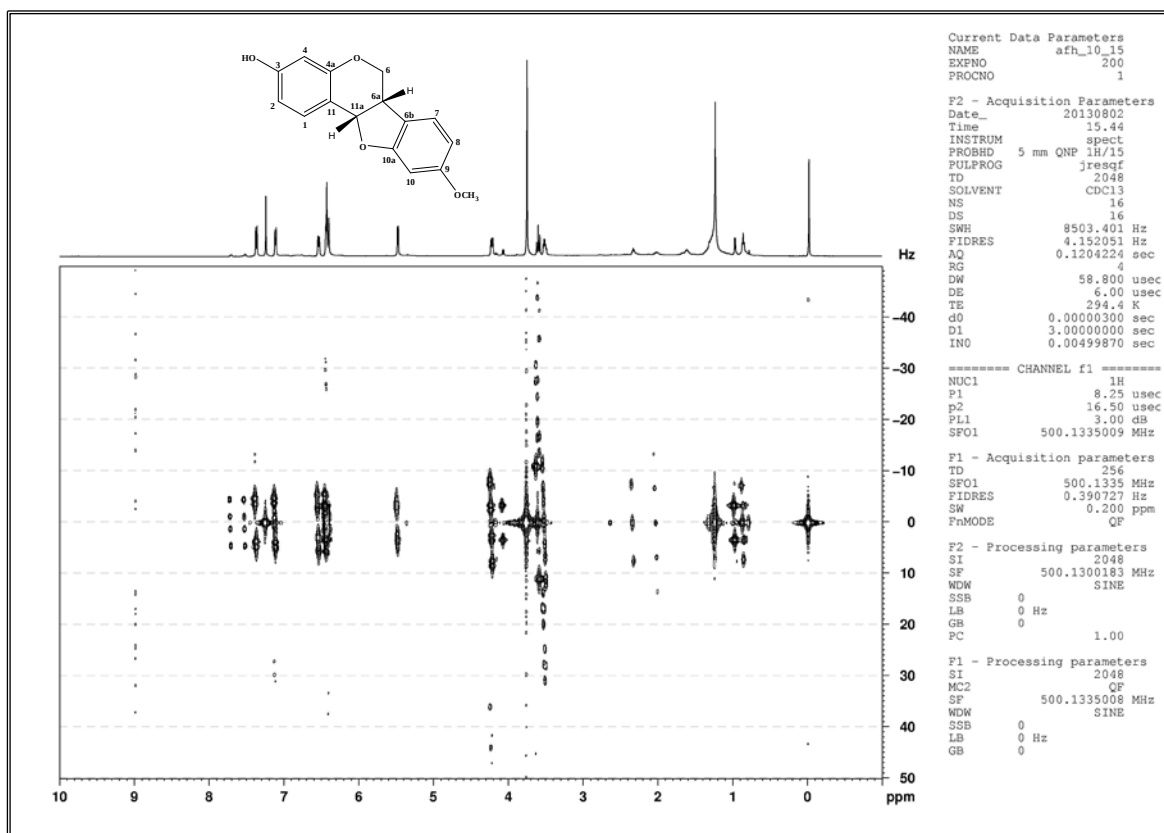


Espectro 25 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - NOESY de **2** (CDCl_3 , 500 MHz).



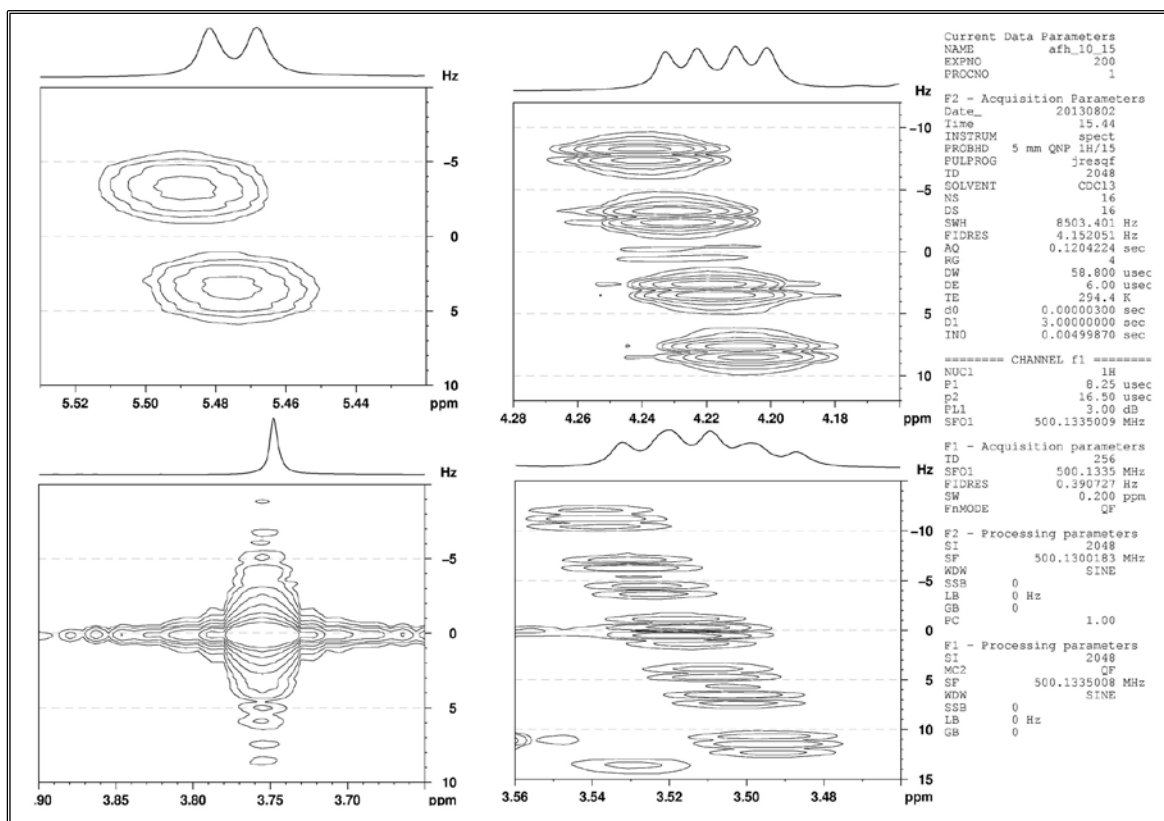
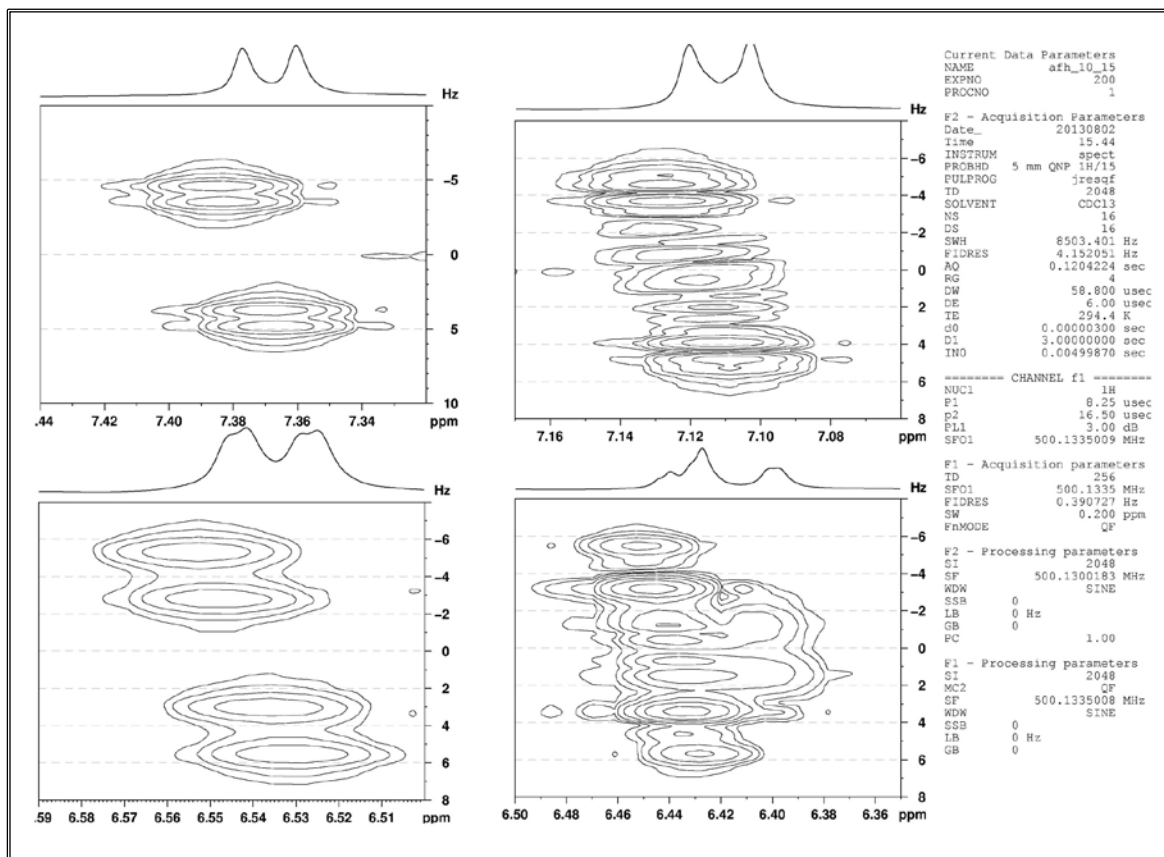


Espectro 26 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de **2** (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 27 - Espectro de *J*-resolved de **2** (CDCl_3 , 500 MHz).




 Espectro 28 – Ampliação do espectro de *J*-resolved de 2 (CDCl₃, 500 MHz).

 Espectro 29 - Ampliação do espectro de *J*-resolved de 2 (CDCl₃, 500 MHz).


4.3 Pterocarpanos

Na literatura só há relatos do composto (6aR,11aR)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano que apresenta $[\alpha]_D^{23} - 297^\circ$ (EtOH) (PUEPPKE & van ETTEN 1974). Assim, (6aS,11aS)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**) se constitui no enantiômero do composto já isolado e, portanto, é inédito na literatura.

Segundo Andersen & Markham (2006), uma possível rota biossintética para os isoflavonoides e seus derivados é a descrita na **Figura 8**, onde na etapa 1 a enzima 2-sintase-hidróxi-isoflavanona (2HIS), também conhecida como isoflavonasintase, catalisa a migração do anel aromático de C-2 para C-3 e a hidroxilação de C-2, para a formação do intermediário (2R,3S)-2-hidróxi-isoflavanona. A desidratação deste intermediário ocorre espontaneamente ou por meio da ação da enzima da desidratase isoflavona (IFD), para então formar as isoflavonas (etapa 2). O passo chave na formação dos pterocarpanos é a hidroxilação na posição C-2' das isoflavonas, que é catalisada pela enzima isoflavona-2'-hidroxilase (I2'H), formando o intermediário 2'-hidróxi-isoflavona (etapa 3). O intermediário 3 é reduzido pela enzima dependente de NADPH, isoflavona redutase (IFR), formando a isoflavonona (etapa 4), intermediário final da biossíntese dos pterocarpanos. Na etapa 5, ocorre a redução catalizada pela enzima dependente de NADPH, denominada pterocarpano sintase (PTS) e, em seguida, a enzima 7,2'-di-hidróxi-4'-metóxi-isoflavanol desidratase (DMID) catalisa a perda de uma molécula de água e a formação do anel C, dando origem aos pterocarpanos.



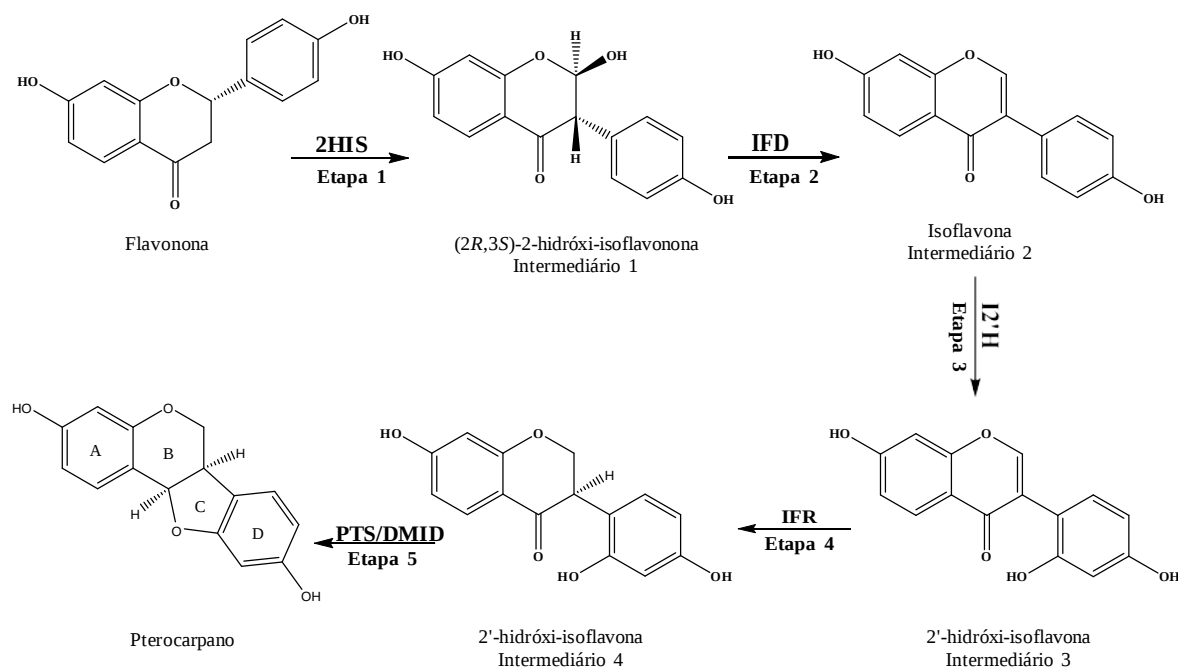


Figura 8- Rota biossintética, segundo Andersen & arkham (2006), para os pterocarpanos.

O esqueleto pterocarpânico apresenta dois centros quirais na junção dos anéis B e C. Na natureza, apenas a configuração *cis* (*RR* ou *SS*) é comumente encontrada. Estudos computacionais mostram que uma junção *trans* (*RS* ou *SR*) entre os anéis B e C é energeticamente desfavorável (SCHOENING & FRIEDRICHSEN, 1989).

Os pterocarpanos constituem a segunda maior classe dos isoflavonoides naturais, desempenham um papel importante como fitoalexinas (substâncias acumuladas por plantas, em resposta a um fator de *stress*) e apresentam importantes atividades biológicas, como por exemplo, atividades antifúngicas, antibacterianas, antitumorais e até atividade inseticida (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).



4.4 Cafeato de docosila (3) e Cafeato de tetracosila (4)

Na fração AFH10- 11 (12,0 mg) (parte experimental, item 3.4.1, pág. 9) foram caracterizadas duas substâncias: **3** e **4**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 31, pág. 47), obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em 3325 cm^{-1} característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas na estrutura no composto. Observou-se uma absorção em 2920 cm^{-1} , indicativa de estiramento de CH de grupos metínicos, metilênicos e/ou metílicos. Também foi observada, uma absorção em $1604,6\text{ cm}^{-1}$, atribuída à ligações de C=C de aromáticos, além de uma banda de absorção com intensidade média em $1685,6$ atribuída à estiramento C=O (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 32, pág. 47) apresentou três sinais relativos a hidrogênios de anel aromático, sendo dois dubletos em $\delta\ 7,05$ ($J = 1,9\text{ Hz}$) e $6,83$ ($J = 8,2\text{ Hz}$) e um duplo dubleto em $\delta\ 6,96$ ($J = 8,2$ e $1,9\text{ Hz}$), caracterizando um sistema trissubstituído 1,2,4. Também foram observados dois dubletos em $\delta\ 7,52$ ($J = 16,0\text{ Hz}$) e $6,21$ ($J = 16,0\text{ Hz}$), atribuídos a hidrogênios olefínicos de uma ligação dupla conjugada com configuração *trans*. Este conjunto de sinais sugere que a estrutura de **3** e de **4** possui de um esqueleto básico C6-C3. Além disso, foi possível observar um tripleto em $\delta\ 4,14$ ($J = 6,8\text{ Hz}$), indicativo de hidrogênio metilênico ligado a oxigênio de éster, e sinais na região de $\delta\ 0,60$ a $2,50$, relativos a hidrogênios metínicos e/ou metilênicos e sugestivos de uma cadeia alifática saturada. A análise dos dados de infravermelho e RMN de ^1H sugeriu que as estruturas de **3** e **4** correspondem a derivados do ácido cinâmico 1,2,4-trissubstituído, possuindo cadeias alquílicas esterificadas.

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 33, pág. 48) e com auxílio do DEPT 135° (Espectro 34, pág. 48) foi possível listar seis sinais de carbonos de anel aromático, sendo três de CH ($\delta\ 114,2$; $115,7$; $127,5$) e três de C ($122,3$; $144,0$; $146,4$). Foram também listados dois sinais relativos a carbonos de dupla ligação conjugada ($\delta\ 115,4$; $144,7$), um sinal relativo a carbonila conjugada ($\delta\ 167,8$) e um conjunto de sinais na região entre $\delta\ 29,0$ - $32,0$, relativos a carbonos metilênicos compatíveis com a presença de cadeia alifática saturada. Observou-se, também, dois sinais em $\delta\ 64,8$ e $14,1$ relativos a carbono metilênico oxigenado e carbono metílico, respectivamente. Estes dados, reforçam



a hipótese que as substâncias de **3** e **4** sejam derivadas do ácido cinâmico 1,2,4-trissubstituído, possuindo cadeias alquílicas esterificadas.

A identificação dos constituintes da fração AFH10- 11 deu-se por CG/EM (Espectro 30, pág. 46). Os íons moleculares em m/z 488 e m/z 516 no espectro de massas são compatíveis com as fórmulas moleculares de dois ésteres do ácido cafeico: docosilo-3,4-di-hidróxi-*trans*-cinamato ($C_{31}H_{52}O_4$) (**3**) e tetracosilo-3,4-di-hidróxi-*trans*-cinamato ($C_{33}H_{56}O_4$) (**4**). Estes ésteres, também, são conhecidos como cafeato de docosila e cafeato de tetracosila, respectivamente (**Figura 9**), e estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Aeschynomene*. Os dados de RMN de ^{13}C da fração **AFH10- 11** (Espectro 33, pág. 48) e do cafeato de docosilo e cafeato de tetracosilo (GIBBONS *et.al*, 1999) encontram-se na **Tabela 7** (pág. 45).

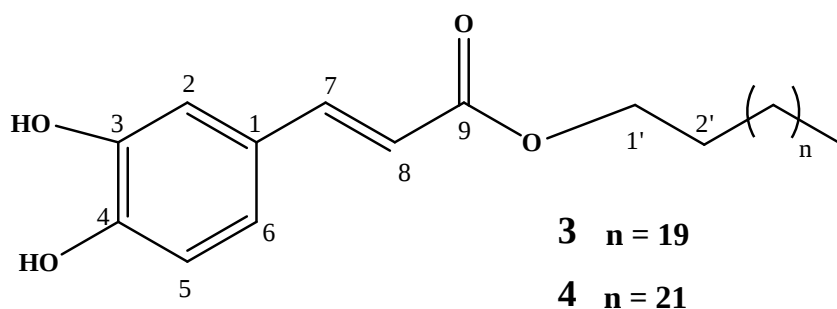


Figura 9 - Cafeato de docosilo (**3**)e cafeato de tetracosilo (**4**).

Cafeato de docosilo apresenta algumas propriedades biológicas descritas na literatura, dentre elas, atividade inibitória (DEY *et al.*, 2009), anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2011) e uma moderada atividade antioxidante (LV *et al.*, 2013).



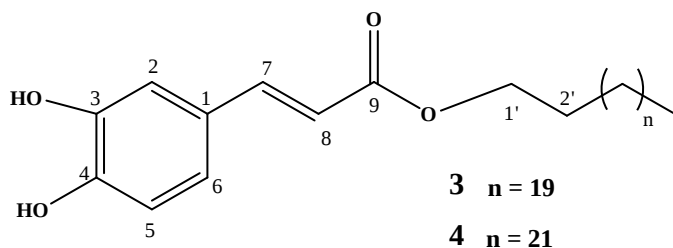


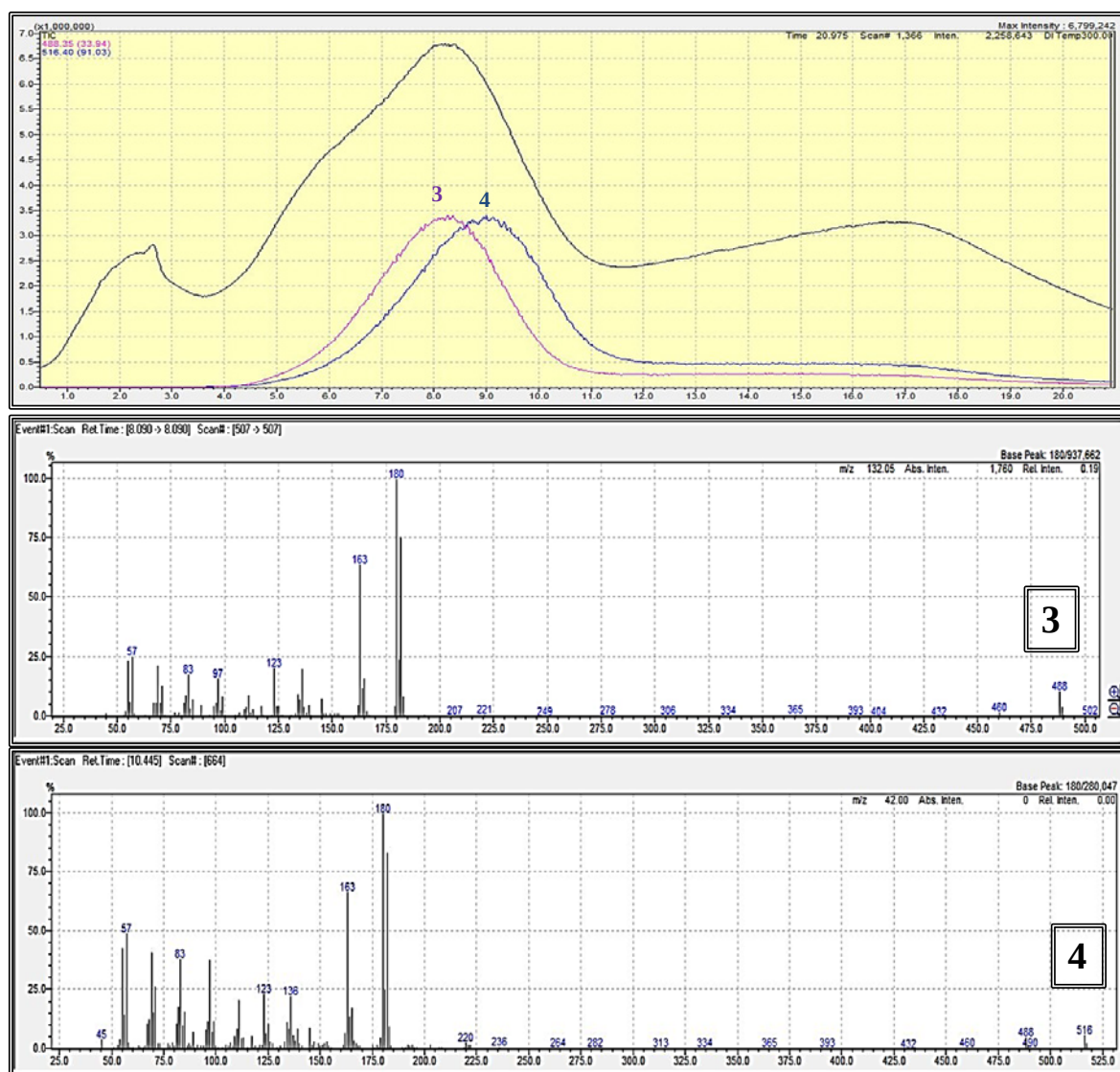
Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C de **AH10- 11** e do cafeato de docosilo e cafeato de tetracosilo (GIBBONS *et.al*, 1999)

Nº de Carb	AFH10- 11		cafeato de docosilo e cafeato de tetracosilo ^b	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
1		127,5		127,8
2	7,05(1H; <i>d</i> ; 1,9)	115,7	7,09 (1H; <i>d</i> ; 1,7)	114,6
3		144,0		144,0
4		146,4		146,5
5	6,83 (1H; <i>d</i> ; 8,2)	114,2	6,87 (1H; <i>d</i> ; 8,2)	115,7
6	6,96 (1H; <i>dd</i> ; 8,2 e 1,9)	122,3	7,01 (1H; <i>dd</i> ; 8,2 e 1,7)	122,6
7	7,52 (1H; <i>d</i> ; 16,0)	144,7	7,57 (1H; <i>d</i> ; 15,9)	144,9
8	6,21 (1H; <i>d</i> ; 16,0)	115,4	6,27 (1H; <i>d</i> ; 15,9)	116,0
9		167,8		168,0
1'	4,14 (2H; <i>t</i> ; 6,8)	64,8	4,19 (2H; <i>t</i> ; 6,7)	65,1
2'		31,8	1,68 (2H; <i>m</i>)	32,1
n = 19 e 21		22,7-29,7	1,10-1,40 (<i>m</i>)	22-32
CH₃	0,83 (3H; <i>t</i> ; 6,2)	14,1	0,88 (3H; <i>t</i> ; 6,4)	14,3

^aEspectros obtidos em CDCl_3 , 300/ 75 MHz

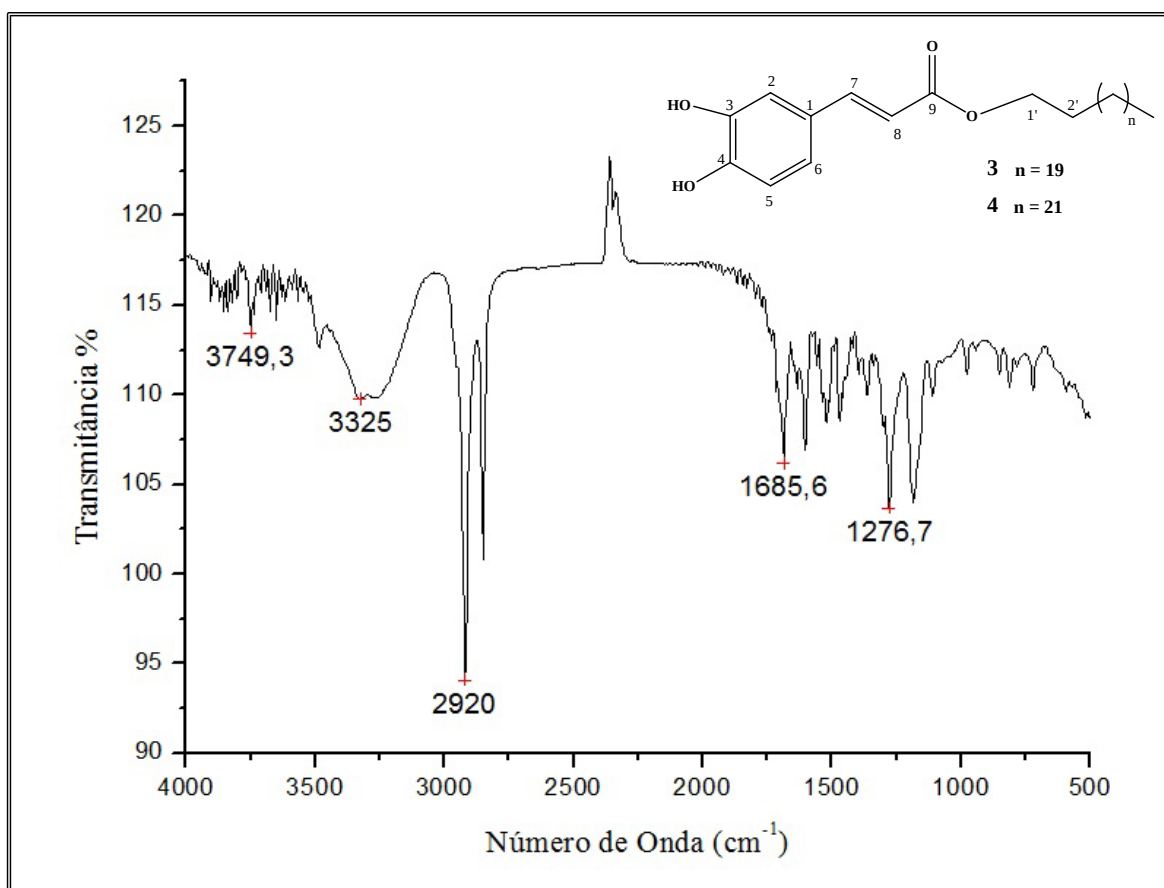
^bEspectros obtidos em CDCl_3 , 400/ 100 MHz



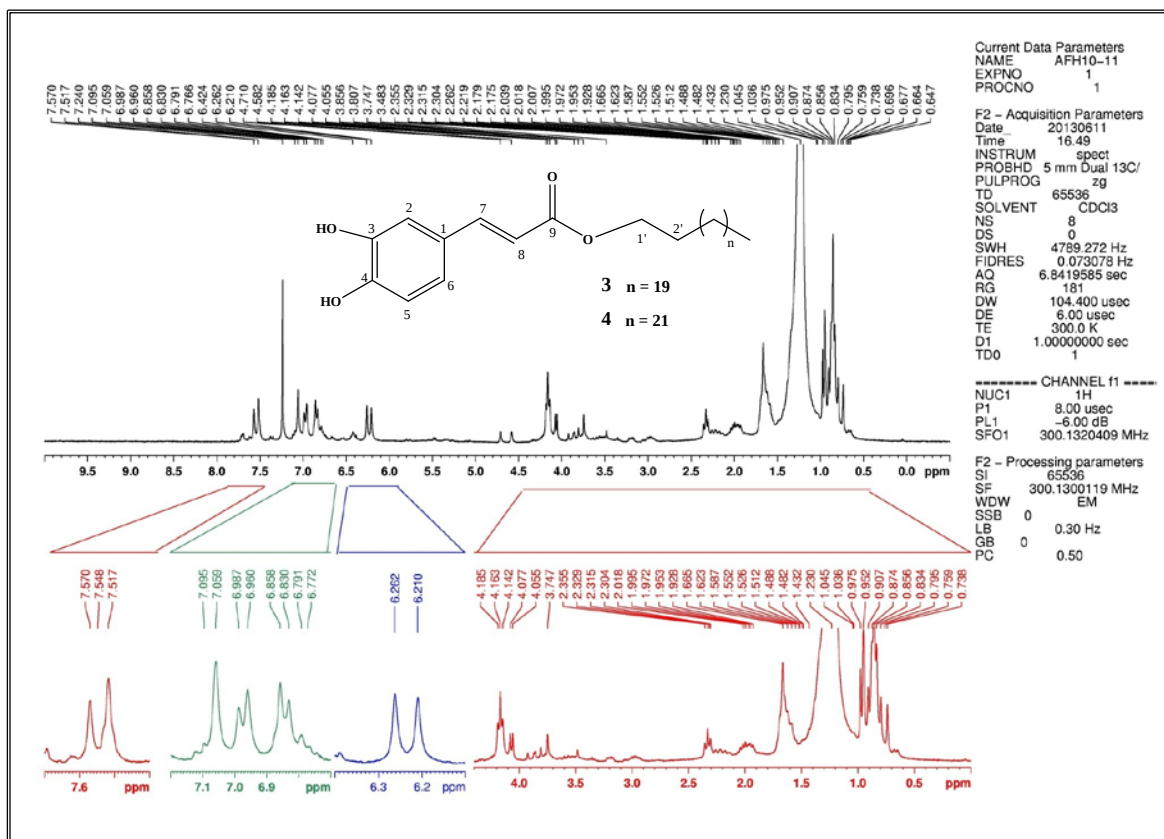


Espectro 30 - Cromatograma da fração AFH10- 11 e o espectro de massas (EI) de 3 e 4, respectivamente.



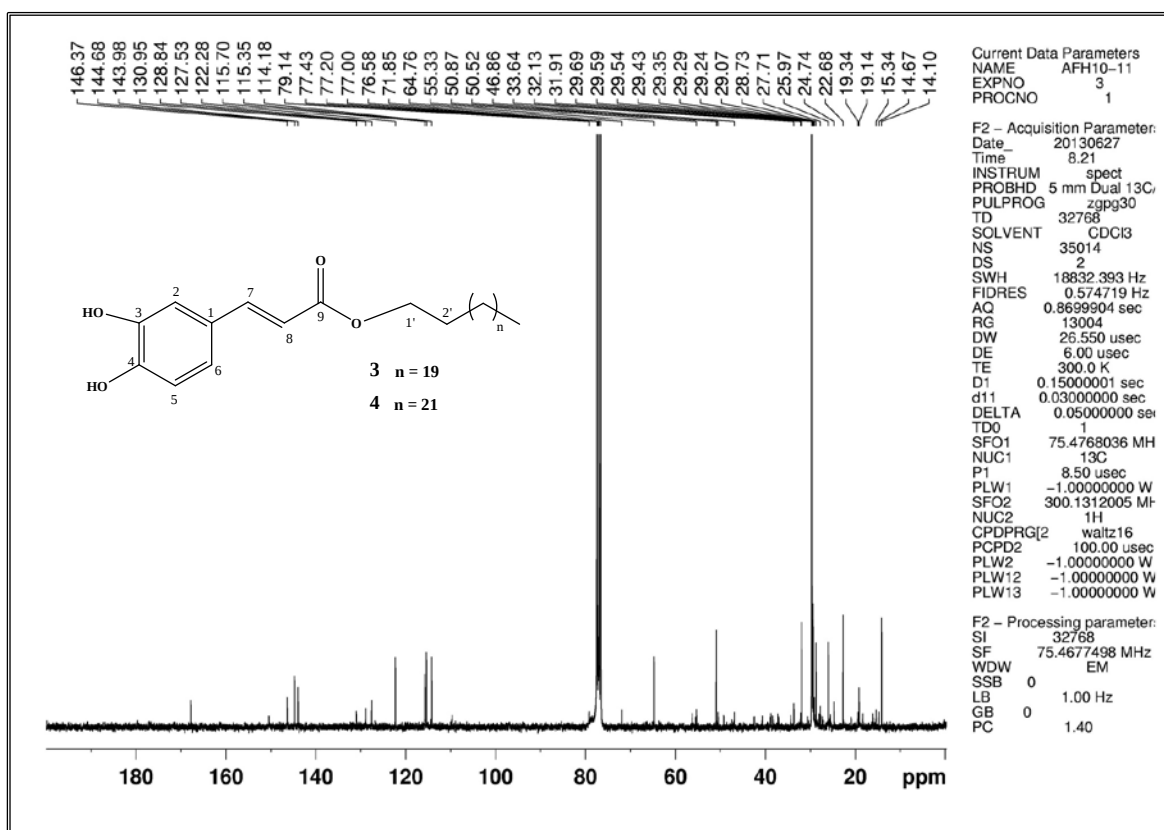
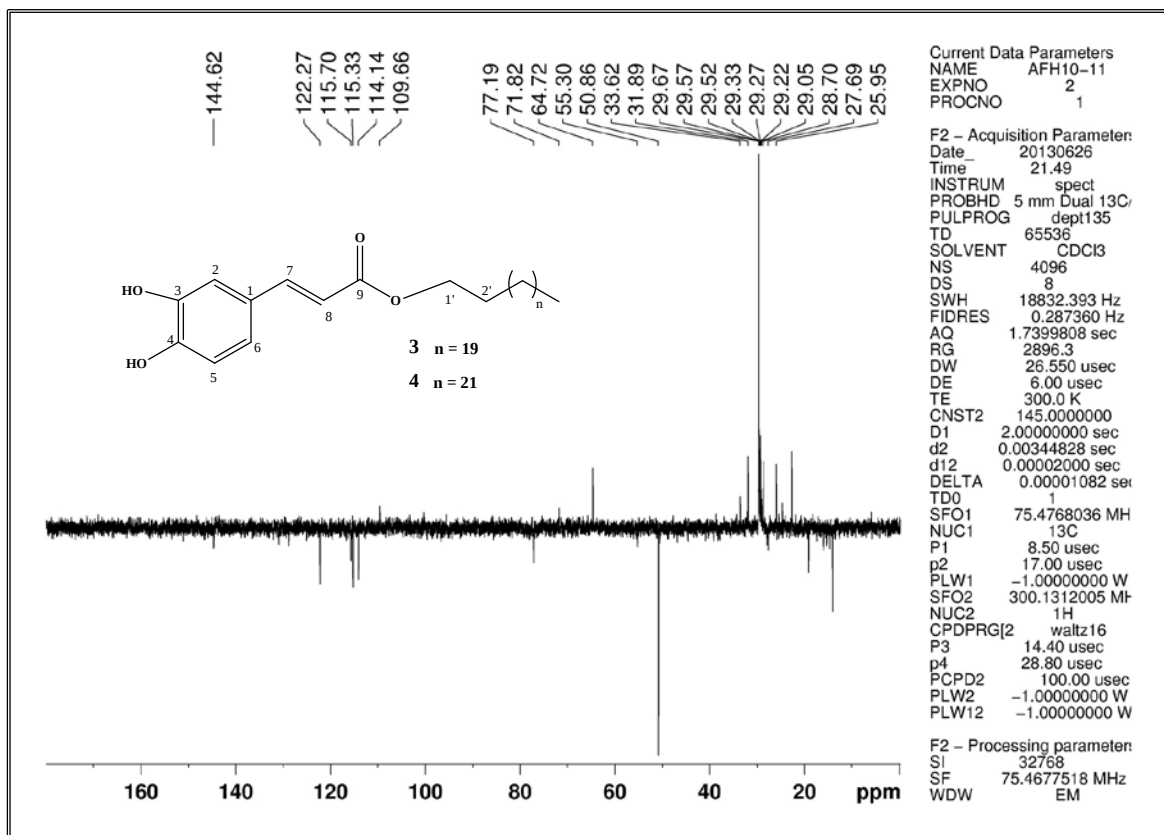


Espectro 31 - Espectro na região do Infravermelho de 3 e 4 (Pastilha de KBr).



Espectro 32 - Espectro de RMN de ¹H de 3 e 4 (CDCl₃, 300MHz).



Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C de **3** e **4** (CDCl_3 , 75 MHz).Espectro 34 - Espectro de RMN DEPT 135° de **3** e **4** (75 MHz, CDCl_3).

4.1 Estigmasterol (5)

Da fração **AFHF- 11** (parte experimental, item 3.4.1.1, pág10), foi identificada a substância **5**.

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 36, pág. 52) apresentou sinais na região de δ 0,40 a 2,90, indicando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de uma estrutura terpênica. Apresentou também um dubleto largo em δ 5,32 ($J = 5,4$ Hz) e de dois duplos dubletos em δ 5,09 ($J = 15,4$ e $8,0$ Hz) e δ 4,94 ($J = 15,4$ e $8,2$ Hz). Este conjunto de sinais são indicativos que **5** trata-se do esteróide estigmasterol.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 37, pág. 53) foi possível observar a presença de vinte e nove sinais, atribuídos a três carbonos quaternários, onze carbonos metínicos, nove carbonos metilênicos e seis carbonos metílicos.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **H- 4** com os dados do estigmasterol (**Figura 10, Tabela 8**, pág. 50) (KOJIMA *et.al*, 1990) mostrou uma excelente correlação, indicando trata-se da mesma substância. O estigmasterol é um esteroide comum em plantas, porém, em geral, ocorre em mistura com o β -sitosterol. Em *Aeschynomene filosa* identificou-se apenas o esteroide estigmasterol (m/z 412, Espectro 35, pág. 52), o qual, já foi isolado, previamente, no gênero *Aeschynomene* (CHEN *et.al*, 2011).

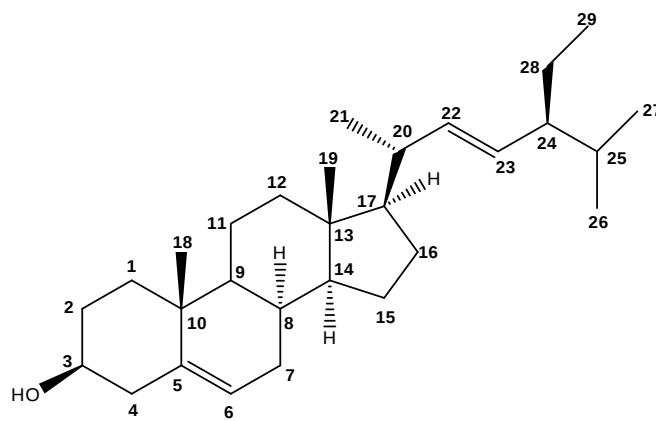


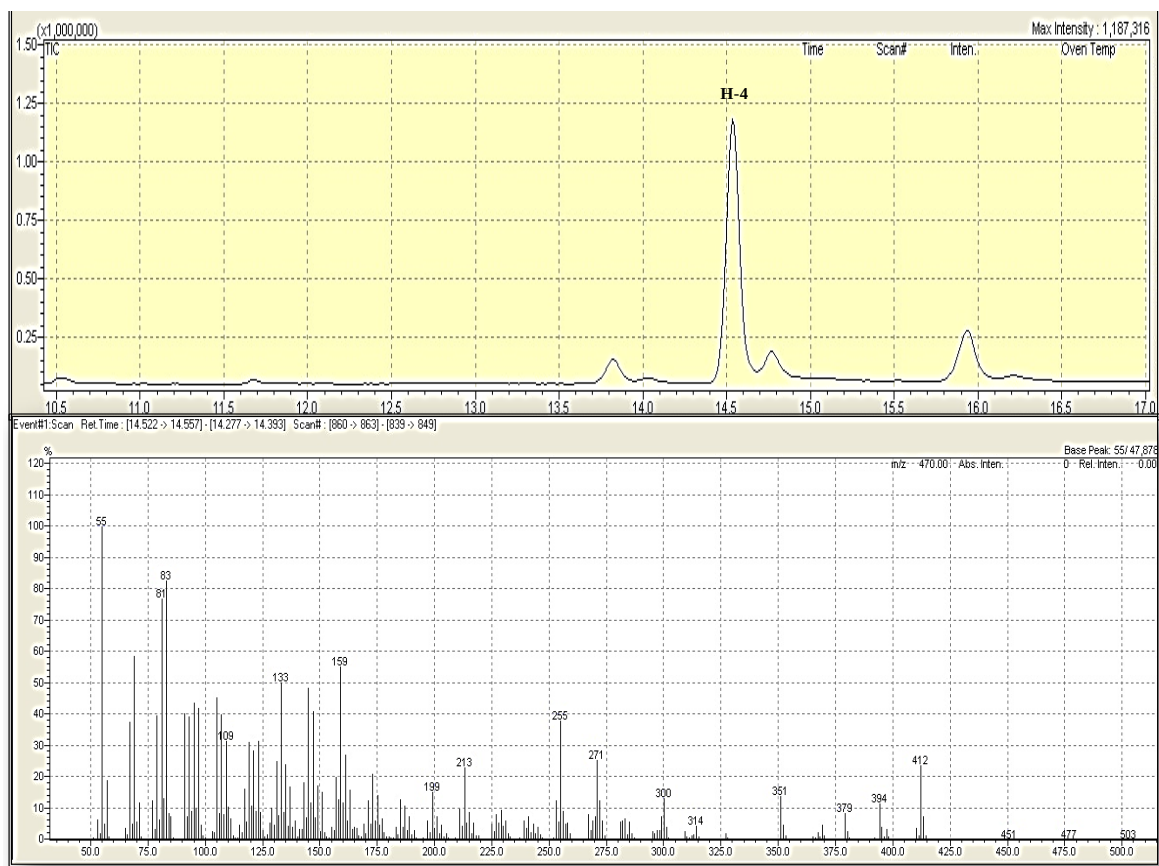
Figura 10 - Estigmasterol (**5**)



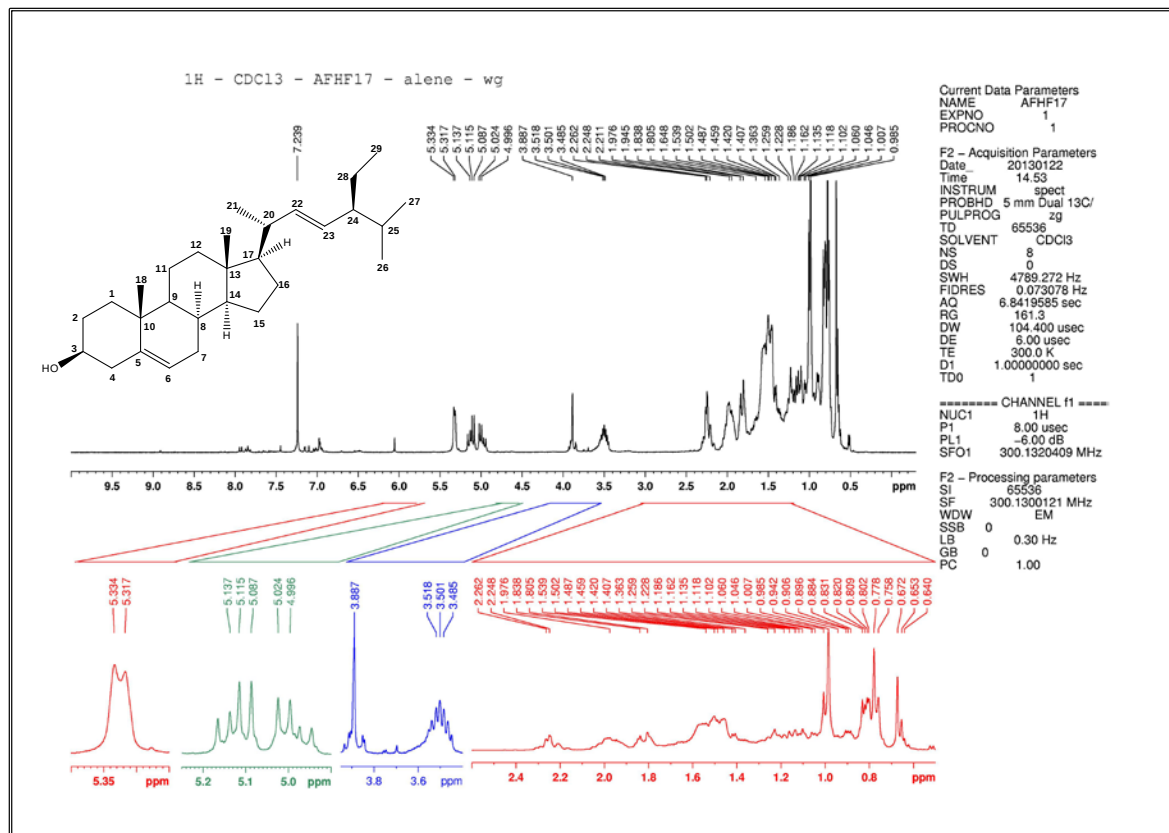
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C de 5 e do estigmasterol (Kojima *et.al*, 1990).

Número de		5	ESTIGMASTEROL
Carbono		$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}^{\text{b}}$
1	CH ₂	37,2	37,2
2	CH ₂	31,6	31,6
3	CH ₂	71,8	71,8
4	CH	42,3	42,3
5	C	140,8	140,7
6	CH	121,7	121,7
7	CH ₂	31,9	31,9
8	CH	31,9	31,9
9	CH	50,2	50,1
10	C	36,5	36,5
11	CH ₂	21,1	21,1
12	CH ₂	39,7	39,7
13	C	42,2	42,1
14	CH	56,9	56,8
15	CH ₂	24,4	24,4
16	CH ₂	28,9	28,9
17	CH	56,0	55,9
18	CH ₃	12,0	12,0
19	CH ₃	19,4	19,4
20	CH	40,5	40,5
21	CH ₃	21,2	21,2
22	CH	138,3	138,3
23	CH	129,3	129,2
24	CH	51,2	51,2
25	CH	31,7	31,9
26	CH ₃	21,1	21,1
27	CH ₃	19,0	19,0
28	CH ₂	25,4	25,4
29	CH ₃	12,3	12,3

^aEspectros obtidos em CDCl₃, 75MHz^bEspectros obtidos em CDCl₃, 100 MHz

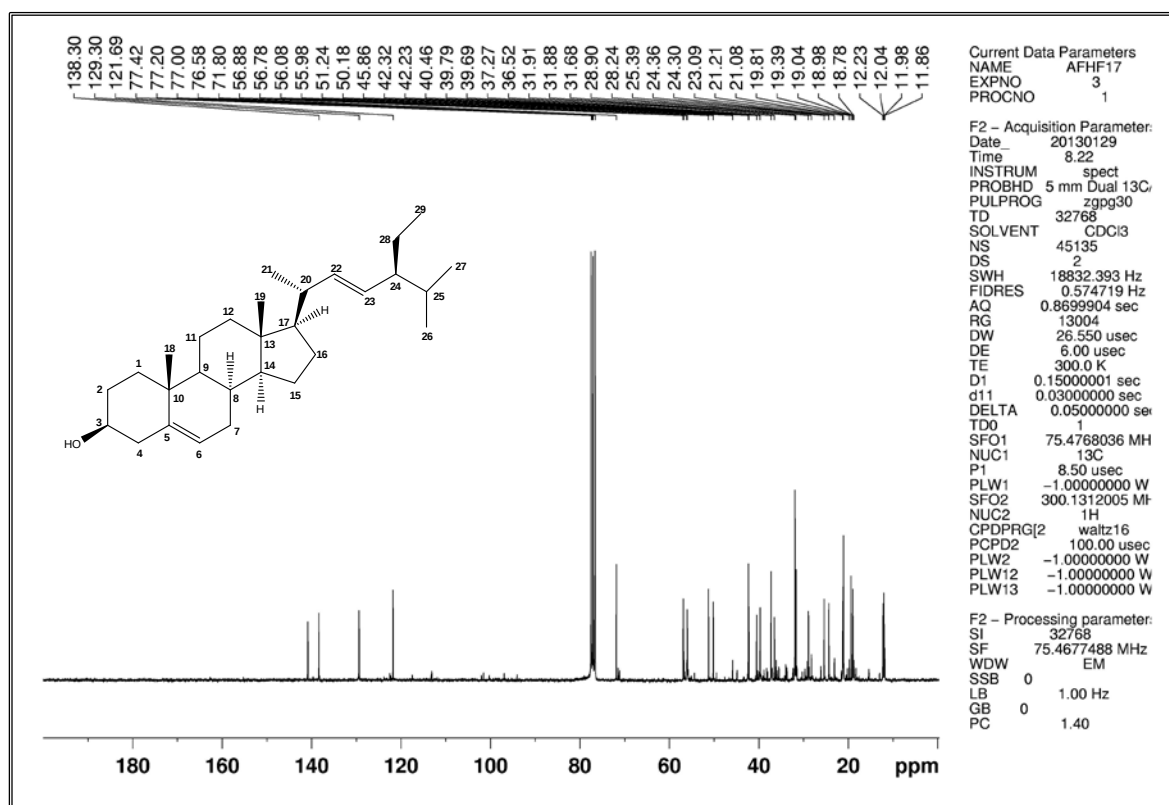


Espectro 35 - Cromatograma da fração AFHF- 11 e o espectro de massas (EI) de 5.



Espectro 36 - Espectro de RMN de ^1H de 5 (CDCl_3 , 300 MHz)





Espectro 37 - Espectro de RMN de ^{13}C de 5 (CDCl_3 , 75 MHz)



4.2 Quercetina (6)

Da fração FA12- 12 (5,0 mg) (parte experimental, item 3.5.1, pág. 12) foi isolada e identificada a substância **6**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 39, pág. 57) obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em $3417,6\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas no composto. Observou-se, também, uma absorção em $1612,3\text{ cm}^{-1}$, atribuída a ligações C=C de anel aromático (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 40, pág. 58) apresentou cinco sinais na região de hidrogênios de anel aromático, sendo três singletos em δ 7,73; 6,39 e 6,18 e dois dubletos em δ 7,61 ($J = 8,5\text{ Hz}$) e 6,86 ($J = 8,5\text{ Hz}$).

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 41, pág. 58) e auxílio do DEPT 135° (Espectro 42, pág. 59) foi possível listar quinze sinais: doze relativos a carbonos de anel aromático, sendo cinco de CH (δ 94,5; 99,3; 116,0; 116,3; 121,7) e sete de C (104,5; 124,2; 146,2; 148,8; 158,3; 162,5; 165,8), além de dois sinais relativos a carbonos de dupla ligação (δ 137,2; 148,0) e um relativo a carbonila conjugada (δ 177,3). A análise destes dados, associados aos observados no espectro de RMN de ^1H , sugeriu a presença de um esqueleto flavonoídico do tipo flavonol.

O pico do íon molecular em m/z 302 observado no espectro de massas (Espectro 38, pág. 57) é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, que foi proposta para **6**. A análise dos dados obtidos e comparação com os da literatura (GÜVENALP & DEMIREZER, 2005) (**Tabela 9**, pág. 56), permitiu caracterizar **6** como sendo 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol, também conhecida como Quercetina (**Figura 11**, pág. 55), a qual já havia sido isolada previamente no gênero *Aeschynomene* (CHEN *et.al*, 2011).



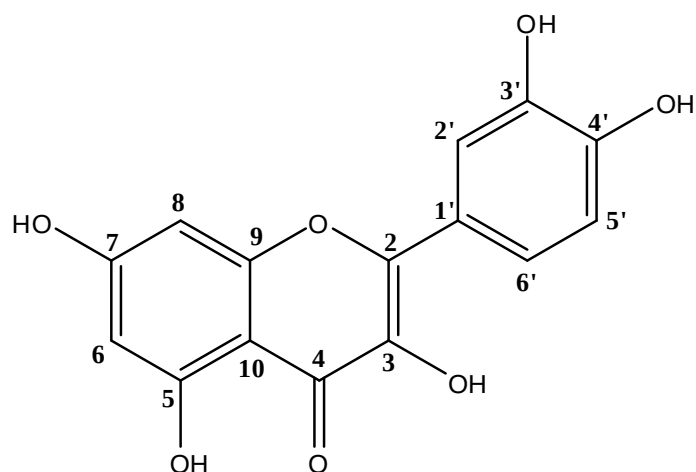


Figura 11 - Quercetina (6).

A quercetina apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura, destacando-se as atividades antioxidante (RAVICHANDRAN *et al.*, 2014), virucida (CARVALHO *et al.*, 2013) e malaricida (VASHIST *et al.*, 2008).



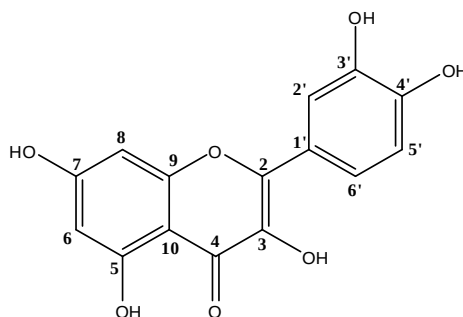


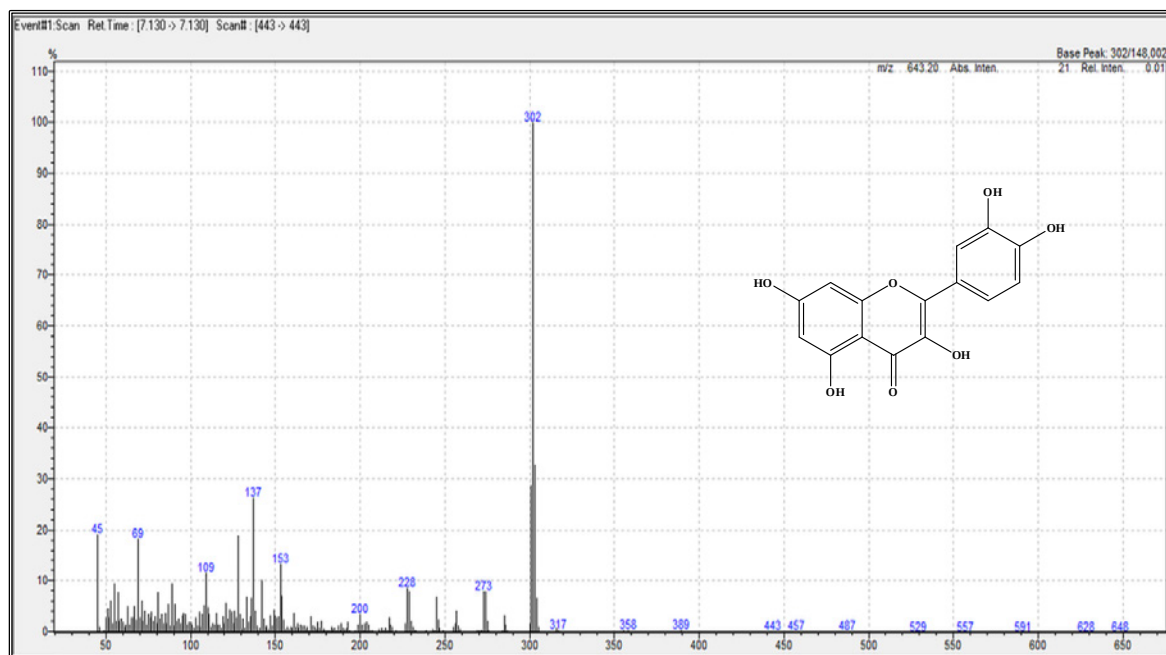
Tabela 9 - Dado de RMN de ^1H e ^{13}C de **6** e da quercetina (GÜVENALP & DEMIREZER, 2005)

Nº de	6		Quercetina	
Carb.	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, mult, J/Hz
2	148,0		147,9	
3	137,2		137,2	
4	177,3		177,3	
5	162,5		162,5	
6	99,3	6,18 (1H; s)	99,3	6,17 (1H; d; 2,0)
7	165,8		165,7	
8	94,5	6,39 (1H; s)	94,4	6,37 (1H; d; 2,0)
9	158,3		158,2	
10	104,5		104,7	
1'	124,2		124,1	
2'	116,0	7,73 (1H; s)	116,0	7,73 (1H; d; 2,0)
3'	146,2		146,2	
4'	148,8		148,7	
5'	116,3	6,88 (1H; d; 9,0)	116,2	6,87 (1H; d; 8,0)
6'	121,7	7,64 (1H; dl; 9,0)	121,6	7,62 (1H; dd; 7,5 e 2,0)

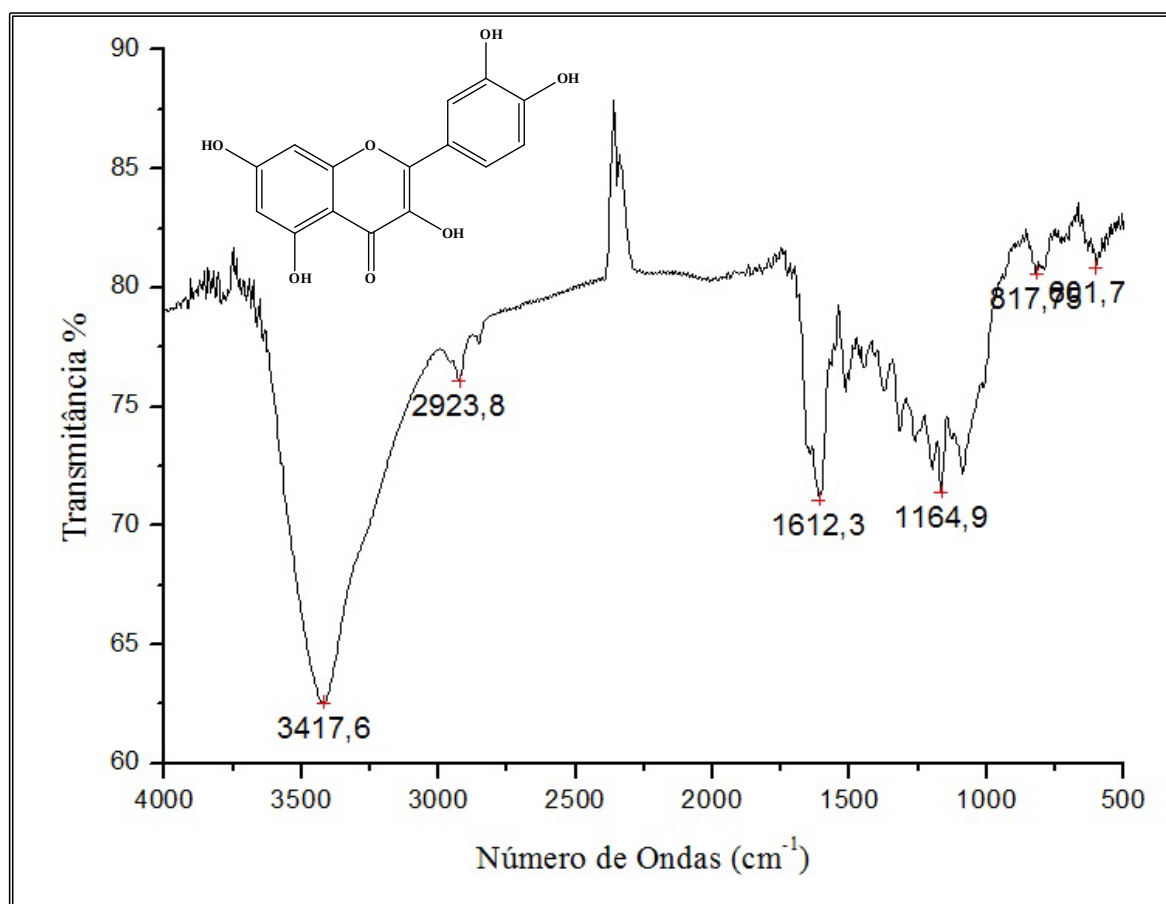
^aEspectros obtidos em MeOD, 300/75 MHz

^bEspectros obtidos em MeOD, 500/125 MHz



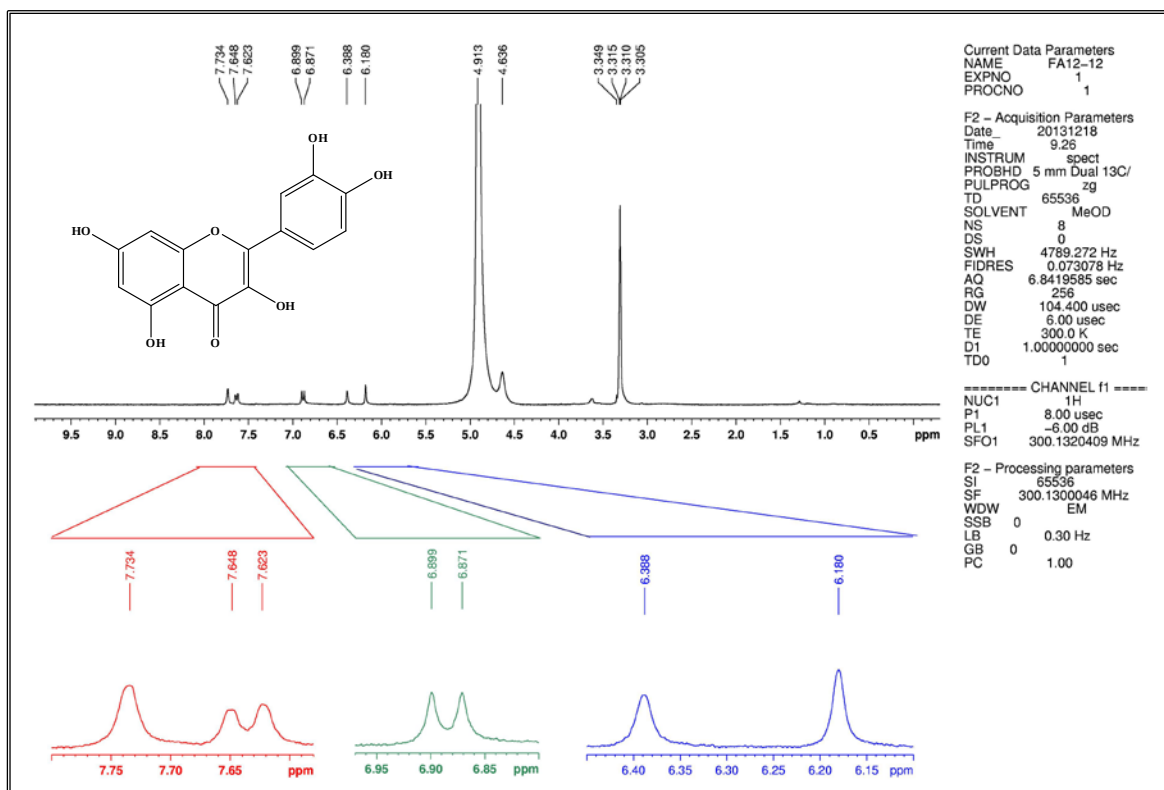
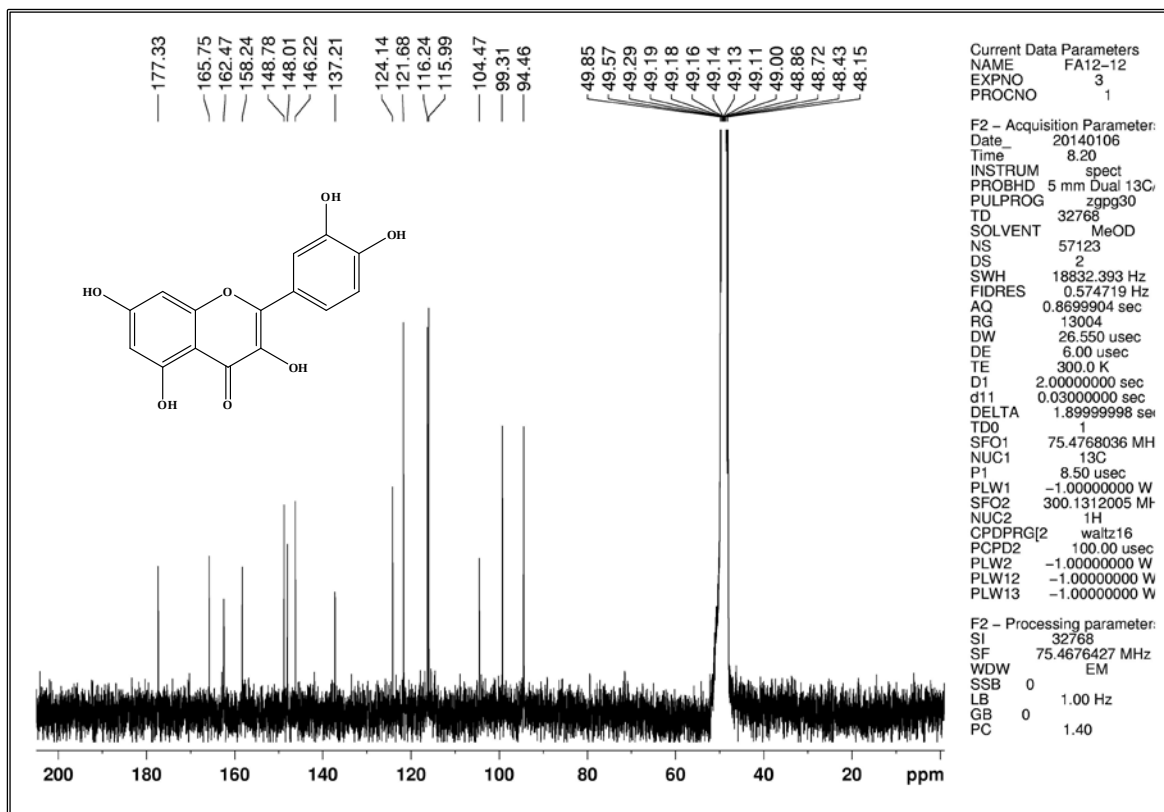


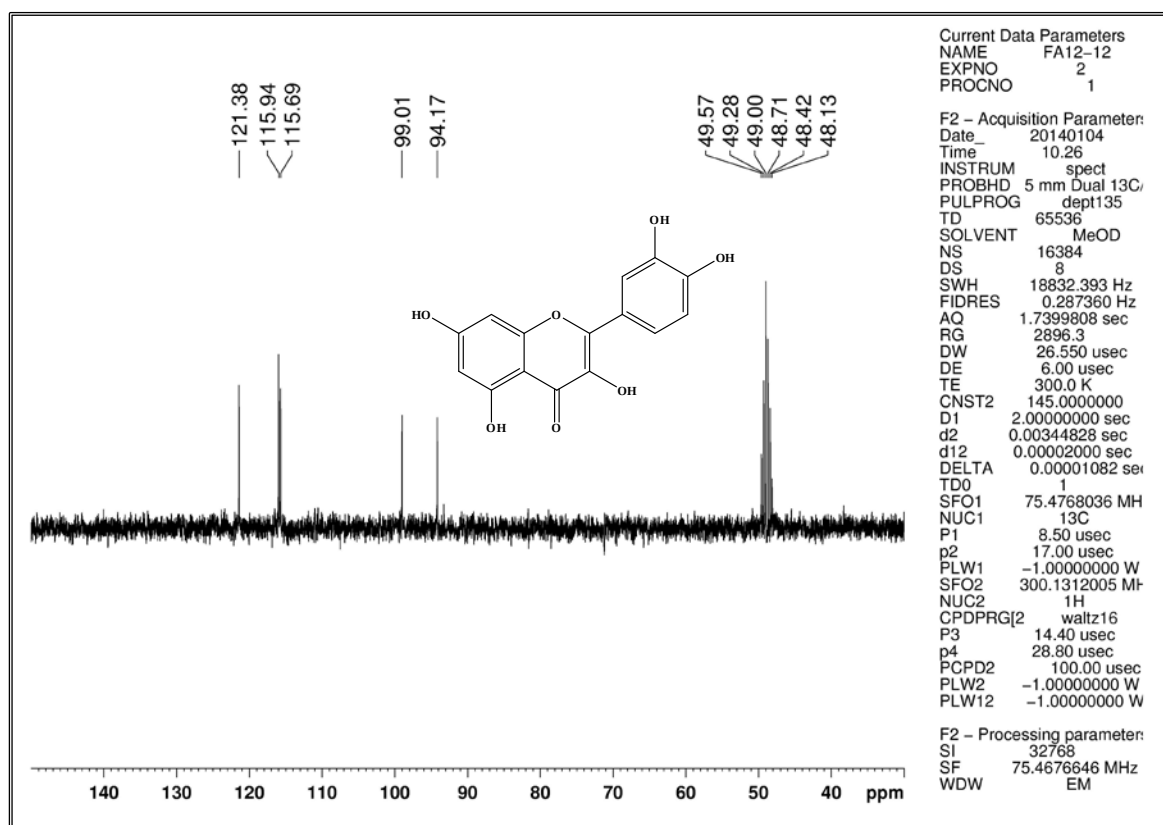
Espectro 38 – Espectro de Massas (EI) de **6**.



Espectro 39 - Espectro na região do Infravermelho de **6** (Pastilha de KBr).



Espectro 40 - Espectro de RMN de ^1H de 6 (MeOD, 300 MHz).Espectro 41 - Espectro de RMN de ^{13}C de 6 (MeOD, 75 MHz).



Espectro 42 - Espectro de RMN DEPT 135° de **6** (MeOD, 75 MHz).



4.3 3-O- α -L-arabinofuranosil quercetina (7)

Da fração FA128-P7 (12,7 mg) (parte experimental, item 3.5.1.1, pág. 12) isolou-se um sólido amarelo, codificado como 7.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 43, pág. 64, obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em $3409,8\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas na estrutura do composto. Observou-se, também, uma banda característica de ligações C=C de anéis aromáticos, com absorção em $1604,6\text{ cm}^{-1}$, e outra característica de carbonila, com o máximo de absorção em $1654,8\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 44, pág. 64) observou-se que o perfil dos sinais é bem semelhante aos de **6**, indicando tratar-se de um flavonoide. Os sinais em δ 7,47 (H2'), 6,85 (H5') e 7,47 (H6') correspondem aos hidrogênios do anel B e os sinais em δ 6,19 (H6) e 6,40 (H8) correspondem aos do anel A. Este padrão de substituição indica que a substância 7 possui o núcleo flavonoídico da quercetina. Adicionalmente, o espectro mostrou sinais na região de δ 3,0 -5,6, característicos de açúcares, destacando o sinal em δ 5,54 atribuído a um hidrogênio anomérico.

Com base no espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 45 e 46, pág. 65) e auxílio do DEPT 135° (Espectro 47, pág. 66) foi possível listar quinze sinais de carbonos sp^2 , típicos da estrutura básica da quercetina. Além destes, foram observados mais cinco sinais na região característica de açúcares: quatro entre δ 60,7 -85,9 e um em δ 107,9, referente ao carbono anomérico.

A localização deste foi dada pelo deslocamento, em relação ao espectro da quercetina (WENKERT & GOTTLIEB, 1977), observado em C-3 e C-2 (**Tabela 10**, pág. 61). Em 7, C-3 está protegido em torno de 4 ppm e C-2 desprotegido em torno de 8 ppm, deslocamentos que só podem ocorrer em função da presença de uma substituição em C -3, comprovando assim a localização da unidade de açúcar nesta posição.



Tabela 10 – Valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C da aglicona de **7** e da quercetina (WENKERT & GOTTLIEB, 1977).

Nº de	7	Quercetina
Carb.	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	156,4	147,1
3	133,4	136,0
4	177,7	176,0
5	161,3	160,9
6	98,7	98,7
7	164,2	164,2
8	93,6	93,9
9	157,0	160,9
10	104,0	103,4
1'	121,0	122,4
2'	115,5	115,5
3'	145,1	145,3
4'	148,5	147,9
5'	115,6	116,0
6'	121,8	120,5

^aEspectros obtidos em DMSO-*d*₆, 25MHz^bEspectros obtidos em DMSO-*d*₆, 75MHz

Os dados de RMN de ^{13}C são de grande importância na determinação da estrutura de um composto glicosilado, pois a partir destes dados é possível estabelecer o número de açúcares ligados, a natureza dos mesmos, a posição à qual está ligado na aglicona, bem como sua configuração e conformação (AGRAWAL, 1989). O conjunto de sinais oximetínicos e oximetilênicos relativos ao açúcar observado no espectro de RMN de ^{13}C de **7**, com destaque para os sinais de CH em δ 82,2 e 85,9 e de CH₂ em δ 60,7, permitiram identificar a unidade glicosídica como sendo de arabinofuranosídeo. A configuração em α ou β foi definida pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico, o qual corresponde a um dubleto em δ 5,54 com $J = 1,2$ Hz. Este valor de J indica uma configuração α para este açúcar (LU & FOO, 1997), pois para uma configuração β a constante de acoplamento esperada seria em torno de 7,0 Hz (MEDIANI *et.al*, 2012)

Portanto, a análise dos dados de **7** e a comparação destes com os da literatura (LU & FOO, 1997) (TABELA 11, pág 63), permitiu caracterizar **7** como sendo 3-O- α -L-



arabinofuranosíl quercetina (**Figura 12**), também conhecida como avicularina, já isolada, previamente, no gênero *Aeschynomene* (IGNOATO *et.al.*, 2012).

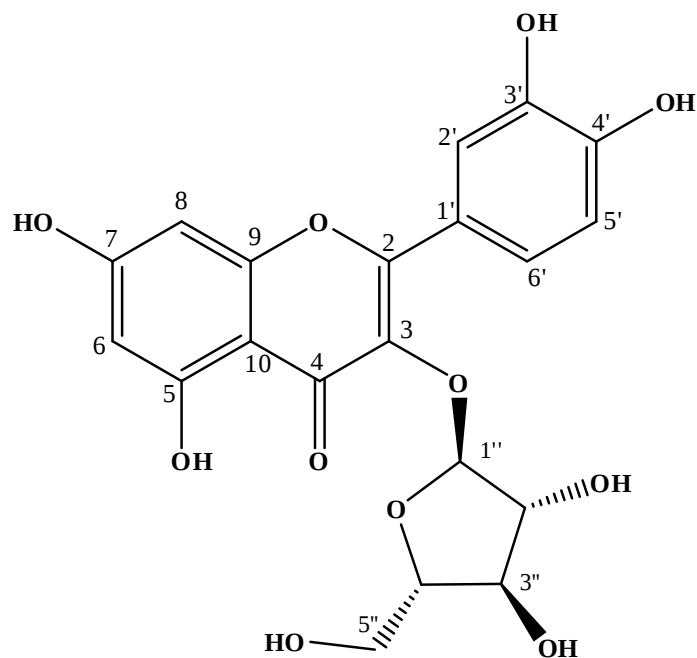


Figura 12- 3-O- α -L-arabinofuranosil quercetina (7).

A avicularina apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura, dentre elas, atividades antioxidante, hepatoprotetora (AN *et al.*, 2005), antibacteriana (GREGOIRE *et al.*, 2007), anti-inflamatória (VO *et al.*, 2012).



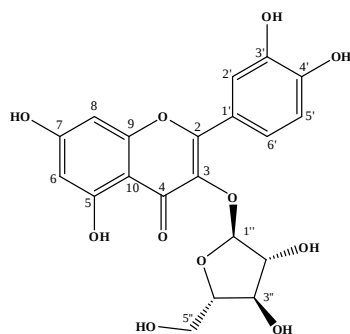


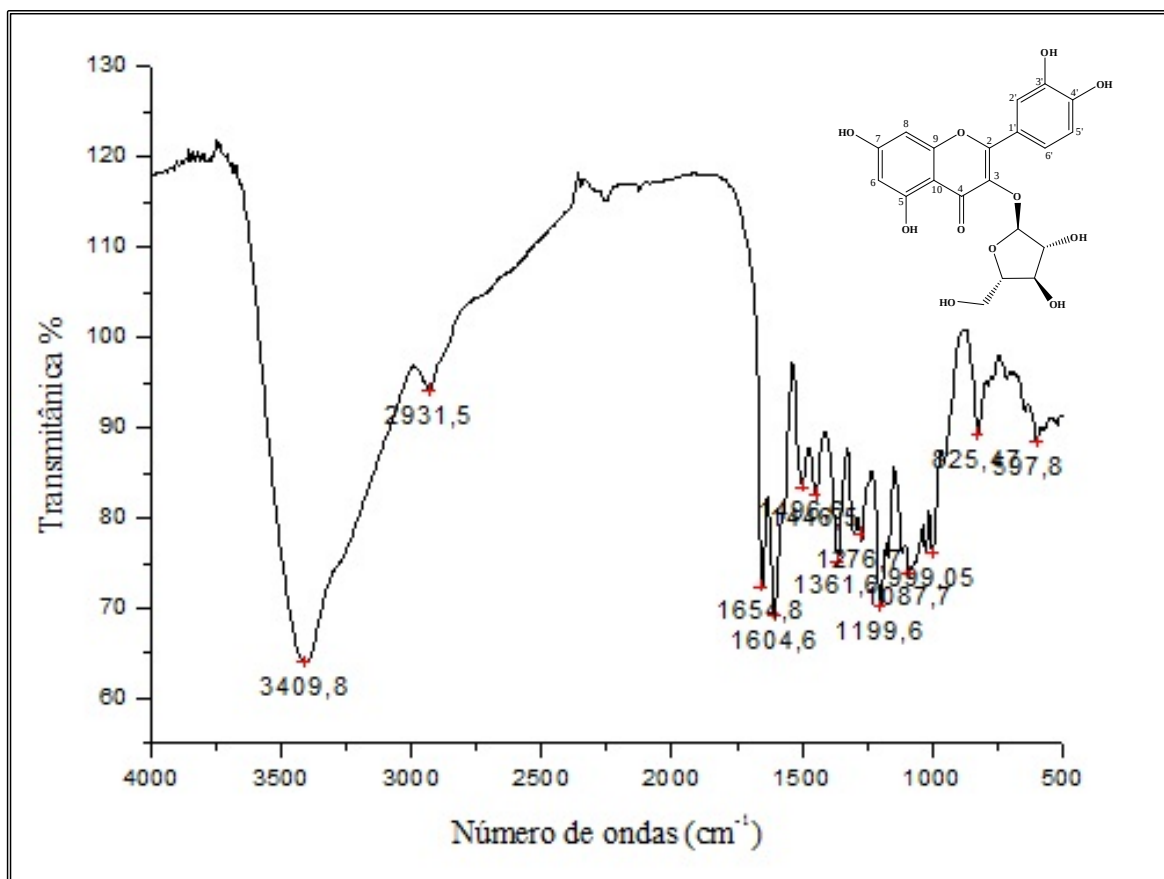
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **7** e da avicularina (LU & FOO, 1997).

Nº de Carb.	7		Avicularina	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, mult, J/Hz
2	156,5		156,9	
3	133,4		133,4	
4	177,8		177,7	
5	161,3		161,2	
6	98,8	6,19 (1H; s)	98,7	6,20 (1H; d; 2,0)
7	164,5		164,3	
8	93,7	6,40 (1H; s)	93,6	6,41 (1H; d; 2,2)
9	157,0		156,4	
10	104,0		103,9	
1'	121,0		121,0	
2'	115,6	7,47 (1H; d; 2,1)	115,5	7,48 (1H; d; 2,2)
3'	145,2		145,1	
4'	148,6		148,5	
5'	115,6	6,85 (1H; d; 8,4)	115,5	6,86 (1H; d; 8,4)
6'	121,8	7,55 (1H; dd; 8,4 e 2,1)	121,7	7,55 (1H; dd; 8,5 e 2,2)
1''	107,9	5,54 (1H; d; 1,2)	107,9	5,59 (1H; d; 1,0)
2''	82,2		82,1	
3''	77,0		77,0	
4''	85,9		85,9	
5''	60,7	4,15 (1H; d; 2,1)	60,7	4,16 (1H; d; 2,6)

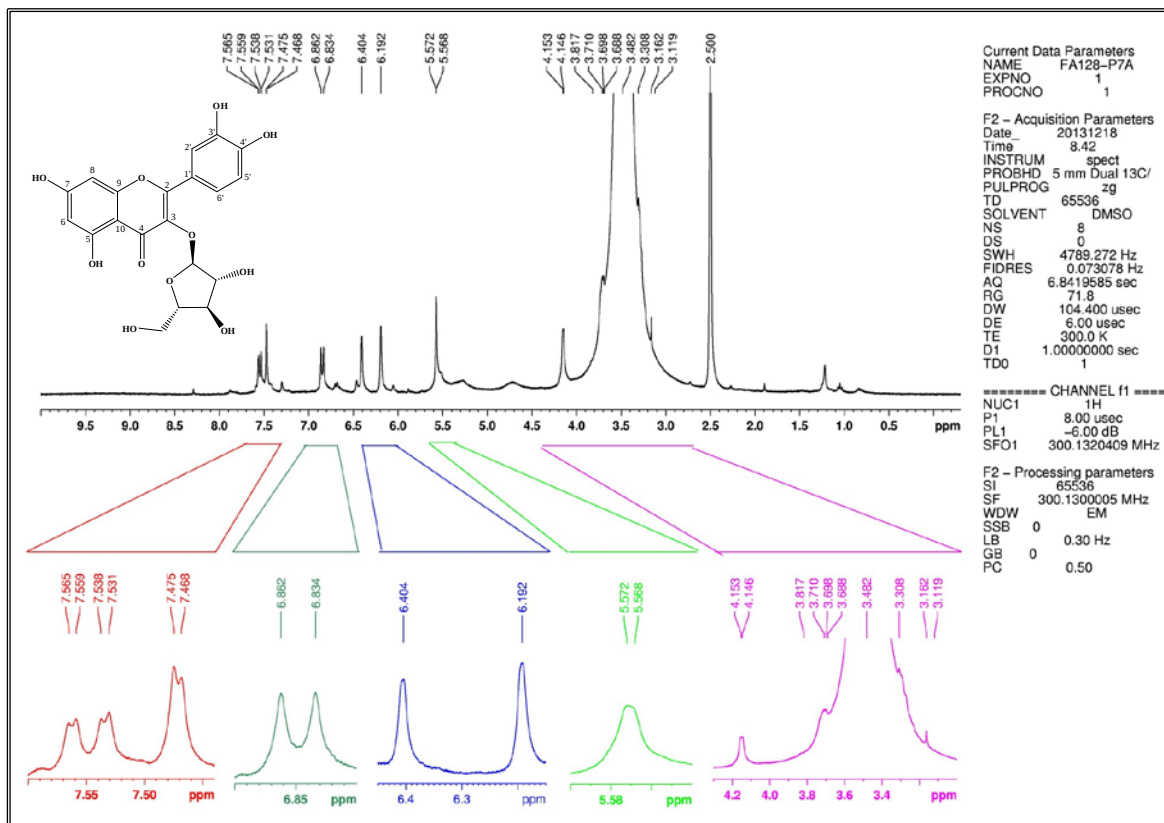
^aEspectros obtidos em DMSO-*d*₆, 300/75 MHz

^bEspectros obtidos em DMSO-*d*₆, 300/75 MHz



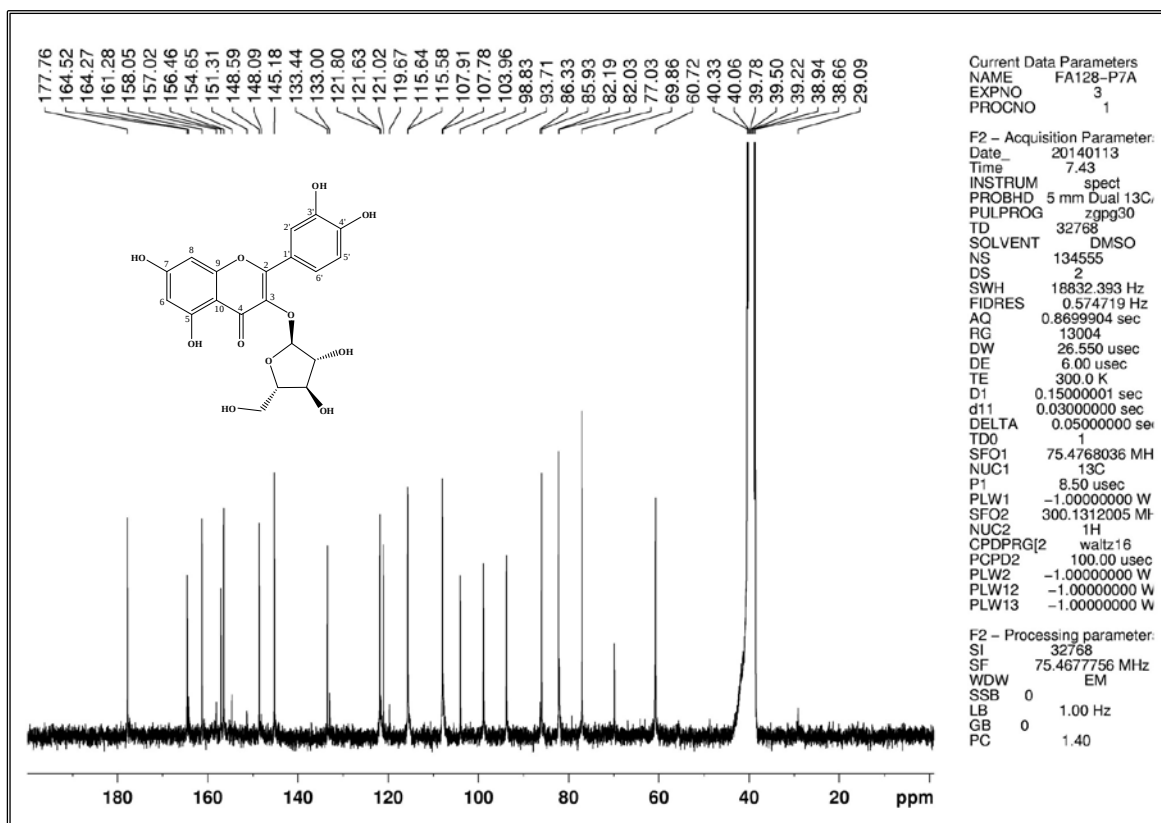
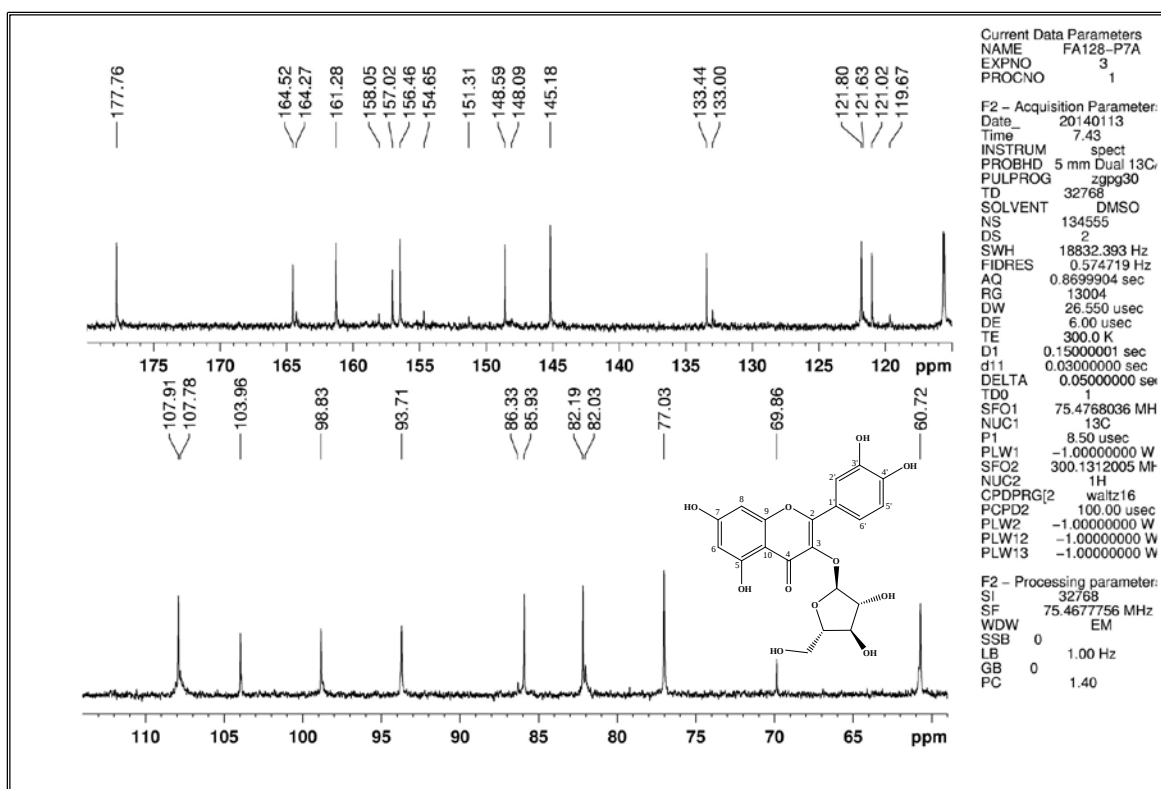


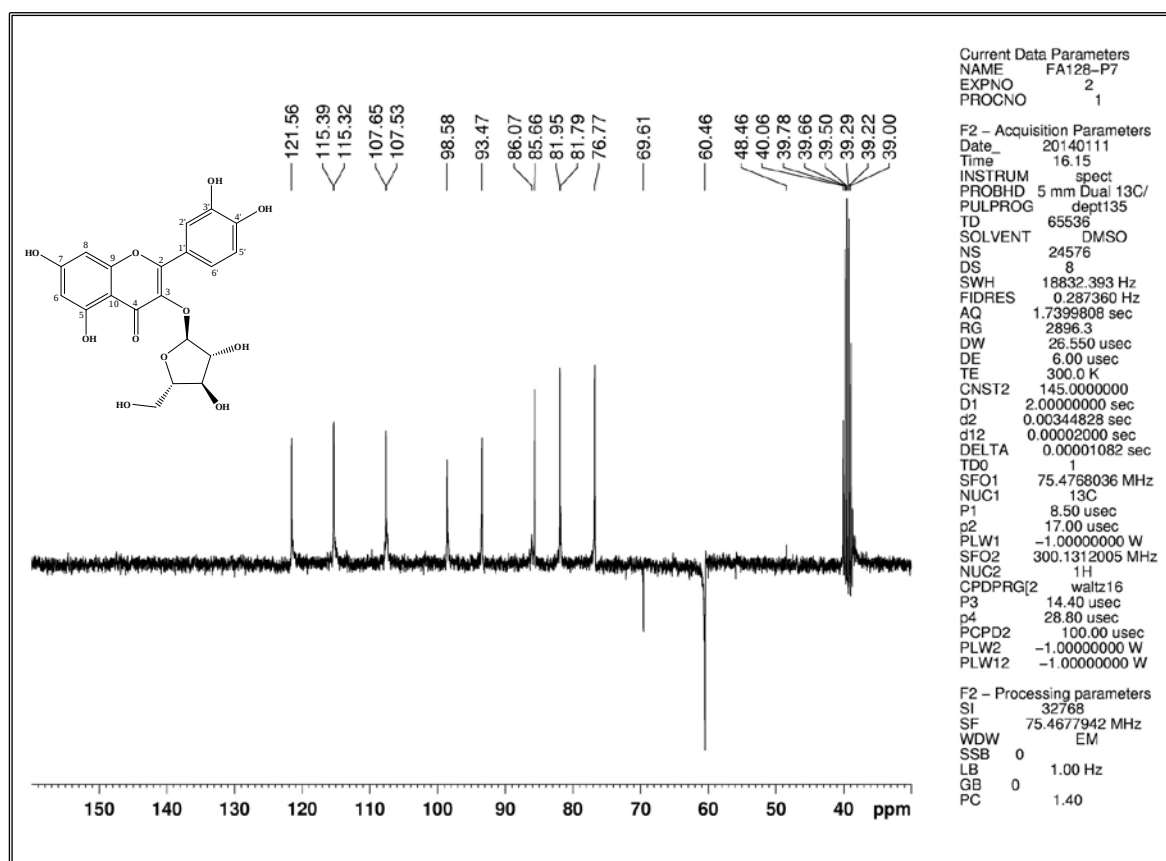
Espectro 43- Espectro na região do Infravermelho de 7 (Pastilha KBr).



Espectro 44 - Espectro de RMN de ¹H de 7 (DMSO-d₆, 300 MHz).



Espectro 45 - Espectro de RMN de ^{13}C de 7 (DMSO- d_6 , 75 MHz).Espectro 46 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 7 (DMSO- d_6 , 75 MHz).



Espectro 47 - Espectro de RMN DEPT 135° de **7** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).



4.4 3-O- β -D-glicopiranosil quercetina (8) e 3-O- β -D-galactopiranosil quercetina (9)

Uma mistura de substâncias foi caracterizadas na fração FA128-P4 (21,6 mg) (parte experimental, item 3.5.1.1, pág. 12), as quais foram codificadas como **8** e **9**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Espectro 48, pág. 72), obtido em pastilha de KBr, revelou uma absorção em $3406,0\text{ cm}^{-1}$, característica de estiramento de OH, sugerindo a presença de grupamentos hidroxilas na estrutura dos compostos. Observou-se, também, bandas de absorção em $1604,6\text{ cm}^{-1}$ e em $1654,8\text{ cm}^{-1}$, atribuídas à presença de C=C de anel aromático e de carbonila de cetona conjugada (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Espectro 49, pág. 72) revelou um perfil muito semelhante ao observado no espectro de **6** e dois conjuntos de sinais muito próximos, indicando a presença de duas substâncias de natureza flavonoídica e estruturalmente semelhantes. Os sinais em δ 7,85 (H2'), 6,86 (H5') e 7,58 (H6'), correspondem aos hidrogênios do anel B do núcleo flavonoídico, enquanto os sinais em δ 6,19 (H6) e 6,38 (H8), correspondem aos do anel A, indicando um padrão de substituição igual ao da quercetina. Também, foram observados sinais na região de δ 3,25 -5,25, característicos de açúcares, destacando os em δ 5,25 ($J = 6,9\text{ Hz}$) e 5,16 ($J = 7,8\text{ Hz}$), atribuídos aos hidrogênios anoméricos de duas unidades glicosídicas.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectros 50, 51, 52 e 53, pág. 73 e 74) foram observados dois conjuntos de sinais muito próximos. Na região entre δ 179,5 e 94,8 foram listados sinais de carbonos referentes a duas agliconas (quercetina) e dois carbonos anoméricos, enquanto na região entre δ 61,9 e 78,4 observou-se dez sinais de carbonos de açúcar, sugerindo tratar-se de duas hexoses.

A localização destes açúcares foi dada pela diferença de deslocamento químico, observado em C-3 e C-2, em relação aos valores observados no espectro da quercetina (**6**) (Tabela 12, pág. 68). Em **8**, C-3 está protegido em torno de 1 ppm e C-2 desprotegido em torno de 11 ppm, enquanto em **9**, C-3 está protegido em torno de 2 ppm e C-2 desprotegido em torno de 11 ppm. Esses deslocamentos são compatíveis com a presença de uma substituição em C -3 em **8** e **9**, indicando, assim, a presença de uma unidade glicosídica nesta posição da estrutura de cada uma das substâncias.



Tabela 12 – Valores de descolamento químico de RMN de ^{13}C da aglicona de **8** e **9** e da quercetina (**6**).

.Nº de Carb.	Quercetina (6)	8	9
	$\delta^{13}\text{C}$ /ppm ^a	$\delta^{13}\text{C}$ /ppm ^a	$\delta^{13}\text{C}$ /ppm ^a
2	148,0	159,0	158,8
3	137,2	135,8	135,4
4	177,3	179,5	179,1
5	162,5	162,0	162,7
6	99,3	99,2	99,7
7	165,8	166,1	165,7
8	94,5	94,8	94,6
9	158,3	158,4	158,2
10	104,5	105,6	105,4
1'	124,2	122,8	122,6
2'	116,0	116,1	115,8
3'	146,2	145,8	145,5
4'	148,8	149,9	149,6
5'	116,3	117,8	117,4
6'	121,7	122,9	123,0

A natureza glicosídica de **8** e **9** foi revelada pelo número de sinais oximetínicos e oximetilênico observados no espectro de RMN ^{13}C . Os seis sinais de maior intensidade observados no espectro de **8** (δ 104,3 – anomérico, 78,3, 78,1, 75,7, 71,2 – CH e 62,5-CH₂) permitiram sugerir a unidade glicosídicas como sendo uma glucopiranosose. Já os seis sinais de menor intensidade (δ 105,4 – anomérico, 77,1, 75,1, 73,2, 70,0 – CH e 61,9 – CH₂) permitiram sugerir que a unidade glicosídicas de **9** é galactopiranosose. A configuração α ou β de **8** e **9** foi definida pela constante de acoplamento dos hidrogênios anoméricos (H1'') de cada uma das substâncias. Em **8** e **9** as constantes de acoplamentos medidas foram de 6,9 e 7,8 Hz, respectivamente e sugeriram uma configuração β para ambos os açúcares (GÜVENALP & DEMIREZER, 2005), pois para uma configuração α a constante de acoplamento esperada seria entre 1,0 - 4,0 Hz (AGRAWAL, 1992).

Portanto, a análise destes dados e a comparação os mesmos com os da literatura (KAZUMA* *et al.*; 2003, GÜVENALP & DEMIREZER**, 2005) (**Tabelas 13 e 14**, pág. 70



e 71), permitiram identificar **8** e **9** como sendo 3-O- β -D-glicopiranosil quercetina* e 3-O- β -D-galactopiranosil quercetina**, respectivamente, também conhecidas como isoquercitrina (**8**) e hiperina (**9**) (**Figura 13**). Estas estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Aeschynomene*.

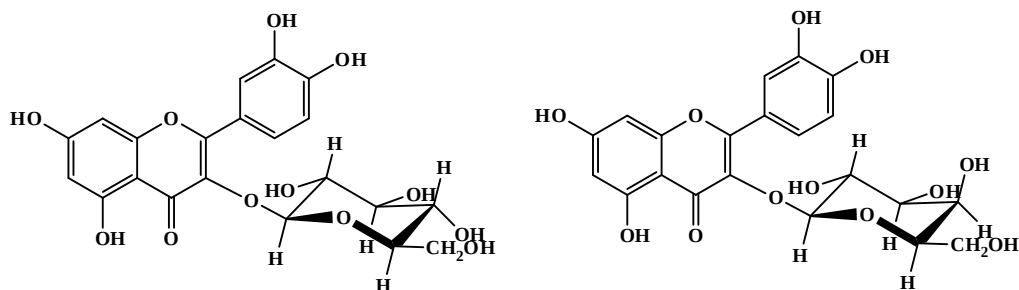


Figura 13 - Estrutura Química da Isoquercitrina (**8**) e da Hiperina (**9**).

Isoquercitrina e hiperina apresentam diversas propriedades biológicas descritas na literatura, dentre elas, atividades anti-hipertensiva (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011) e leishmanicida (SIDANA *et al.*, 2013), respectivamente, enquanto ambas possuem atividade antioxidante (LEE *et al.*, 2011).



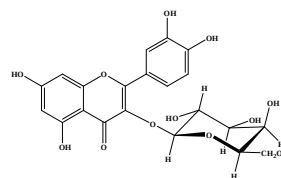
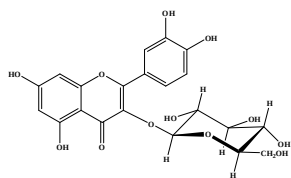


Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H de **8** e **9** e de isoquercitrina e hiperina (KAZUMA^{*} *et al.*; 2003, GÜVENALP & DEMIREZER^{**}, 2005).

Nº de	8	Isoquercitrina [*]	9	Hiperina ^{**}
Carb.	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, mult, J/Hz
2				
3				
4				
5				
6	6,19 (1H; <i>sl</i>)	6,20 (1H; <i>d</i> ; 2,2)	6,19 (1H; <i>sl</i>)	6,12 (1H; <i>d</i> ; 1,9)
7				
8	6,38 (1H; <i>sl</i>)	6,39 (1H; <i>d</i> ; 2,2)	6,38 (1H; <i>sl</i>)	6,30 (1H; <i>d</i> ; 1,9)
9				
10				
1'				
2'	7,71 (1H; <i>sl</i>)	7,70 (1H; <i>d</i> ; 2,2)	7,85 (1H; <i>sl</i>)	7,82 (1H; <i>d</i> ; 2,0)
3'				
4'				
5'	6,86 (1H; <i>d</i> ; 8,1)	6,86 (1H; <i>d</i> ; 8,3)	7,58 (1H; <i>dl</i> ; 8,1)	6,85 (1H; <i>d</i> ; 8,0)
6'	7,58 (1H; <i>dl</i> ; 8,1)	7,58 (1H; <i>dd</i> ; 8,3 e 2,2)	6,86 (1H; <i>d</i> ; 8,1)	7,57 (1H; <i>dd</i> ; 7,5 e 2,0)
1''	5,25 (1H; <i>d</i> ; 6,9)	5,23 (1H; <i>d</i> ; 7,6)	5,16 (1H; <i>d</i> ; 7,8)	5,04 (1H; <i>d</i> ; 7,6)
2''				3,82 (1H; <i>m</i>)
3''				3,54 (1H; <i>m</i>)
4''				3,85
5''				3,45 (1H; <i>m</i>)
6''				3,58 (1H α ; <i>dd</i> ; 11,0 e 7,0) 3,65 (1H β ; <i>dd</i> ; 11,0 e 4,0)

^a Espectros obtidos em MeOD, 300 MHz

^b Espectros obtidos em MeOD, 100 MHz



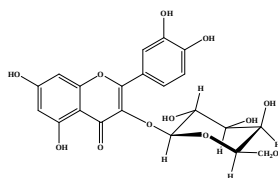
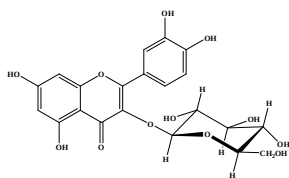


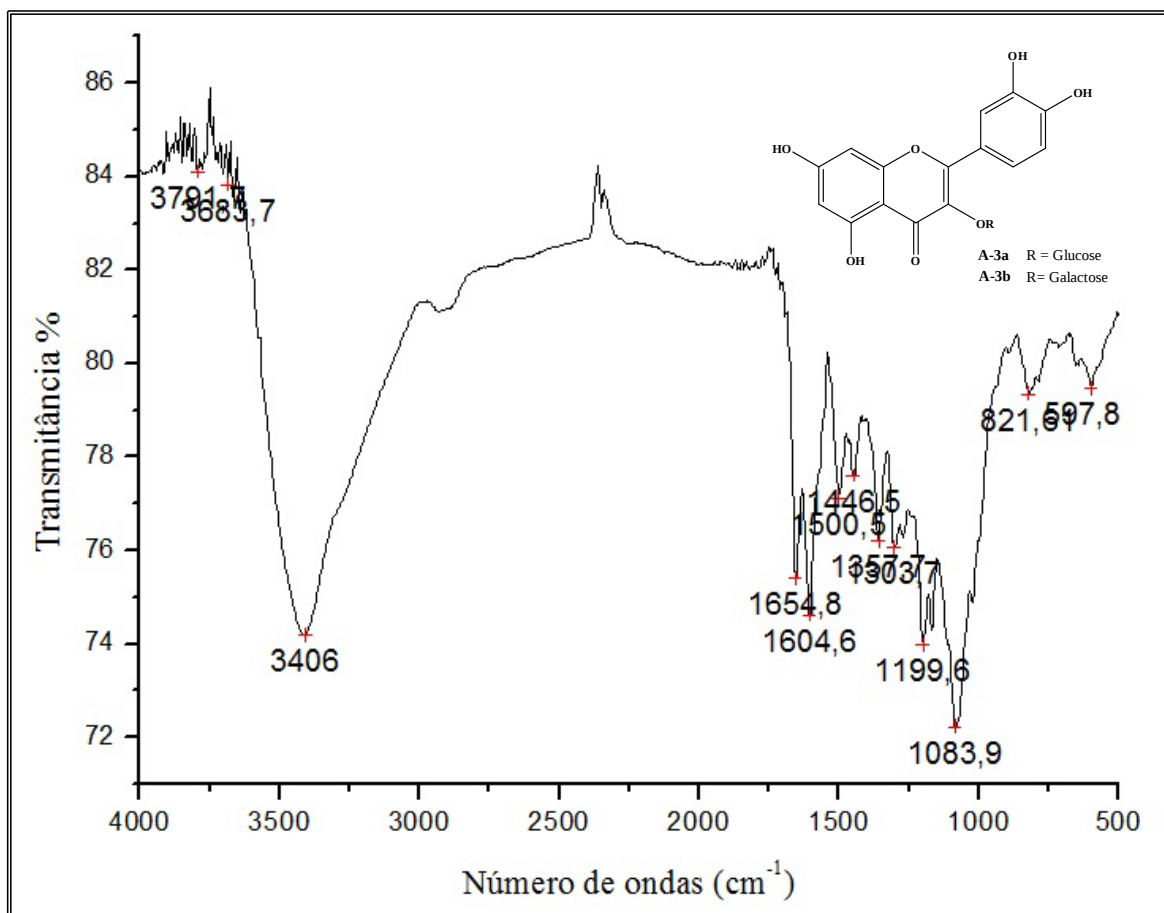
Tabela 14 - Dados de RMN de ^{13}C de **8** e **9** e de isoquercitrina e hiperina (KAZUMA^{*} *et al.*; 2003, GÜVENALP & DEMIREZER^{**}, 2005).

.Nº	8	Isoquercitrina[*]	9	Hiperina^{**}
de	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
Carb.				
2	159,0	158,5	158,8	158,5
3	135,6	135,6	135,8	135,4
4	179,4	179,5	179,5	179,1
5	163,0	163,1	162,9	162,7
6	99,2	99,9	99,2	99,7
7	166,1	166,0	165,1	165,7
8	94,8	94,7	94,8	94,6
9	158,4	159,0	158,4	158,2
10	105,6	105,7	105,6	105,5
1'	123,0	123,2	122,8	122,8
2'	116,0	116,0	116,1	115,9
3'	145,9	145,9	145,8	145,6
4'	149,8	149,8	149,9	149,7
5'	117,6	117,5	117,8	117,7
6'	123,2	123,1	122,9	122,8
1''	104,3	104,3	105,4	105,4
2''	75,7	75,7	73,2	73,2
3''	78,3	78,1	75,1	75,1
4''	71,2	71,2	70,0	70,0
5''	78,1	78,4	77,1	77,2
6''	62,5	62,6	61,9	62,0

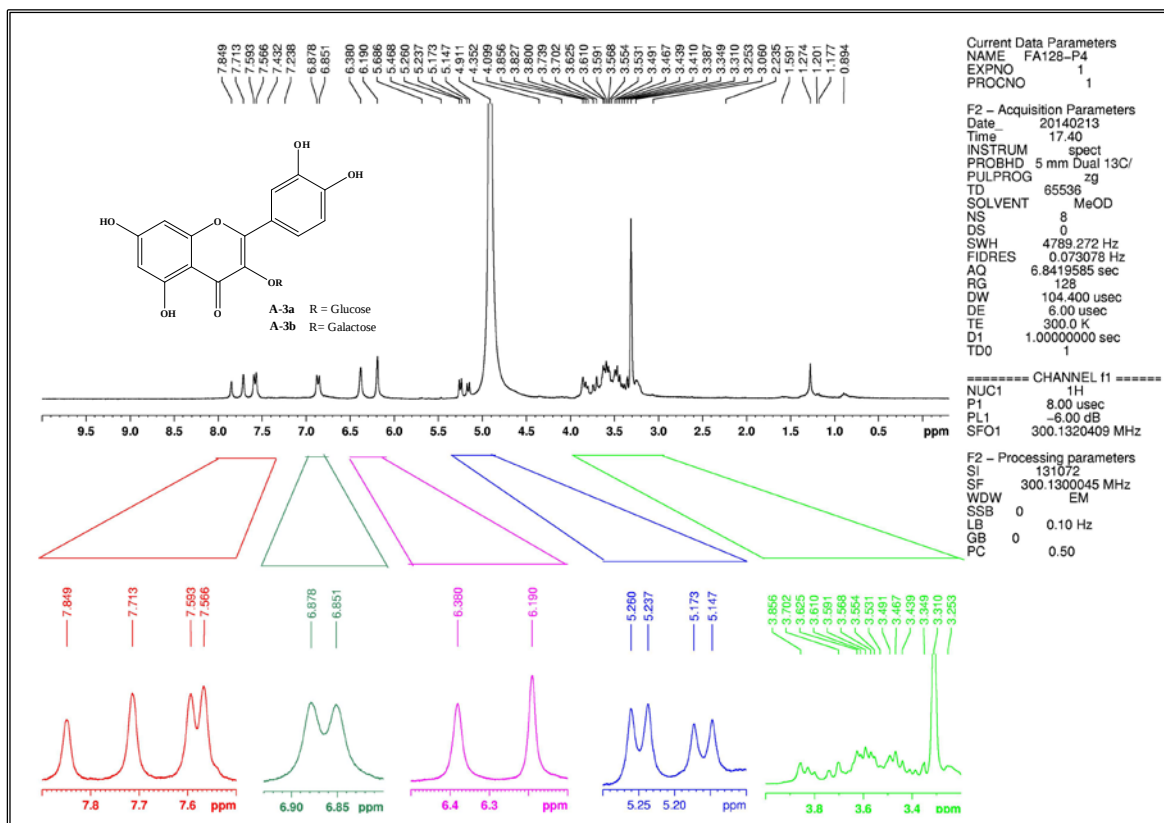
^a Espectros obtidos em MeOD, 75 MHz

^b Espectros obtidos em MeOD, 100 MHz



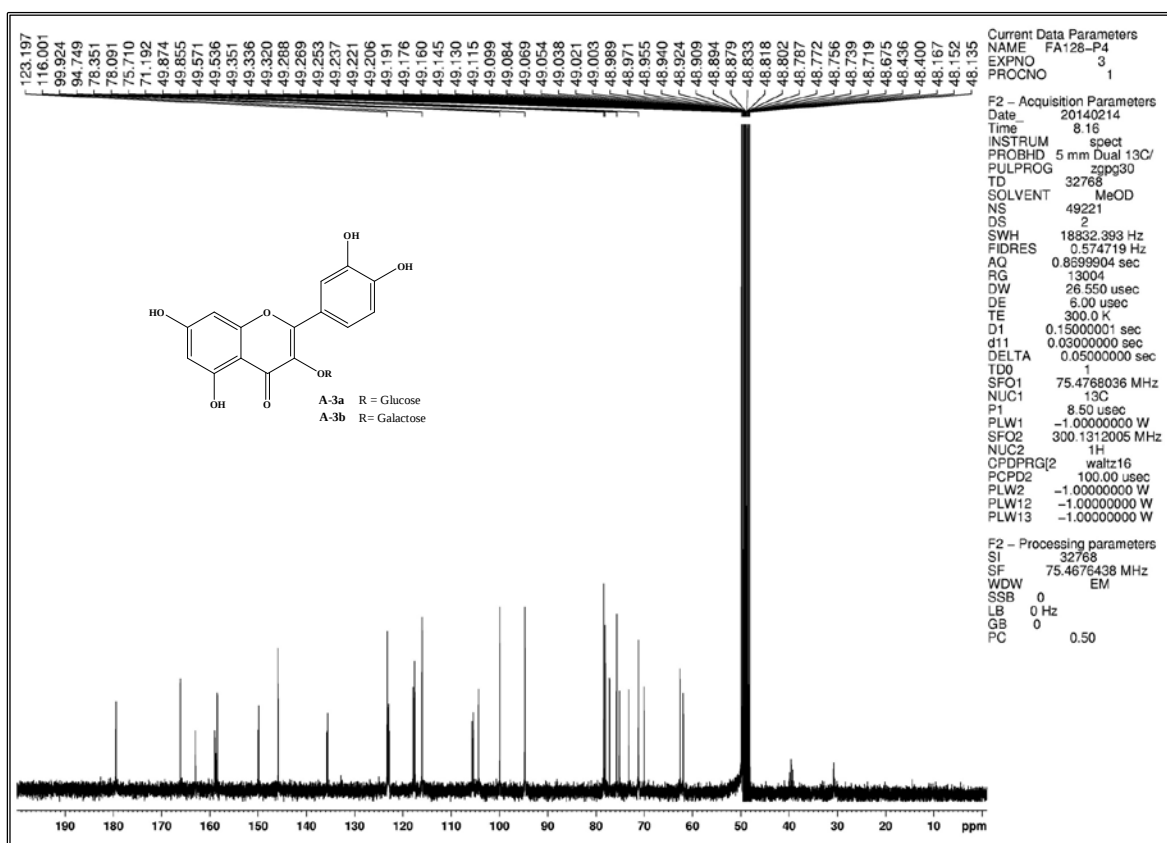


Espectro 48 - Espectro na região do Infravermelho de **8** e **9** (Pastilha KBr).

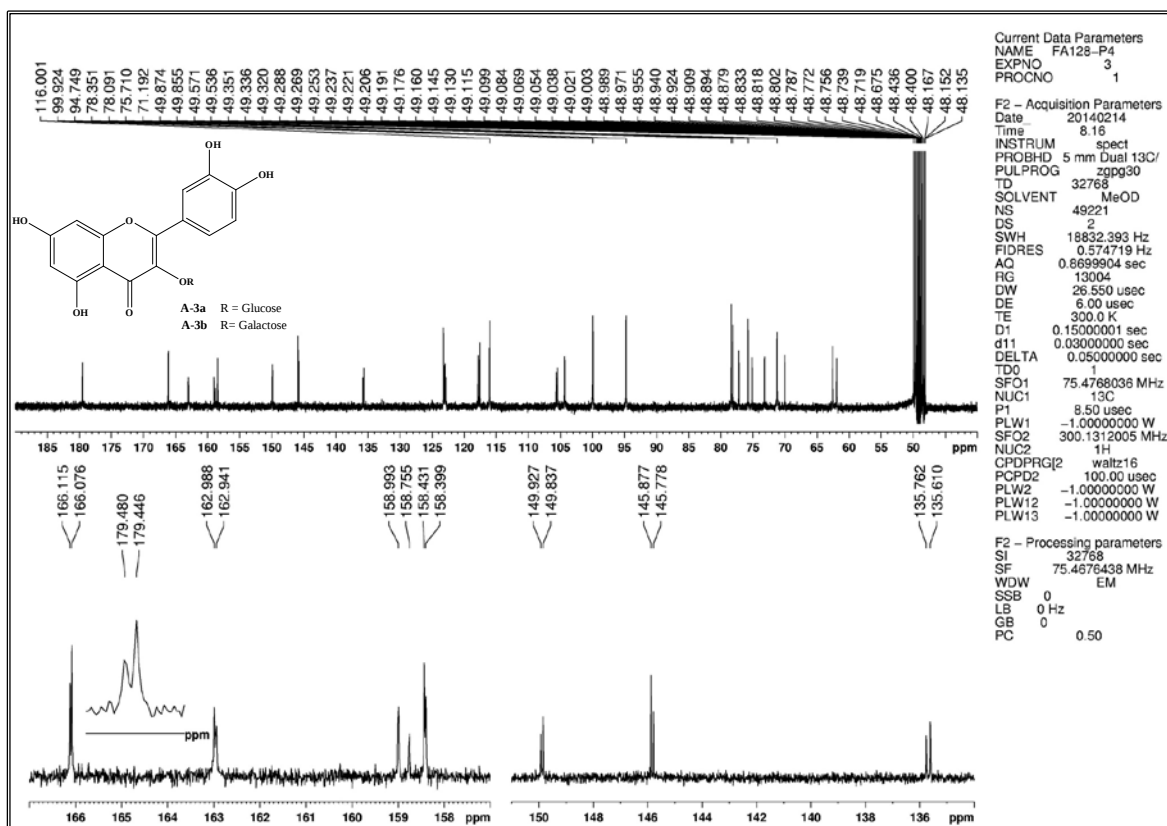


Espectro 49 - Espectro de RMN de ^1H de **8** e **9** (MeOD, 300 MHz).



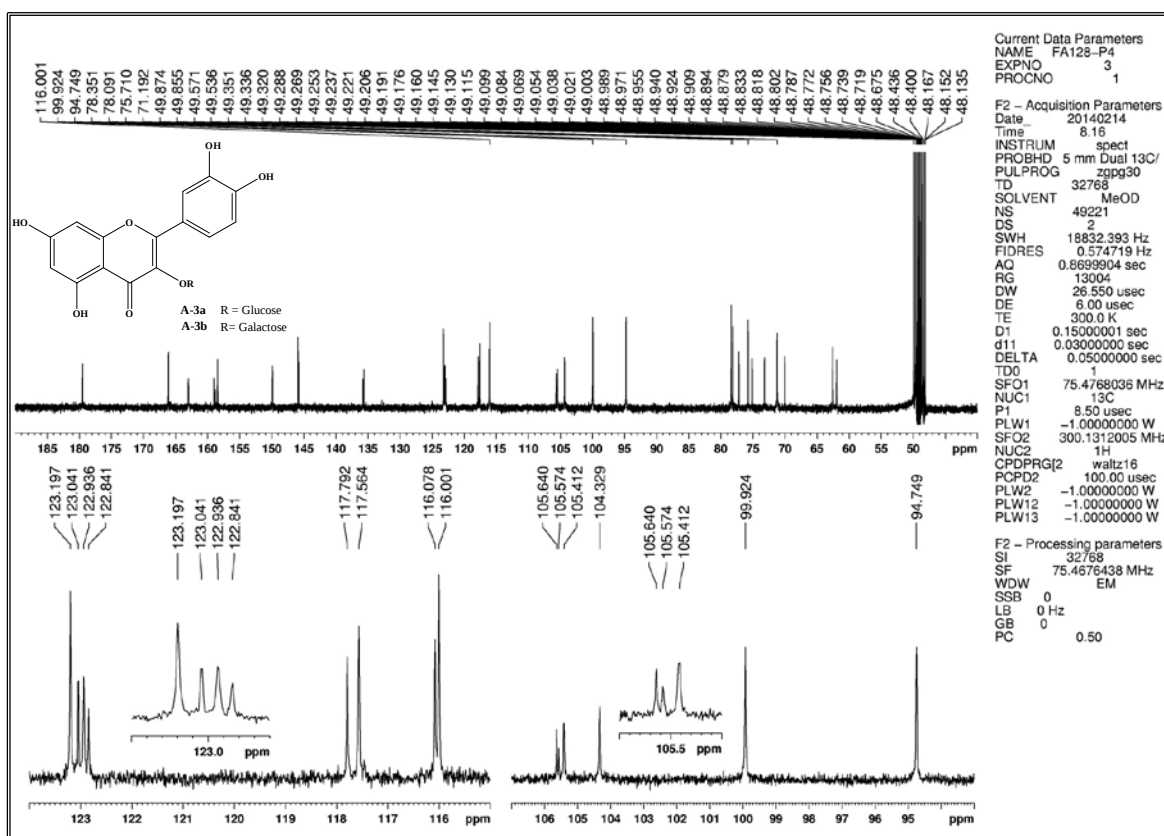


Espectro 50 - Espectro de RMN de ^{13}C de **8** e **9** (MeOD, 75 MHz).

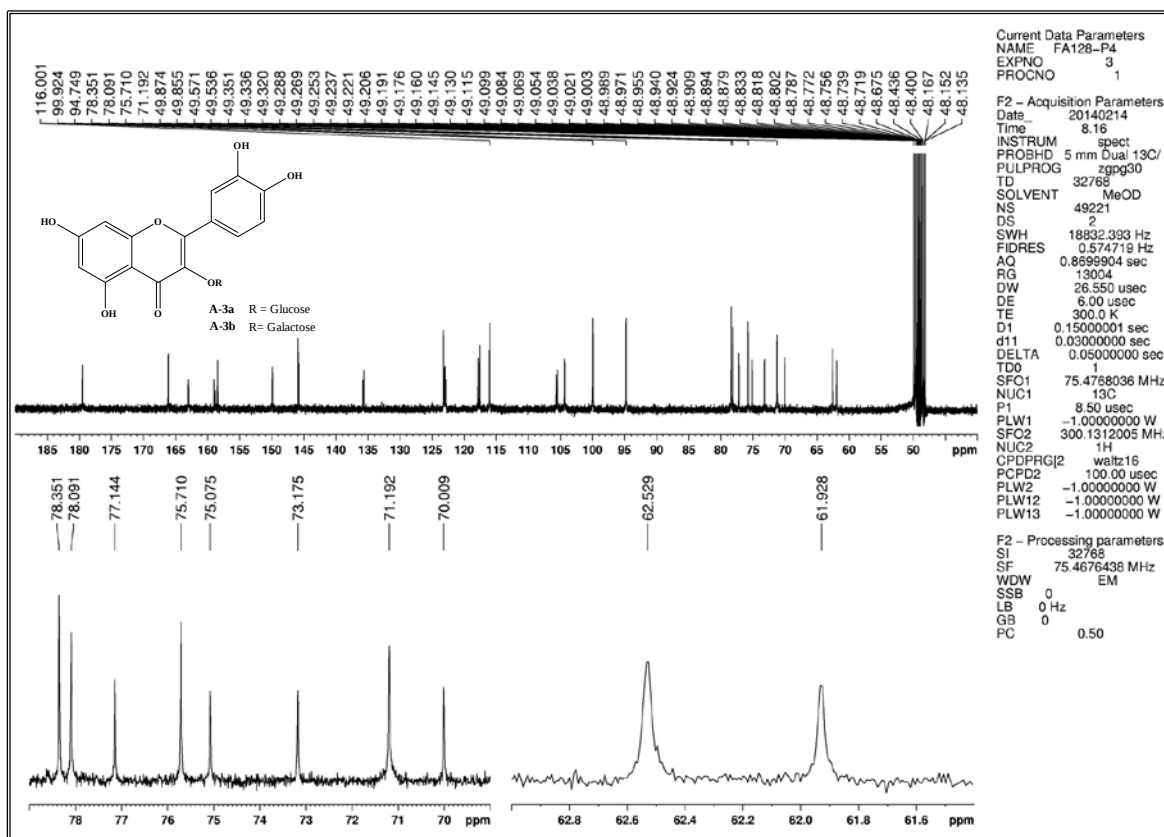


Espectro 51 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **8** e **9** na região de 167 – 135 ppm (MeOD, 75 MHz).



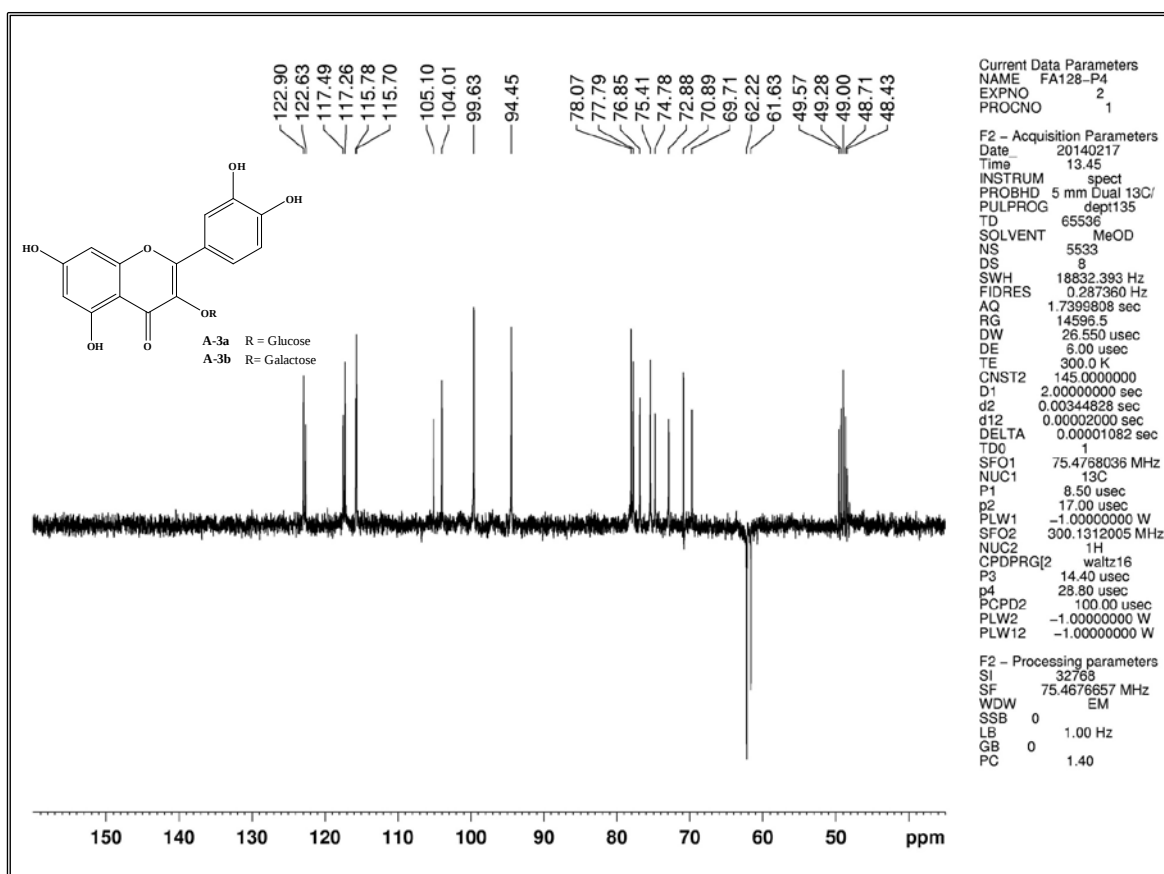


Espectro 52 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **8** e **9** na região de 124 – 94 ppm (MeOD, 75 MHz).



Espectro 53 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **8** e **9** na região de 79 – 61 ppm (MeOD, 75 MHz).





Espectro 54 - Espectro de RMN DEPT 135° de **8** e **9** (MeOD, 75 MHz).



4.5 Avaliação das Atividades Biológicas

4.5.1 Avaliação da letalidade sobre *Artemia salina*

Artemia salina é uma espécie de microcrustáceo, utilizado neste trabalho como bioindicador de toxicidade. Diversos trabalhos correlacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, virucida e antimicrobiana (MacRAE *et al.*, 1988), parasiticida (SAHPAZ *et al.*, 1994) e tripanossomicida (ZANI *et al.*, 1995), entre outros.

O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi submetido ao teste de toxidade sobre *Artemia salina*, e o resultado não foi significativo, pois a concentração letal média (CL₅₀) foi superior a 1000 µg/mL, portanto, o extrato etanólico foi considerado inativo, ou seja, não apresentou citotoxicidade sobre o microcrustáceo *A. salina*.

4.5.2 Avaliação da atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença infecciosa, transmitida pelo vetor *Aedes aegypti*, considerada uma doença reemergente, tendo sido caracterizada no século XVIII (GUBLER, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2007). No final do século XX a doença atingiu regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. A sua erradicação foi alcançada em 1950, porém após vinte anos sem registro da doença, houve sua reincidência (TEIXEIRA *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Segundo a Organização Mundial de saúde (WHO, 1981), extratos de plantas que apresentam CL₅₀ < 40 ppm (0,04%; 0,4 µg/mL) indicam algum potencial para serem aplicados como compostos larvicida ou moluscida. O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi submetido ao teste da atividade larvicida e o resultado não foi significativo, pois apresentou uma CL₅₀ > 1000 µg/mL, portanto, o extrato etanólico foi considerado inativo contra atividade larvicida.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato etanólico da parte aérea de espécimes de *Aeschynomene filosa*, coletadas em uma área alagada no município de Campo Grande – MS, levou ao isolamento das substâncias (6aS,11aS)-3-hidróxi-2,9-dimetoxipterocarpano (**1**), (6aS,11aS)-medicarpina (**2**), cafeato de docosila (**3**), cafeato de tetracosila (**4**), estigmasterol (**5**), quercetina (**6**), 3-O- α -L-arabinofuranosíl quercetina (**7**), 3-O- β -D-glucopiranosíl quercetina (**8**) e 3-O- β -D-galactopiranosíl quercetina (**9**). Estas contemplam três classes de metabólitos secundários diferentes: compostos fenólicos, esteróides e flavonoides com esqueletos diferentes (pterocarpanos e flavonol), mostrando a preferência biossintética desta espécie por substâncias de natureza fenólica originadas da via do ácido chiquímico.

Dentre as substâncias isoladas, **1** é inédita na literatura, e as substâncias **2**, **3**, **4**, **8** e **9** estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Aeschynomene*. Já as substâncias **5**, **6** e **7** já foram relatadas anteriormente no gênero.

O extrato etanólico da parte aérea de *Aeschynomene filosa* foi avaliado frente atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* e a toxicidade frente à *Artemia salina*, mostrando-se inativo em ambos os testes.



6 REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v.1 (10), p. 3307-3330, 1992.

AN, R. B.; KIM, H. C.; TIAN, Y.H.; KIM, Y. C. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 529-533, 2005.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press, p. 171-178, 2006.

ARUNA, C.; CHAITHRA, D.; ALEKHYA, C.; YASODAMMA, N. Pharmacognostic Studies Of *Aeschynomene indica* L. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.4, p. 76-77, 2012.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática das angiospermas do Brasil. **UFV**, v.2, p. 15-100, Viçosa, 1991.

van der BERG, M. E. Formas atuais e potenciais de aproveitamento das espécies nativas e exóticas do Pantanal Mato-grossense. In: Simpósio Sobre Recursos Naturais E Sócio-Econômicos Do Pantanal, 1., 1984, Corumbá. **Anais. Brasília: Embrapa – DDT** (Embrapa – CPAP. Documentos, 5), p.131-136, 1986.

BERTONI, J.; LOMBARDI NETO, F. **Conservação do solo**. 6.ed. São Paulo, Ícone, p.35, 2008.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. **Journal of Natural Products**, v.58, p.1683, 1995.

BORGES-ARGÁEZ, R.; PENÃ-RODRÍGUEZ, L. M.; WATERMAN, P. G. Flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus xuul*. **P hytochemistry**, v.54, p.611-614 , 2000.

BRANDÃO, M. Gênero *Aeschynomene* L.: espécies mineiras e sua distribuição no país. **Daphne**, v.2, p. 27-46, 1992.



CAAMAL-FUENTES, E.; MOO-PUC, R.; TORRES-TAPIA, L. W.; PERAZA-SANCHEZ, S. R. Pterocarpanes from the root bark of *Aeschynomene fascicularis*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1421-1422, 2013.

CARVALHO, O. V.; OLIVEIRA, F. S.; SARAIVA, G. L.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. R.; SILVA JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M. R. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 353-358, 2013.

CHEN, J.; TAN, X.; LU, W.; YA, Q. A New Stigmasterol Ester from *Aeschynomene indica*. **Chinese Herbal Medicines**, v.3, n.4, p. 244-246, 2011.

CORRÊA, M. P. **Flora do Brasil: algumas plantas úteis, suas aplicações e distribuição geográfica**. Rio de Janeiro: Diretoria Geral de Estatística, 1-154, 1909.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 1, p.747, 1926.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v.2, 1931.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v.4, 1969.

DEY, S.; DEEPAK, M.; SETTY, M.; D'SOUZA, P.; AGRAWAL, A.; SANGLIA, G. K. Bioactive caffeic acid esters from *Glycyrrhiza glabra*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 18, p. 1657–1663, 2009.

FERNANDES, A.. **O táxon *Aeschynomene* no Brasil**. EUFC, Fortaleza. 1996.

FULLAS, F.; KORNBERG, L. J.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Two New Aromatic Constituents from the Rootwood of *Aeschynomene mimosifolia*, **Journal of Natural Products**, v.59, p.190-192, 1996.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; GASPAROTTOA, F. M.; LOURENCO, E. L. B.; CRESTANIB, S.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; SILVA-SANTOSE, J. E.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. Antihypertensive effects of isoquercitrin



and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 363–372, 2011.

GIBBONS, S.; MATHEW, K. T.; GRAY, A. I. A caffeic acid ester from *Holocneme strobilaceum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 465-467, 1999.

GUARIM NETO, G.. **Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia – *CNPq*, p.58, 1987.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21 st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GÜVENALP, Z. ; DEMIREZER, L. O. Flavonol glycosides from *Asperula arvenis* L. **TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY**, v. 29, p. 163-169, 2005.

GREGOIRE, S.; SINGH, A. P.; VORSA, N.; KOO, H. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferase and *Streptococcus mutans* acidogenicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1960-1968, 2007.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.,. **The Flavonoids: Advances in Research**. 1^a ed. London: Chapman and Hall, p.580-581, 1982.

HERATH, H. M. T. B.; DASSANAYAKE, R. S.; PRIYADARSHANI, A. M. A.; SILVA, S.; WANNIGAMA, G. P.; JAMIE, J. Isoflavonoids and a pterocarpan from *gliricidia sepium*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 117-119, 1998.

HONDA, N. K.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; CONCEIÇÃO, C. A. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: Triagem fitoquímica. **Revista de Ciência e Cultura UFMS**, v. 5, n. 1, p. 37 – 46,1990.

IGNOATO, M. C.; FABRAO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M. O.; MILANI, L. L. A.; BERSANI-ARMANDO, C. A.; CONCEICAO DE SOUZA, M. Estudo Fitoquímico e Avaliação da atividade Anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2241-2244, 2012.



JAMES, E.K., LOUREIRO, M. F., POTT, A., POTT, V. J., MARTINS, C. M., FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. Flooding-tolerant legume symbioses from the Brazilian Pantanal. **The New Phytologist**, v.150, p.723-738, 2001.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L.; ÁLVARES-CORRAL, M.; MUÑOZ-DORADO, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Review**, v.7, p.125-154, 2008.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v.62, p. 229-237, 2003.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2º ed. BASF, São Paulo, v. 2, 1999.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v.29, p.2351-2355, 1990.

LAKHSMAN, C. **Ecotechnological opportunities for aquatic plants - a survey of utilization options**. In: REDDY, K. R.; SMITH, W. H. (Eds). **Aquatic plants for water treatment and resource recovery**. Orlando: Magnolia Publication, p. 49-68, 1987

LATORRE, A. O.; BORGHI, G. A.; LOPES, P. L.; HIGA, K. C.; LOPES, L. M. X.; MAIORKA, P. C.; GORRNIK, S. L.; HARGUCHI, M. First report on Rotenoids as Neurotoxic Principles of Seeds from *Aeschynomene indica* (Leguminosae). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 3, 291-294, 2011.

LEE, J. I.; KONG, C. S.; JUNG, M. E.; HONG, J. W.; LIM, S. Y.; SEO, Y. Antioxidant Activity of the Halophyte *Limonium tetragonum* and Its Major Active Components. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p. 992-999, 2011.

LEE, J. W.; CHEONG, I. Y.; KIM, H. S.; LEE, J. J.; LEE, Y. S.; KWON, Y. S.; KIM, M. J.; LEE, H. J.; KIM, S. S.; CHUN, W. Anti-inflammatory Activity of 1-docosanoyl Caffeate Isolated from *Rhus verniciflua* in LPS-stimulated BV2 Microglial Cells. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 15, p. 9-15, 2011.

LEWIS, G.; SCHRIER, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Richmond, Royal Botanic Gardens Kew, 2005.



LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5434-5440, 2008.

LIMA, L. C. P.; Oliveira, M. L. A. A. *Aeschynomene* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82594>>. Acesso em: 06/Junho/2014.

LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica – uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Rio de Janeiro/ UFRJ, Rio de Janeiro, p.122, 2000

LORENZI, H.. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. **Plantarum**, Nova Odessa, 1982.

LU, Y.; FOO, Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

LV, J.; DUAN, J.; SHEN, B.; YIN, Y. Caffeic acid esters from *Artemisia argyi* and their antioxidant activities. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 1, 2013.

MABBERLEY, D. J.. **The plant book – a portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988.

MABBERLY, D. J. **The plant book**. Cambridge, UK: Camb University Press, 1997.

MacRAE, W. D.; J. B. HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-172, 1988.

MEDIANI, A.; ABAS, F.; KHATIB, A.; MAULIDIANI, H.; SHAARI, K.; CHOI, Y. H.; LAJIS, N. H. ¹H – NMR – based metabolomics approach to understanding the drying effects on the phytochemicals in *Cosmos caudatus*. **Food Research International**, v. 49, p. 763-770, 2012.



MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCL AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MILITÃO, G. C. G.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antimitotic properties of pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* on Sea Urchin Eggs. **Planta Medica**, v. 71, p. 683-685, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS) Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma Aprovada. 2ed. Norma M27-A2 do NCCLS, v. 22, n. 15, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

NATIONAL COMITEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 6a ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, n. 2, 2003).

NIERING, W. A. Wetlands. New York: **The Audubon Society**, p.638, .1985.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil. **Dengue Bulletin**, v. 26, p. 77-83, 2002.

OH, I.; YANG, W. Y.; CHUNG, S. C.; KIM, T. Y.; OH, K. B.; SHIN, J. In vitro sortase A inhibitory and antimicrobial activity of flavonoids isolated from the roots of *Sophora flavescens*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 2, p. 217-222, 2011.

O'NEILL, M. O.; LEWIS, J. A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. **ACS Symposium Series**, v. 534, p.48-55,1993.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 1994.

POTT, V.J.; POTT. **As Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 2000.

PUEPPKE, S. G.; van ETTEN, H. D. Identification of Three New Pterocarpan (6a,11 a-Dihydro-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopyrans) from *Pisum sativum* infected with *Fusarium*



solani f. sp *Pisi*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, v. 10, pg. 946- 948, 1975.

RAMAMOORTHY, T. P.; ZARDINI, E. M. The systematics and evolution of *Ludwigia* sect.*Myrtocarpussensulato*. **Monograph Systematic Botany**. (Missouri Botanical Garden), v.19, p.1-120, 1987.

RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v.146, p. 472–478, 2014.

RUDD, V. E. The american species of *Aeschynomene*. **Bulletin of the United States National Herbarium**, v.32, p.1-172, 1955.

RUDD, V. E.. *Aeschynomeneae (Benth.) Hutch.*In: R.M.Pollhill& P.H. (eds.). **Advances in legume systematics**. Royal Botanic Gardens Kew, v. 1, p. 347-354, 1981.

RUTTER, R. A. **Catálogo de plantas útiles de la Amazonia Peruana**. Yarinacocha: Ministerio de Educacion, p.322, 1990.

SAHPAZ, S.; BORIS, C. H.; LOIEAU, P. M. CORTES, D.; HACQUEMILLER, R. LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annoma senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538, 1994.

SCHOENING, A.; FRIEDRICHSEN, W. The stereochemistry of pterocarpanoids. A theoretical study. **Zeitschrift Fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences**, v. 44, n. 8, p. 975-982, 1989.

SIDANA, J.; NEERADI, D.; CHOUDHARY, A.; SINGH, S.; FOLEY, W. J.; SINGH, I. P. Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculate*. **Journal of Chemical Sciences**. v. 125, n. 4, p. 765-775, 2013.

SILVA, V. C.; ALVES, A. N.; SANTANA, A.; CARVALHO, M. G.; SILVA, S. L. C.; SCHRIPSEMA, J. Constituintes Fenólicos e Terpenóides Isolados das Raízes de *Andira fraxinifolia* (FABACEAE). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1184-1186, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.



SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; TANE, P.; NGADJUI, B. T.; MA, DAWEI. A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae). **Tetrahedron**, v.64, p.7999–8002, 2008.

SPRENT, J. I. **Nodulation in Legumes**. Royal Botanic Gardens Kew, p.146, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M. D. G., COSTA, M. D. C. N., BARRETO, M. L.; BARRETO, F. R. Epidemiology of dengue in Salvador-Bahia, 1995-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 269-274, 2001.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/13024868>. Acesso em 02/Junho/2014.

VASHIST, U.; SILVEIRA, P.; CABRAL, A.; AMARAL, K. B.; SOARES, G. L. G.; D'AGOSTO, M. Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L., 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium* (bennettinia) *juxtannuclear* Versiani e Gomes, 1941. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 220-223, 2008.

VELASQUEZ, J. **Plantas aquáticas vasculares de Venezuela**. Caracas: Universidad Central de Venezuela, p.992, 1994.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia, manual de plantas medicinais**. São Paulo: Ceres, p. 347, 1992.

VO, A. V.; LEE, J.; KIM, J.; LEE, H. J.; KIM, S.; CHUN, W.; KWON, Y. Avicularin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppressing ERK phosphorylation in RAW 264.7 macrophages. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 6, p. 532-537, 2012.

WENKERT, E.; GOTILIEB, H. E. Carbono-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoide and isoflavonoid compounds. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1811-1816, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO/VBC/ 81.807), p. 1-6, 1981.



ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. **Phytomedicine**, v. 2, p. 47, 1995

