

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

MARCOS VINÍCIOS PORTE DE SOUZA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS FOLHAS DE
***Aeschynomene americana* (FABACEAE)**

Anápolis – GO
2025

MARCOS VINÍCIOS PORTE DE SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Aeschynomene
americana* (FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Dra. Luciana Machado Ramos

Anápolis – GO

2025



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor (a)

Nome Completo: Marcos Vinícios Porte De Souza

E-mail: marcosvporte@gmail.com

Dados do trabalho

Título: **ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Aeschynomene americana* (FABACEAE)**

Data da Defesa: 24/06/2025

Tipo

() Tese (X) Dissertação

Programa de Mestrado em Ciências Moleculares

Concorda com a liberação documento

[X] SIM

[] **NÃO Casos de impedimento:** Período de embargo por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo necessita de justificativa junto à coordenação do curso.

- [] Solicitação de registro de patente;
- [] Submissão de artigo em revista científica;
- [] Publicação como capítulo de livro;
- [] Publicação da dissertação/tese em livro.

Anápolis, 26/09/2025

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS VINÍCIOS PORTE DE SOUZA
Data: 26/09/2025 08:14:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do autor (a)

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANA MACHADO RAMOS
Data: 26/09/2025 09:21:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do orientador (a)

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PS729 Porte De Souza, Marcos Vinicos
e ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS FOLHAS
DE Aeschynomene americana (FABACEAE) / Marcos Vinicos
Porte De Souza; orientador Luciana Machado Ramos. --
Anápolis, 2025.
82 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus
Central - Sede: Anápolis - CET - HENRIQUE SANTILLO,
Universidade Estadual de Goiás, 2025.

1. Gerar ficha catalográfica. I. Machado Ramos,
Luciana, orient. II. Título.



Universidade
Estadual de Goiás



ESTADO DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS - UEG
COORDENAÇÃO STRICTO SENSU CIÊNCIAS MOLECULARES

ATA DA 263ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MOLECULARES

REALIZADA EM: 24/06/2025

PROGRAMA DE: Mestrado em Ciências Moleculares

CANDIDATO: Marcos Vinícios Porte de Souza

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luciana Machado Ramos – orientador – UEG

Prof. Dr. Maisa Borges Costa – membro titular – UEG

Prof. Dr. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha – membro titular – IFG

Dr. Taynara Rezende Machado – membro titular – Hypera

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Aeschynomene americana* (FABACEAE)”.

LOCAL: Auditório dos Programas de Pós-Graduação Stricto sensu do Câmpus Central - Sede: Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás.

Iniciou às 13:30:00 em sessão pública, após exposição de cerca de 41 minutos, o candidato foi arguido oralmente, pelos membros da banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua dissertação, sendo aprovado com correções.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca, e pelo candidato.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Luciana Machado Ramos

Prof. Dr. Maisa Borges Costa

Prof. Dr. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

Dr. Taynara Rezende Machado

Discente: Marcos Vinícios Porte de Souza



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinícios Porte de Souza, Usuário Externo**, em 25/06/2025, às 19:59, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANA MACHADO RAMOS, Docente de Ensino Superior**, em 25/06/2025, às 20:08, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **TAYNARA REZENDE MACHADO, Usuário Externo**, em 25/06/2025, às 21:57, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Gracielle Oliveira Sabbag Cunha, Usuário Externo**, em 26/06/2025, às 14:37, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **MAISA BORGES COSTA, Docente de Ensino Superior**, em 27/06/2025, às 08:53, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site http://sei.go.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=1 informando o código verificador **76231963** e o código CRC **55AE23D6**.

COORDENAÇÃO STRICTO SENSU CIÊNCIAS MOLECULARES
RODOVIA BR 153 S/Nº, QUADRA ÁREA KM 99 - Bairro ZONA RURAL - ANAPOLIS -
GO - CEP 75132-903 - (62)8408-7538.



Referência: Processo nº 202400020018427



SEI 76231963

DOCUMENTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Aeschynomene americana* (FABACEAE)

Marcos Vinícios Porte de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Central - Sede: Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 24/06/2025 por:

Prof. Dr. Luciana Machado Ramos

Prof. Dr. Maisa Borges Costa

Prof. Dr. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

Dr. Taynara Rezende Machado

ANAPOLIS, aos 25 dias do mês de junho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **TAYNARA REZENDE MACHADO, Usuário Externo**, em 25/06/2025, às 21:57, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Gracielle Oliveira Sabbag Cunha, Usuário Externo**, em 26/06/2025, às 14:38, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site http://sei.go.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=1 informando o código verificador **76232020** e o código CRC **586A861C**.

COORDENAÇÃO STRICTO SENSU CIÊNCIAS MOLECULARES
RODOVIA BR 153 S/Nº, QUADRA ÁREA KM 99 - Bairro ZONA RURAL - ANAPOLIS -
GO - CEP 75132-903 - (62)8408-7538.



Referência: Processo nº 202400020018427



SEI 76232020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de força, sabedoria e paz nos momentos de dúvida, e à minha família, por seu amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditarem nos meus sonhos, mesmo quando eu mesmo titubeava.

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof^a Dra. Luciana Machado Ramos, pelo incentivo, paciência e por sua orientação cuidadosa em todas as etapas desta jornada. Agradeço também ao orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes pela valiosa contribuição científica e críticas construtivas e a Prof^a Dra. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha, pela generosidade no compartilhamento do conhecimento e contribuição no desenrolar do projeto, do mesmo modo também incluo a Prof^a Dr^a. Maisa Borges Costa, pela rica contribuição durante a qualificação do projeto.

Sou grato à Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo suporte técnico, estrutura e ambiente de pesquisa que tornaram este trabalho possível. Agradeço igualmente ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG) à Universidade Federal de Goiás (UFG) à Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) por todo o apoio institucional e acadêmico por ter contribuído para o desenvolvimento do projeto.

De forma especial, deixo meu reconhecimento aos pesquisadores do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica (Laquimeso/UEG), pela parceria, ensinamentos e amizade ao longo desta caminhada e a cada pessoa que, direta ou indiretamente, contribuiu para a realização deste trabalho, o meu sincero muito obrigado.

RESUMO

Diversas espécies do Cerrado são amplamente utilizadas na medicina tradicional em razão de seu elevado potencial terapêutico. O gênero *Aeschynomene*, pertencente à família Fabaceae, é composto por aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, sendo diversas já associadas a atividades biológicas como ação citotóxica, antitumoral e inseticida. No entanto, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre o estudo fitoquímico ou a avaliação biológica da espécie *Aeschynomene americana*. Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo inédito dos constituintes químicos das folhas, bem como a avaliação biológica. O extrato etanólico das folhas foi obtido por maceração e submetido à partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade. A fração em acetato de etila, após sucessivas cromatografias em coluna, forneceu a substância feofitina A (**I**), cuja estrutura foi elucidada por espectroscopia de RMN unidimensional (¹H) e bidimensional (HSQC e HMBC). Da fração hexânica, foram identificados os fitoesteróis: β -sitosterol (**II**), estigmasterol (**III**) e campesterol (**IV**), da fração metanólica foi possível isolar e identificar o flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo (**V**). A atividade antibacteriana dos extratos e das frações foi avaliada por microdiluição em caldo, não apresentando efeito inibitório (CMI > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMB > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) nas concentrações testadas. Por outro lado, os testes de citotoxicidade frente a linhagens celulares tumorais apresentaram seletividade, com valores de IS elevados para PC3 (IS = 3,01) e HL60 (IS = 5,27). O extrato etanólico também mostrou boa seletividade para SNB-19 (IS = 3,65). e o de toxicidade frente à *Artemia salina*, em que extrato etanólico e as frações de hexano e metanol apresentaram DL₅₀ menor que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a fração de acetato de etila com valor de DL₅₀ maior que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este estudo contribui significativamente para o conhecimento químico e biológico de uma espécie ainda não explorada cientificamente.

Palavras-chave: Atividades farmacológica. Tetrapirróis. Feofitinas. Triterpenos. Glicosídeos.

ABSTRACT

Several species from the Cerrado biome are widely used in traditional medicine due to their high therapeutic potential. The genus *Aeschynomene*, belonging to the Fabaceae family, comprises approximately 727 genera and 19,325 species, many of which have already been associated with biological activities such as cytotoxic, antitumor, and insecticidal effects. However, to date, no phytochemical studies or biological evaluations have been reported for *Aeschynomene americana*. In this context, the present work provides the first investigation of the chemical constituents of the leaves, as well as their biological evaluation. The ethanolic extract of the leaves was obtained by maceration and subjected to liquid–liquid partitioning with solvents in increasing order of polarity. The ethyl acetate fraction, after successive column chromatographies, yielded pheophytin A (I), whose structure was elucidated by one-dimensional (^1H) and two-dimensional (HSQC and HMBC) NMR spectroscopy. From the hexane fraction, the phytosterols β -sitosterol (II), stigmasterol (III), and campesterol (IV) were identified, while from the methanolic fraction, the flavonoid kaempferol-3-O-rutinoside (V) was isolated and identified. The antibacterial activity of the extracts and fractions was assessed using the broth microdilution method, showing no inhibitory effect ($\text{MIC} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $\text{MBC} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) at the tested concentrations. On the other hand, cytotoxicity assays against tumor cell lines demonstrated selectivity, with high SI values for PC3 ($\text{SI} = 3.01$) and HL60 ($\text{SI} = 5.27$). The ethanolic extract also showed good selectivity for SNB-19 ($\text{SI} = 3.65$). In the toxicity test against *Artemia salina*, the ethanolic extract and the hexane and methanol fractions presented LD_{50} values below $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, whereas the ethyl acetate fraction showed an LD_{50} above $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. This study significantly contributes to the chemical and biological knowledge of a species that has not yet been scientifically explored.

Keywords: Pharmacological activities. Tetrapyrroles. Pheophytins. Triterpenes. Glycosides.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Compostos isolados da <i>Aeschynomene elaphroxylon</i> (Guill. & Perr..... | 15 |
| Figura 2 - Composto responsável pelo fechamento das folhas de <i>Aeschynomene indica</i> | 16 |
| Figura 3 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene indica</i> | 18 |
| Figura 4 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene fasciculares</i> | 19 |
| Figura 5 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene sensitiva</i> | 21 |
| Figura 6 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene fluminensis</i> Vell..... | 22 |
| Figura 7 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene mimosifolia</i> | 23 |
| Figura 8 - Compostos isolados de <i>Aeschynomene denticulata</i> Rubb..... | 25 |
| Figura 9 - Espécie <i>Aeschynomene americana</i> em seu habitat antes da coleta | 26 |
| Figura 10 - Reação de redução do MTT a formazan a partir da ação das enzimas . | 29 |
| Figura 11 - Esquema de obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 33 |
| Figura 12 - Esquema do fracionamento do extrato etanólico das folhas | 34 |
| Figura 13 - Fluxograma de refracionamento da fração de acetato de etila das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 35 |
| Figura 14 - Fluxograma do isolamento da substância (I)..... | 36 |
| Figura 15 - Fluxograma de refracionamento da fração hexânica das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 36 |
| Figura 16 - Fluxograma do isolamento da substância (II)..... | 37 |
| Figura 17 - Fluxograma de refracionamento da fração metanólica das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 38 |
| Figura 18 - Fluxograma do isolamento da substância V..... | 39 |
| Figura 19 - Fluxograma do isolamento da substância V..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 - Representação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 46 |
| Figura 21 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância I..... | 52 |
| Figura 22 - Ampliação do espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância I.... | 53 |
| Figura 23 - Ampliação do espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância I.... | 54 |
| Figura 24 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância I (500 MHz, CDCl_3) | 55 |
| Figura 25 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância I (500 MHz, CDCl_3) | 56 |
| Figura 26 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMCB, da substância I (500 MHz, CDCl_3)..... | 57 |
| Figura 27 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMCB, da substância I (500 MHz, CDCl_3)..... | 58 |
| Figura 28 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância (II, III e IV) | 63 |
| Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias (II), (III) e (IV) em (CDCl_3 , 125 MHz)..... | 64 |
| Figura 30 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, das substâncias II, III e IV (500 MHz, CDCl_3)..... | 65 |
| Figura 31 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) em (CD_3OD) | 69 |
| Figura 32 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância (V) (500 MHz, CD_3OD)..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Reagentes utilizados..... | 31 |
| Tabela 2 - Materiais utilizados | 31 |
| Tabela 3 - Microrganismos utilizados na determinação da concentração mínima inibitória (CMI)..... | 40 |
| Tabela 4 - Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade | 42 |
| Tabela 5 - Classificação da toxicidade..... | 44 |
| Tabela 6 - Massa do material vegetal, volume do solvente e quantidade do extrato obtido | 45 |
| Tabela 7 - Massas obtidas e volume de solvente gasto no fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Aeschynomene americana</i> | 45 |
| Tabela 8 - Dados de ^1H -RMN (500 MHz), ^{13}C -RMN (125 MHz) (CDCl_3) para a substância I em comparação com os dados de RMN de ^1H -RMN (500 MHz), ^{13}C -RMN (125 MHz) (CDCl_3) de feofitina A | 50 |
| Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (II) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)..... | 60 |
| Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (III) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)..... | 61 |
| Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (IV) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)..... | 62 |
| Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância (V) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e em $\text{DMSO}-d_6$ | 67 |
| Tabela 13 - Resultado do ensaio de atividade microbiana frente aos extratos de <i>Aeschynomene americana</i> em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 71 |

| | |
|---|----|
| Tabela 14 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) com Desvio Padrão (DP) das amostras na concentração única de 100 µg.mL ⁻¹ para extratos e 50 100 µg.mL ⁻¹ para frações..... | 73 |
| Tabela 15 - Concentração Inibitória Média (CI ₅₀) com intervalo de confiança (IC) das amostras com..... | 74 |
| Tabela 16 - Valores Índice de seletividade IC ₅₀ (células não tumorais) /IC ₅₀ (célula tumoral) | 75 |
| Tabela 17 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|--|
| A-549 | Células de carcinoma pulmonar humano |
| AAFE-A | Fração acetato de etila |
| AAFE-H | Fração hexânica |
| AAFE-M | Fração metanólica |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| cm | Centímetro |
| CMB | Concentração mínima bactericida |
| CMI | Concentração mínima inibitória |
| <i>d</i> | Dupleto |
| <i>dd</i> | Duplo dupleto |
| DL | Dose letal 50 |
| g | Gramas |
| h | Altura |
| HCT-116 | Carcinoma de cólon |
| Hep-2 | Linhas celulares de cancro |
| HL60 | Linhagem leucêmica |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| IS | Índice de seletividade |
| L | Litros |
| L-929 | Fibroblasto murinho |
| <i>m</i> | Multiplete |

| | |
|-----------|----------------------------------|
| mg | Miligramas |
| MH | <i>Mueller Hinton</i> |
| mL | Mililitros |
| MTT | <i>Multi-Table Tournament</i> |
| Ø | Diâmetro |
| PC-3 | Células de carcinoma de próstata |
| ppm | Partes por milhão |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SA | Sem atividade |
| SNB-19 | Astrocitoma |
| <i>t</i> | Tripleto |
| <i>td</i> | Tripla Dupla Dupleta |
| UEG | Universidade Estadual de Goiás |
| UFC | Unidade formadora de colônia |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 2.1 | PRODUTOS NATURAIS | 12 |
| 2.2 | FAMÍLIA FABACEAE..... | 12 |
| 2.2.1 | Gênero <i>Aeschynomene</i> | 13 |
| 2.2.1.1 | <i>Aeschynomene uniflora</i> | 13 |
| 2.2.1.2 | <i>Aeschynomene elaphroxylon</i> (Guill. & Perr.)..... | 14 |
| 2.2.1.3 | <i>Aeschynomene indica</i> | 16 |
| 2.2.1.4 | <i>Aeschynomene fasciculares</i> | 18 |
| 2.2.1.5 | <i>Aeschynomene sensitiva</i> | 20 |
| 2.2.1.6 | <i>Aeschynomene fluminensis</i> Vell..... | 21 |
| 2.2.1.7 | <i>Aeschynomene mimosifolia</i> | 23 |
| 2.2.1.8 | <i>Aeschynomene denticulata</i> Rudd..... | 24 |
| 2.3 | AVALIAÇÃO BIOLÓGICA..... | 26 |
| 2.3.1 | Atividade antibacteriana | 27 |
| 2.3.2 | Citotoxicidade em linhagens de células tumorais..... | 28 |
| 2.3.3 | Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 29 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 30 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 30 |
| 3.2 | OBJETIVOS EPECÍFICOS..... | 30 |
| 4 | METODOLOGIA | 30 |
| 4.1 | MATERIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS | 30 |
| 4.2 | MATERIAL BOTÂNICO | 32 |
| 4.3 | OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO | 32 |
| 4.4 | FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO..... | 33 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5 | ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Aeschynomene americana</i> | 34 |
| 4.5.1 | Estudo fitoquímico de AAFE-A | 34 |
| 4.5.1.1 | Isolamento da substância (I) | 35 |
| 4.5.2 | Estudo fitoquímico de AAFE-H | 36 |
| 4.5.2.1 | Isolamento das substâncias (II), (III) e (IV)..... | 37 |
| 4.5.3 | Estudo fitoquímico de AAFE-M | 38 |
| 4.5.3.1 | Isolamento da substância V | 39 |
| 4.6 | ENSAIOS BIOLÓGICOS | 40 |
| 4.6.1 | Avaliação da atividade antibacteriana | 40 |
| 4.6.2 | Avaliação da atividade citotóxica..... | 41 |
| 4.6.3 | Avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> | 43 |
| 5 | RESULTADO E DISCUSSÕES | 44 |
| 5.1 | RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES | 44 |
| 5.2 | SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS | 45 |
| 5.2.1 | Identificação do Clorofilóide | 48 |
| 5.2.2 | Identificação da feofitina A, substância (I) | 48 |
| 5.2.3 | Identificação dos fitoesteróis | 59 |
| 5.2.3.1 | Identificação das substâncias (II), (III) e (IV) | 59 |
| 5.2.4 | Identificação do flavonoide | 66 |
| 5.2.4.1 | Identificação da substância (V) | 66 |
| 5.3 | ENSAIOS BIOLÓGICOS | 71 |
| 5.3.1 | Avaliação da atividade antibacteriana | 71 |
| 5.3.2 | Avaliação da atividade citotóxica..... | 72 |
| 5.3.3 | Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> | 75 |
| 6 | CONCLUSÕES | 76 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 77 |

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupa cerca de 2.036.448 km² e corresponde a mais de 22% do território brasileiro. Possui grande biodiversidade e abriga cerca de 11.627 espécies de plantas nativas, sendo, aproximadamente, 4.400 espécies endêmicas, além de possuir grande potencial econômico e medicinal (Silva *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2022).

A família Fabaceae, também denominada Leguminosae, é uma das maiores e mais ecologicamente relevantes entre as angiospermas, compreendendo entre 19.000 e 20.000 espécies distribuídas em cerca de 730 a 795 gêneros. Essa diversidade abrange uma ampla variedade de formas de crescimento, como ervas, arbustos, árvores e trepadeiras, o que reflete sua adaptabilidade e presença em quase todos os biomas terrestres (Azani *et al.*, 2017; Petruzzello, 2023)

Também são fontes fundamentais de compostos fitoquímicos com alta importância medicinal, como compostos fenólicos (fenilpropanoides, flavonoides, taninos, antocianinas, lignanas, cumarinas e furanocumarinas), policetídeos (antraquinonas) e terpenoides (principalmente triterpenoides, saponinas esteroides e tetraterpenos) (Lewis *et al.*, 2005; Amorim *et al.*, 2016).

O gênero *Aeschynomene*, pertencente à família Fabaceae, é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo as Américas, África, Ásia e Austrália. Estima-se que o gênero compreenda cerca de 180 espécies no mundo, das quais 49 estão registradas no Brasil, distribuídas por diversos biomas do território nacional (Queiroz; Lima; Lewis, 2002).

Ignato (2012) destaca que diversas espécies do gênero *Aeschynomene* têm sido objeto de estudos fitoquímicos visando à identificação de compostos bioativos e à avaliação de suas atividades biológicas. Nesse contexto, o iremos abordar os estudos fotoquímicos realizados no genero *Aeschynomene*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

Os avanços tecnológicos têm permitido a descoberta de novos produtos naturais com atividades imunomoduladoras promissoras, reforçando a relevância contínua desses compostos na pesquisa farmacêutica atual. Por exemplo, uma revisão abrangente analisou a diversidade de metabólitos secundários fúngicos e suas aplicações emergentes na saúde, agricultura e sustentabilidade ambiental (Wadhwa *et al.*, 2024; Mahmoudi *et al.*, 2024)

Para Elshafie; Camele; Mohamed, (2023) esses metabólitos secundários incluem compostos como alcaloides, terpenoides e fenólicos, que desempenham papéis cruciais na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, além de contribuírem para a adaptação a estresses ambientais.

Algumas espécies vegetais são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, sendo que essas plantas, seguindo os usos tradicionais de várias comunidades, têm se mostrado como fontes promissoras de novas moléculas com potencial terapêutico. Consequentemente, essas espécies possuem um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos com ampla eficácia terapêutica, conforme apontado por Ferreira *et al.*, (2015).

O estudo de plantas do Cerrado se justifica pela possibilidade de essas plantas possuírem, além do potencial antitumoral, atividades antimicrobianas, antiparasitárias e inseticidas. Esse potencial se deve à possível presença de diversos constituintes químicos, como compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteróides (Versiane Santos e Romero, 2016).

2.2 FAMÍLIA FABACEAE

Estima-se um total de 101 estudos focado nas espécies da família FABACEAE no Zimbábue utilizadas como plantas medicinais, 127 espécies medicinais da família utilizadas no tratamento de diversas doenças humanas e animais na Etiópia, destaque

para o gênero *Sophora* com mais de 300 compostos isolados, incluindo principalmente alcaloides quinolizidínicos, como a matrina e a oxymatrina, e flavonoides (Asfaw; Abebe, 2022; Krishna *et al.*, 2012; Maroyi, 2023).

Cerca de 260 flavonoides foram encontrados em plantas da família Fabaceae, incluindo propriedades anticancerígenas, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e neuroprotetoras, ressaltando o potencial terapêutico desses metabólitos secundários (Morante-Carriel, 2024),

Apesar da ampla utilização de plantas do território brasileiro como recursos terapêuticos, muitas espécies permanecem pouco exploradas do ponto de vista científico. Segundo Lopes *et al.* (2024), diante da imensa biodiversidade nacional, ainda há muito a ser investigado quanto às propriedades químicas e biológicas de diversas espécies vegetais. O estudo conduzido pelos autores sobre *Andira paniculata* (FABACEAE) evidencia esse potencial, ao revelar compostos bioativos com expressiva atividade citotóxica e antibacteriana, destacando a relevância da família.

2.2.1 Gênero *Aeschynomene*

Conforme a literatura, estes foram os estudos fitoquímicos realizados nas espécies do gênero até o momento: *Aeschynomene uniflora*, *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. & Perr.), *Aeschynomene indica*, *Aeschynomene aspera*, *Aeschynomene fasciculares*, *Aeschynomene sensitiva*, *Aeschynomene fluminensis* Vell, *Aeschynomene mimosifolia*, *Aeschynomene uniflora* e *Aeschynomene denticulata* Rudd (Anas *et al.*, 2019; Achika; Ndukwe, 2016; Selmy *et al.*, 2023; (Hashem *et al.*, 2019; Ueda; Niwa; Yamamura, 1995; Caamal-Fuentes *et al.*, 2015; Castillo-Bautista *et al.*, 2019; Arruda *et al.*, 2018; Ignoato *et al.*, 2012; Fullas *et al.*, 1996; Sá *et al.*, 2023).

2.2.1.1 *Aeschynomene uniflora*

Aeschynomene uniflora é uma planta encontrada em diversas regiões tropicais e subtropicais, conhecida por suas propriedades medicinais. Estudos anteriores têm demonstrado que essa planta possui um alto teor de fitonutrientes, como compostos fenólicos, flavonoides e taninos, que apresentam atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Anas *et al.*, 2019).

Outro estudo investigou a composição fitoquímica e as atividades antimicrobianas de extratos da parte aérea de *Aeschynomene uniflora*. A parte aérea da planta foi pulverizada e extraída com quatro solventes diferentes: éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Os extratos foram submetidos a uma prospecção fitoquímica preliminar para identificar a presença de vários compostos químicos. O estudo concluiu que os extratos continham uma variedade de metabólitos, incluindo hidratos de carbono, glicosídeos cardíacos, flavonoides, saponinas, esteroides, triterpenos e taninos (Achika; Ndukwe, 2016).

Além disso, os pesquisadores testaram o potencial anti-inflamatório do extrato de metanol em modelos *in vitro* e *in vivo*. Utilizando ensaios de atividade anti-inflamatória, foram avaliados parâmetros como produção de óxido nítrico, liberação de citocinas inflamatórias e expressão de proteínas pró-inflamatórias (Anas *et al.* 2019).

O extrato apresentou atividade anti-inflamatória significativa, inibindo a produção de óxido nítrico, a liberação de citocinas inflamatórias e a expressão de proteínas pró-inflamatórias (Anas *et al.*, 2019). A avaliação da toxicidade do extrato não revelou mortalidade em nenhum grupo, mesmo na dose de 5000 mg/kg, indicando sua segurança. Os resultados do estudo também indicaram que o extrato metanólico de *Aeschynomene uniflora* possui efeitos anti-inflamatórios (Anas *et al.* 2019).

Com base nesses resultados, os extratos foram testados contra várias cepas de microrganismos para avaliar suas propriedades antimicrobianas. Os testes incluíram a avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica, contudo os resultados mostraram que os extratos clorifórmio e metanol apresentaram atividades antimicrobiana significativas, incluindo bactérias como *staphylococcus aureas* e *escherichia coli* (Achika; Ndukwe, 2016).

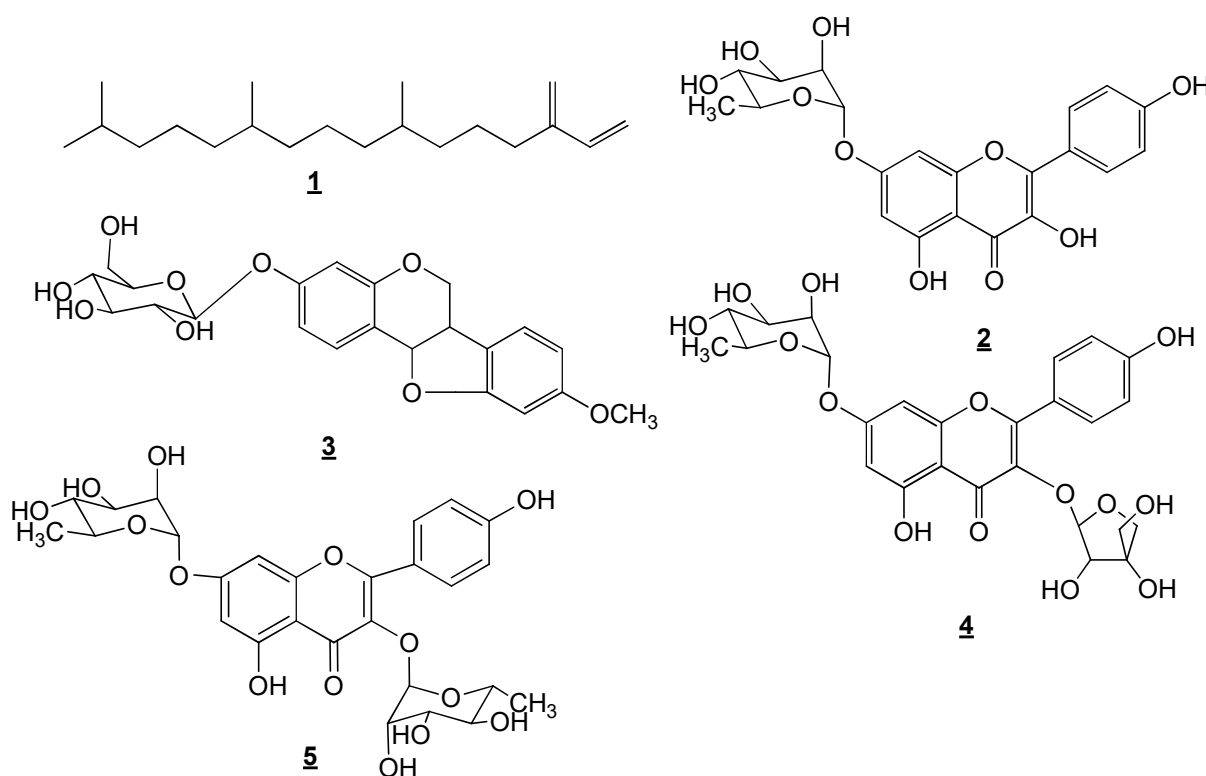
2.2.1.2 *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. & Perr.)

Aeschynomene elaphroxylon (Guill. & Perr.) é uma grande planta aquática nativa de Madagascar e da África tropical e cultivada no Egito. A fração de éter de petróleo do extrato metanólico total mostrou atividades citotóxicas notáveis contra células de carcinoma pulmonar humano (A-549) e células de carcinoma de próstata

(PC-3) com valores de IC^{50} de $12,3 \pm 0,8$ e $23,8 \pm 1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Selmy *et al.* 2023).

O estudo isolou e identificou os compostos Neofitadieno **1**, Kaempferol-7-O- α -L-ramnosídeo **2**, Medicarpina-3-O- β -D-glicopiranosídeo **3**, Kaempferol-3-O- β -D-apiofuranosil-7-O- α -L-ramnosídeo **4** e Kaempferol-3,7-di-O- α -L-ramnosídeo **5**, das principais frações de éter de petróleo, acetato de etila e *n*-butanol conforme a (Figura 1). A fração obtida a partir do extrato de éter de petróleo, apresentou atividade citotóxica ainda mais potente contra as mesmas linhagens celulares (Selmy *et al.* 2023).

Figura 1 - Compostos isolados da *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. & Perr.



Adaptado de (Hany Selmy *et al.*, 2023)

O perfil metabólico e do efeito hepatoprotetor da planta *Aeschynomene elaphroxylon*, que é uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional, em que pesquisadores realizaram experimentos em ratos para avaliar os efeitos da *Aeschynomene elaphroxylon* no fígado, analisando parâmetros bioquímicos como

enzimas hepáticas, bilirrubina, proteínas totais e albumina, entre outros (Hashem *et al.* 2019).

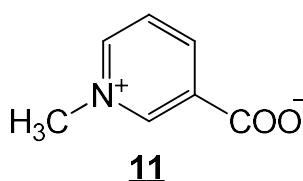
Aeschynomene elaphroxylon tem um efeito hepatoprotetor significativo, reduzindo os danos hepáticos induzidos por substâncias tóxicas. Além disso, a análise do perfil metabólico revelou alterações nas vias metabólicas dos animais tratados com a planta, indicando possíveis mecanismos de ação (Hashem *et al.* 2019).

2.2.1.3 *Aeschynomene indica*

A partir dos extratos de diferentes partes da planta, como raízes, folhas e caules, foram submetidos a atividade antioxidante, além disso, a composição química dos extratos em que os resultados mostraram que todas as partes da planta apresentaram atividade antioxidante significativa, em particular, as raízes da planta mostraram a maior atividade antioxidante (Lei *et al.*, 2019; Prathibha Bharathi; Muralidhara Rao, 2015).

A espécie está relacionada ao movimento de fechamento das folhas das plantas *nyctinásticas*, especificamente da espécie *Aeschynomene indica* envolvendo as substâncias em um fenômeno natural em que as folhas se movem em resposta à variação da luz e da temperatura ao longo do dia, se abrindo durante o período diurno e se fechando durante a noite. No caso da *Aeschynomene indica*, o movimento de fechamento das folhas é controlado pela presença de Trigonelina **11**, conforme a (**Figura 2**) abaixo (Ueda; Niwa; Yamamura, 1995).

Figura 2 - Composto responsável pelo fechamento das folhas de *Aeschynomene indica*

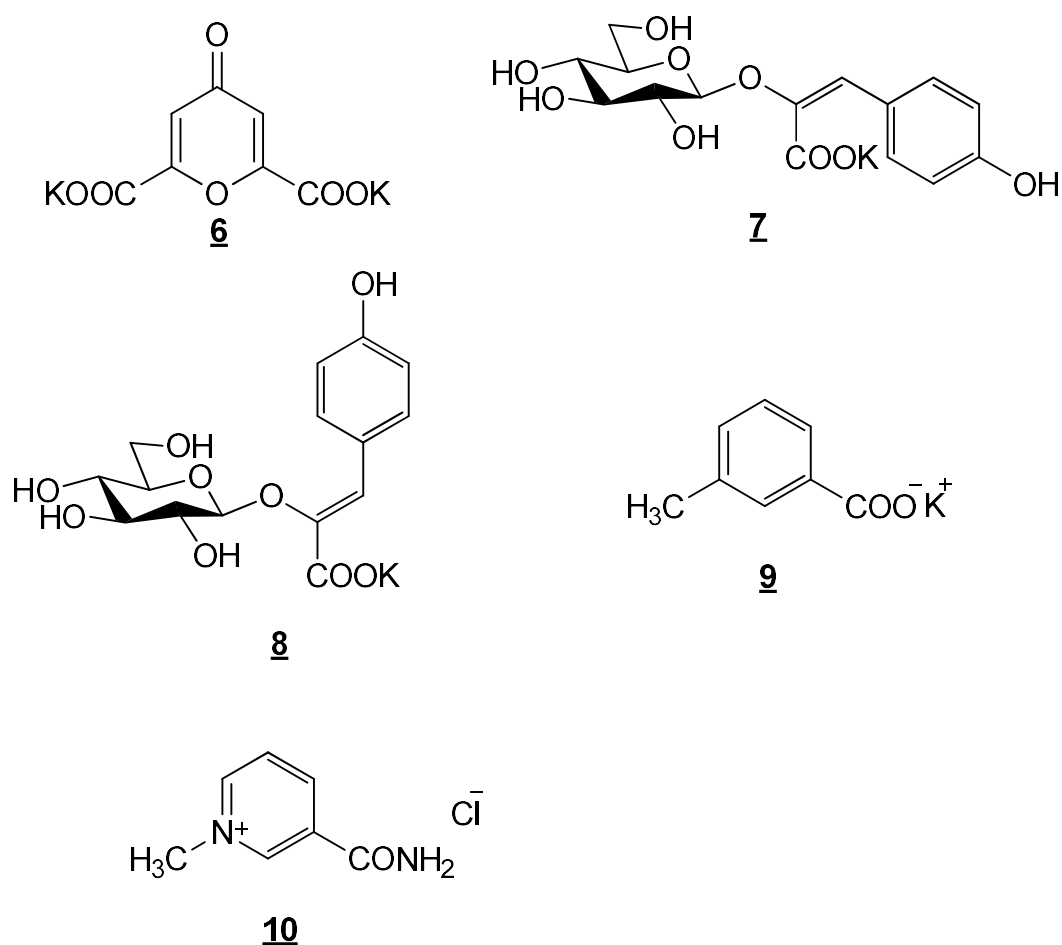


Fonte: adaptado de (Ueda; Niwa; Yamamura, 1995)

A trigonelina, (uma substância química encontrada nas plantas que desempenha um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento.

Neste estudo, os pesquisadores identificaram a trigonelina, substância bioativa isolada da planta nyctinástica *Aeschynomene indica*. Ela atua como um fator de fechamento de folhas, sendo eficaz durante o dia. Sua estrutura (com cargas positivas e negativas) é essencial para sua atividade.

A trigonelina compete com o ácido indol-3-acético. Quando a concentração de trigonelina é maior que a de ácido indol-3-acético, as folhas permanecem fechadas, mesmo durante o dia. Isso sugere que a trigonelina desempenha um papel no controle do ritmo circadiano da planta, regulando o equilíbrio entre fechamento e abertura das folhas, que também conta com auxílio outras substâncias para desencadeamento deste movimento, tais como Dicarbonato de potássio 6, Potássio lespedezat 7, Isolespedezato de potássio 8, *m*-toluato de potássio 9 e Sal de cloreto de 1-metilnicotinamida 10 conforme a (Figura 3) (Ueda; Niwa; Yamamura, 1995).

Figura 3 - Compostos isolados de *Aeschynomene indica*

Fonte: Adaptado de (Ueda; Niwa; Yamamura, 1995)

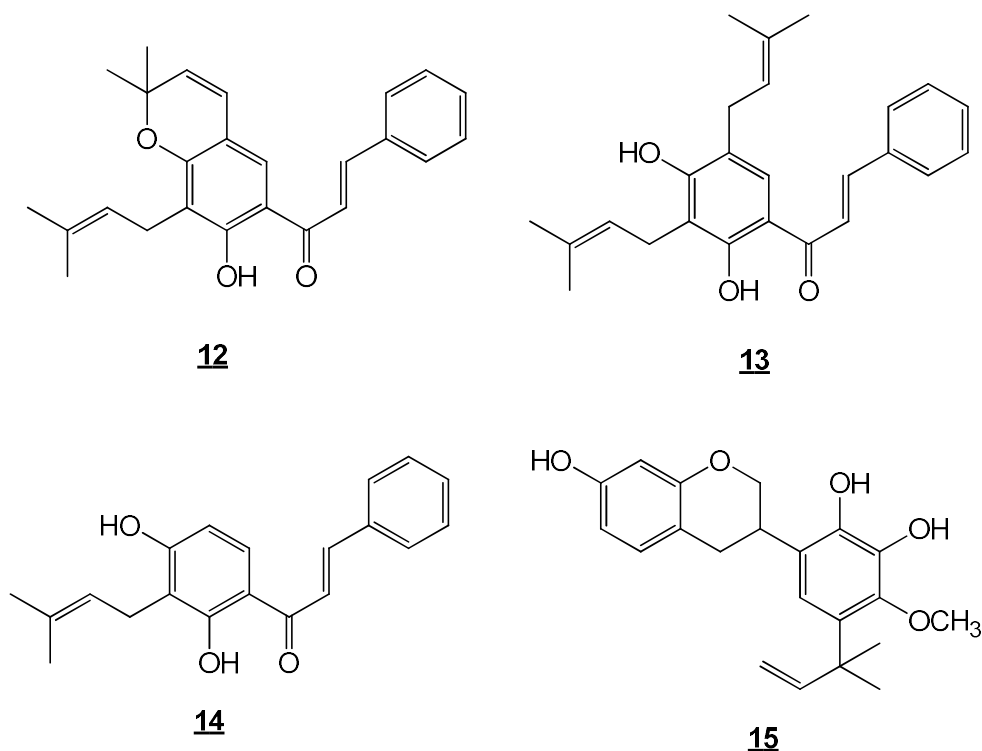
Os resultados deste estudo contribuem para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos das plantas *nyctinásticas* e podem ter aplicações práticas no desenvolvimento de novas tecnologias para o cultivo e manejo de plantas (Ueda; Niwa; Yamamura, 1995).

2.2.1.4 *Aeschynomene fasciculares*

Foram isolados compostos da planta e testados quanto à atividade citotóxica contra células cancerígenas. Os resultados que a fração hexânica da casca da raiz de *Aeschynomene fascicularis* apresentava a atividade citotóxica mais forte contra as linhas celulares de cancro Hep-2. Esta fração foi posteriormente purificada, o que levou ao isolamento de quatro compostos (Figura 4): espinochalcona C **12**,

espinochalcona A **13**, isocordofina **14** e secundiflorol G **15** (Caamal-Fuentes *et al.* 2015).

Figura 4 - Compostos isolados de *Aeschynomene fasciculares*



Fonte: Adaptado de Caamal-Fuentes *et al.*, 2015

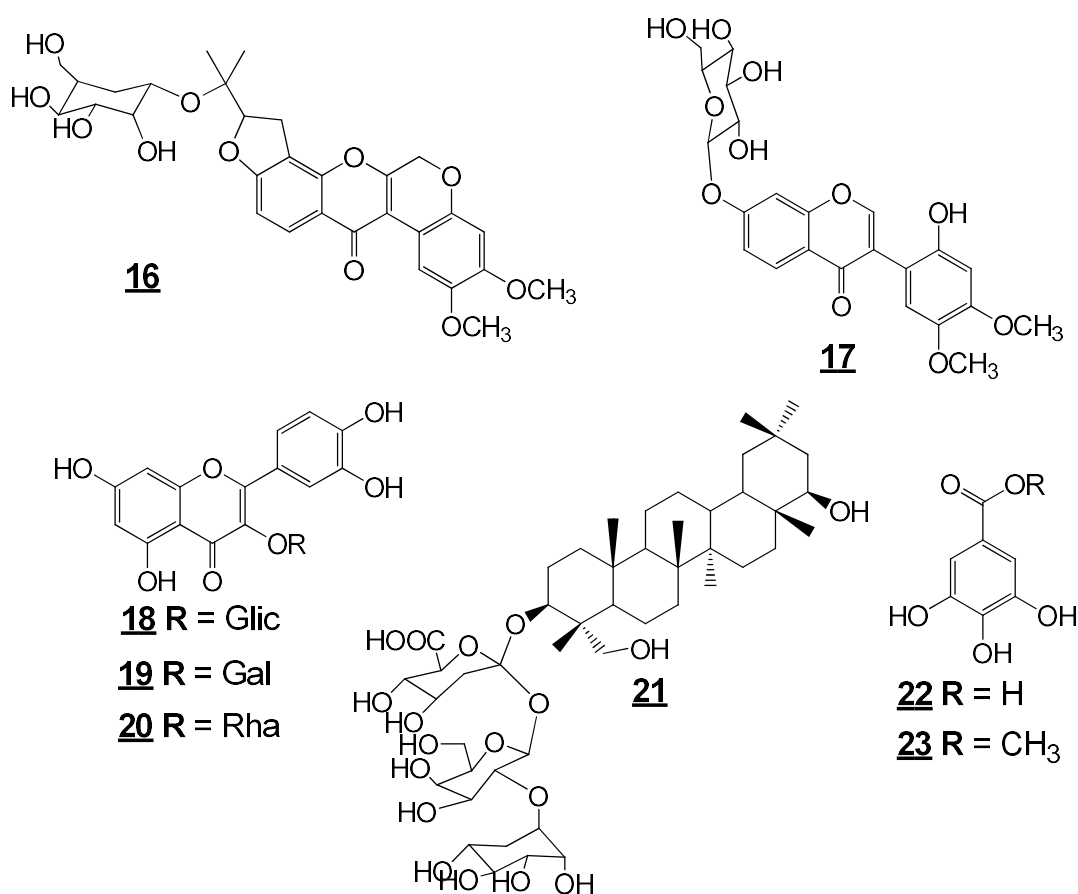
Posteriormente, castillo-Bautista e colaboradores (2019) conduziram uma investigação realizada acerca do efeito do secundiflorol G **15**, um isoflavonoide isolado da casca da raiz de *Aeschynomene fascicularis*, uma planta medicinal Maia usada para tratar sintomas semelhantes ao câncer e descobriram que o secundiflorol G induz a apoptose (morte celular programada) nas células cancerígenas (Castillo-Bautista *et al.* 2019).

O estudo apontou que o Secundiflorol G foi capaz de induzir a apoptose em células de câncer cervical de forma dose-dependente, o que sugere que ela pode ter potencial terapêutico no tratamento dessa doença. Além disso, a substância também demonstrou possuir atividade antiproliferativa, inibindo o crescimento das células de câncer cervical (Castillo-Bautista *et al.* 2019).

2.2.1.5 *Aeschynomene sensitiva*

Arruda e colaboradores (2018) avaliaram a composição química e as atividades anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante das partes aéreas de *A. sensitiva*, espécie nativa do Brasil e conhecida popularmente como "sensitiva".

O estudo fitoquímico levou à identificação das substâncias: 6'-hidroxi-6a, 12a-dehidrorotenona **16**, dihidroxi-4',5'-dimetoxiisoflavona **17**, quercetina 3-O- β -D-glicosídeo **18**, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo **19**, quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo **20**, saponina triterpênica soyasaponina **21**, ácido gálico **22** e Galato de metila **23**, conforme demonstrado na (Figura 5) (Arruda *et al.* 2018).

Figura 5 - Compostos isolados de *Aeschynomene sensitiva*

Fonte: Adaptado de (Arruda *et al.*, 2018)

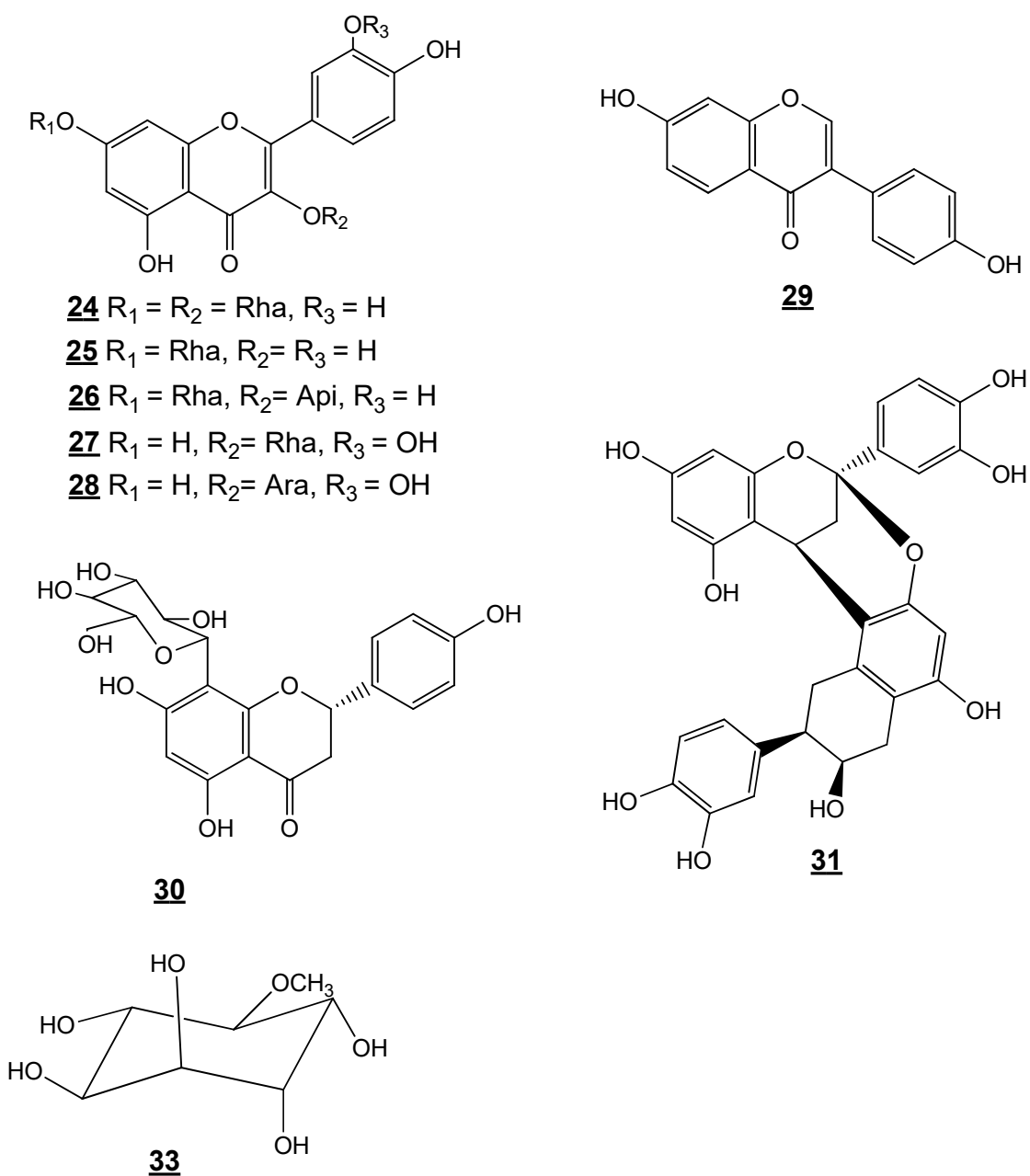
2.2.1.6 *Aeschynomene fluminensis* Vell

A *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae) teve como objetivo principal realizar um estudo fitoquímico da planta e avaliar a sua atividade anti-inflamatória. *Aeschynomene fluminensis* é uma planta nativa do Brasil, e pertence à família Fabaceae (Ignoato *et al.* 2012).

Foram identificados compostos químicos presentes na planta, como flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides. 3,7-di-O- α -L-raminopiranosilcanferol (canferitrina) **24**, 7-O- α -L-raminopiranosilcanferol (α -raminoiso-robina) **25**, 3-O-apiofuranosil-7-O- α -L-raminopiranosilcanferol **26**, 3-O- α -L-raminopiranosilquercetina (quercitrina) **27**, 3-O- α -L-arabinofuranosilquercetina (avicularina) **28**, 4',7-di-hidroxi-isoflavona (daidzeína) **29**, 8-C- β -D-glicopiranosil-4',5,7-tri-hidroxi-flavanona (iso-

hemifloina) **30**, Dímero epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina (procianidina A2) **31**, Poliol 3-O-metil-quiro-inositol **32**, conforme a (Figura 6) (Ignoato *et al.* 2012).

Figura 6 - Compostos isolados de *Aeschynomene fluminensis* Vell



Fonte: Adaptado de (Ignoato *et al.*, 2012)

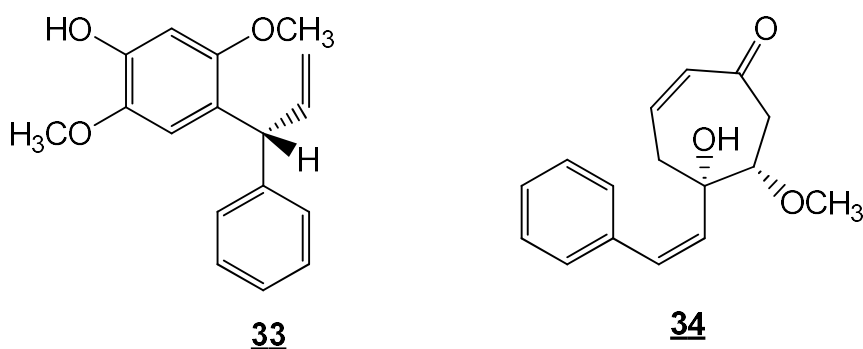
Para avaliar a atividade anti-inflamatória da *Aeschynomene fluminensis*, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, nos quais a planta apresentou resultados

promissores na redução da inflamação. Acredita-se que esses efeitos sejam decorrentes da ação dos compostos químicos identificados no estudo fitoquímico (Ignoato *et al.* 2012).

2.2.1.7 *Aeschynomene mimosifolia*

No estudo realizado com essa espécie o isolamento, a identificação e a caracterização de dois novos compostos aromáticos (Figura 8) encontrados no lenho da raiz da planta *Aeschynomene mimosifolia* (Mimosifoliol **33** e Mimosifolenona **34**) conforme a (Figura 7). Esses compostos foram identificados e caracterizados por meio de técnicas analíticas como espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (Fullas *et al.* 1996).

Figura 7 - Compostos isolados de *Aeschynomene mimosifolia*



Fonte: Adaptado de (Fullas *et al.*, 1996)

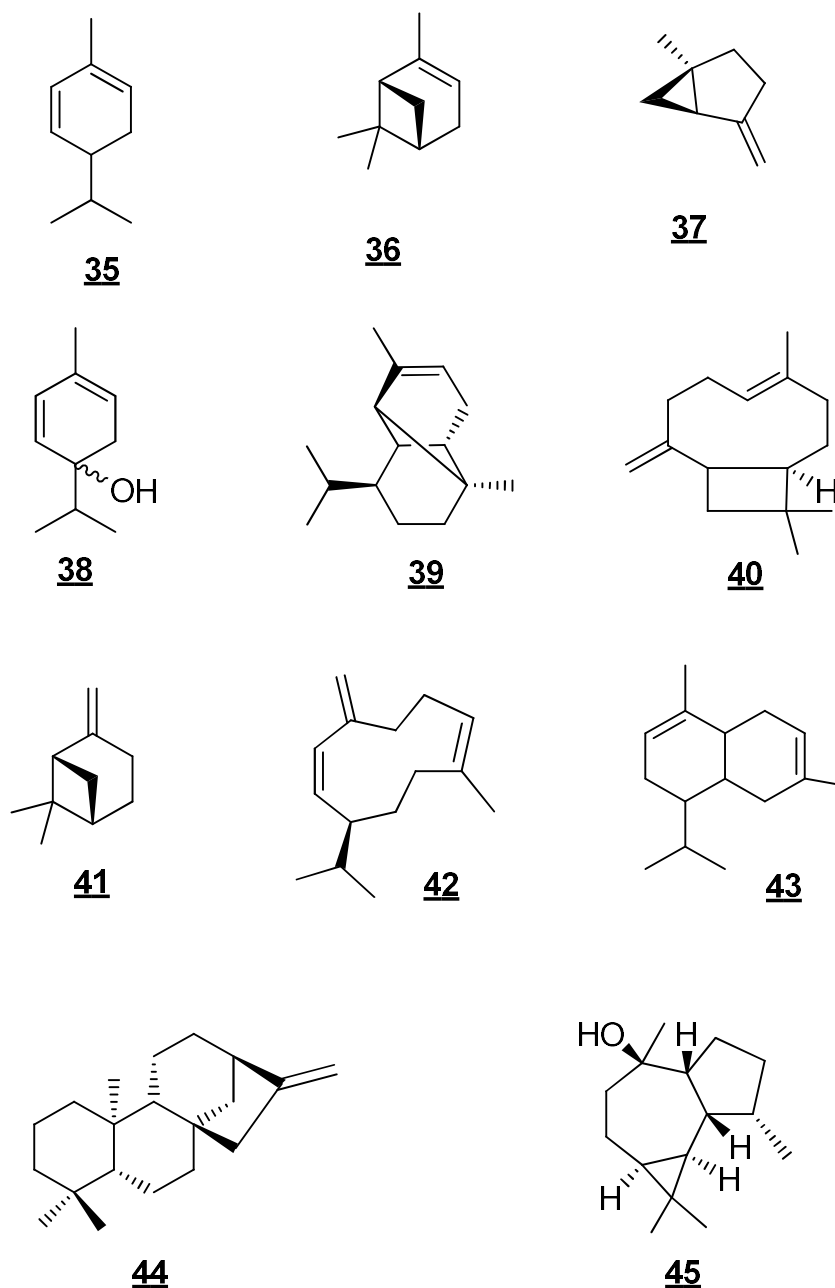
A pesquisa destaca a importância desses novos componentes na composição química da planta, assim como seu potencial para aplicações farmacêuticas, industriais e agrícolas. Além disso, os resultados do estudo contribuem para o conhecimento da biodiversidade e da química natural das plantas, auxiliando na descoberta de novos compostos bioativos (Fullas *et al.* 1996).

2.2.1.8 *Aeschynomene denticulata* Rudd

A espécie *Aeschynomene denticulata* Rudd é conhecida por suas propriedades medicinais e seu uso tradicional na medicina popular. Sá e colaboradores (2023) investigaram a composição química do óleo essencial obtido dessa planta, bem como suas atividades antibacterianas e citotóxicas. Segundo Sá *et al.* (2023) O óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação e sua composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Os principais constituintes do óleo essencial foram α -pineno (30,6%), β -pineno (20,8%), germacreno D (13,1%) e sabineno (9,3%).

Os resultados mostraram que o óleo essencial de *Aeschynomene denticulata* Rudd é composto por uma variedade de compostos químicos, incluindo terpenos, aldeídos e álcoois. Além disso, o óleo essencial apresentou atividade antibacteriana contra várias cepas de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Sá *et al.* 2023).

Além disso, o óleo essencial também exibiu atividade citotóxica contra células cancerígenas, o que sugere seu potencial como um agente anticancerígeno e pode ter aplicações terapêuticas potenciais no tratamento de infecções bacterianas e câncer. Dentre as substâncias isoladas (Figura 8) e identificadas estão α -Feladreno **35**, α -pineno **36**, sabineno **37**, β -pineno **38**, terpen-4-ol **39**, α -Copaeno **40**, β -cariofileno **41**, germacreno D **42**, β -Cadineno **43**, Viridiflorol **44**, kaureno **45** (Sá *et al.* 2023).

Figura 8 - Compostos isolados de *Aeschynomene denticulata* Rubb

Fonte: Adaptado de (Sá et al., 2023)

Sendo assim, a partir destes referenciais, surgiu o interesse em trabalhar com a espécie *Aeschynomene americana*, um subarbusto de 0,3–1,5 m de altura, com hábito decumbente e adaptado a ambientes aquáticos ou paludosos. Suas folhas possuem 42–66 folíolos oblongo-falcados, com ápice obtuso e mucronulado, margem serrada e hirsuto-ciliada no terço superior, além de venação paralelódrôma. As flores,

de 4–14 mm de comprimento, apresentam pétalas lavanda ou salmão e cálice bilabiado. Os frutos são lomentos de 0,6–3,5 cm, com 1–9 artículos, e sementes castanhas de 1,5–2,2 mm. A espécie é amplamente distribuída no Brasil, incluindo o estado de Goiás, onde ocorre como ruderal e invasora de culturas, florescendo e frutificando ao longo de todo o ano (Antunes *et al.*, 2018)

Figura 9 - Espécie *Aeschynomene americana* em seu habitat antes da coleta



Fonte: O Autor

2.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

A realização de ensaios biológicos com extratos de plantas é uma etapa essencial na prospecção de compostos bioativos, pois permite verificar a presença de atividades farmacológicas relevantes, como ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória ou citotóxica. Esses testes são fundamentais tanto para validar o uso tradicional de espécies medicinais quanto para direcionar o isolamento de princípios ativos com potencial terapêutico. Além disso, contribuem para a avaliação da toxicidade e da segurança dos extratos, auxiliando no desenvolvimento de novos fitoterápicos e medicamentos de origem natural (Ramos; Santos; Silva, 2022).

2.3.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana de extratos vegetais tem sido amplamente investigada como alternativa promissora frente à crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais. Sendo assim, a crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem impulsionado a busca por alternativas terapêuticas eficazes (CLSI, 2016).

Nesse contexto, os extratos de plantas medicinais emergem como fontes promissoras de compostos antibacterianos. Uma revisão abrangente destacou que extratos de espécies como *Quercus coccifera*, *Ocimum gratissimum* e *Curcuma longa* demonstraram significativa eficácia contra patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com concentrações inibitórias mínimas (CMI) variando entre 4 e 7,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses resultados indicam o potencial dos extratos vegetais no combate a bactérias patogênicas, especialmente diante da crescente resistência aos antibióticos tradicionais (Zouine *et al.*, 2024).

Testes de sensibilidade a antimicrobianos, conforme o CLSI, (2003) são essenciais para microrganismos que causam infecções e necessitam de tratamento antimicrobiano. De modo geral, esses testes são realizados quando a sensibilidade do organismo a antimicrobianos não pode ser prevista com base apenas em sua identificação. Isso significa que, se um microrganismo patogênico é conhecido por sua resistência a agentes antimicrobianos convencionais, a realização desses testes torna-se crucial.

Para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos, diversos métodos laboratoriais são empregados. Os mais comuns incluem o método de difusão em ágar por poço, disco difusão e os métodos de macrodiluição e microdiluição em caldo. O CLSI, (2008) indica que os métodos de difusão, seja em caldo ou em ágar, podem ser utilizados para quantificar a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um isolado bacteriano específico.

Segundo Ricardo, (2008) e Madigan *et al.*, (2010) concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um composto capaz de inibir completamente um organismo em teste. Para determinar tanto a CIM quanto a Concentração Bactericida Mínima (CBM), emprega-se o método de macro ou microdiluição. Este método envolve a preparação de diluições sucessivas dos extratos

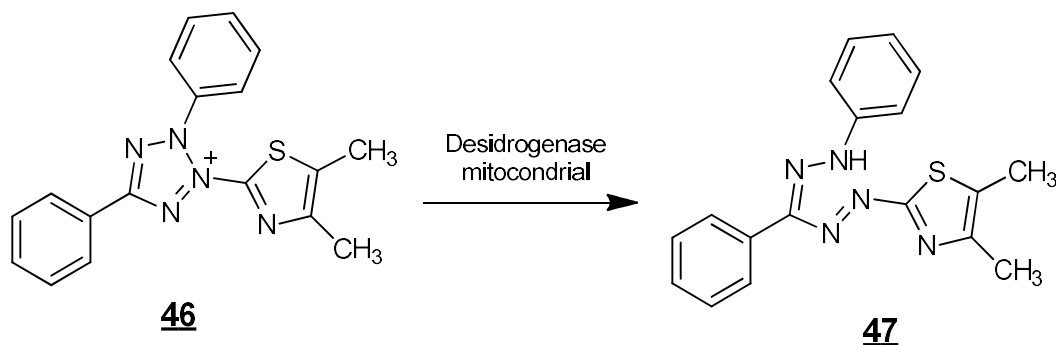
em meio de cultura líquido ou sólido, seguida da semeadura dos microrganismos. Após a incubação, verifica-se qual foi a menor concentração que conseguiu inibir o crescimento microbiano (CLSI, 2002; 2003).

2.3.2 Citotoxicidade em linhagens de células tumorais

O câncer é um termo abrangente que engloba mais de 100 tipos de doenças. Todas elas compartilham uma característica fundamental: o crescimento descontrolado de células no organismo. Essas células anormais podem invadir os tecidos próximos de forma agressiva e desordenada, levando à formação de tumores e à sua disseminação por todo o corpo (INCA, 2022).

A avaliação metabólica celular é um parâmetro crucial para determinar a viabilidade ou proliferação celular quando expostas a um composto específico. Essa análise é fundamental para verificar a atividade do composto em questão. Um dos métodos mais utilizados para avaliar a citotoxicidade é o ensaio de MTT, primeiramente descrito por Mossman, (1983). Este método colorimétrico permite analisar a viabilidade e o estado metabólico das células. Ele se baseia na capacidade das enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase presente apenas em células metabolicamente ativas de converter o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) **46** em formazan **47**, um produto colorido e insolúvel. A intensidade da coloração é diretamente proporcional ao número de células viáveis conforme a (Figura 10).

Figura 10 - Reação de redução do MTT a formazan a partir da ação das enzimas



Fonte: Adaptado de Magalhães, Thá e Leme (2018)

Embora existam diversos testes colorimétricos para determinar a citotoxicidade de agentes químicos, o ensaio de MTT se destaca. Ele é amplamente utilizado devido à sua sensibilidade na detecção de citotóxicos e sua alta reprodutibilidade. Este teste quantifica o dano causado por um agente no metabolismo celular de carboidratos, avaliando a atividade das desidrogenases mitocondriais. Em essência, ele mede a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular como um todo. A intensidade da coloração roxa/lilás, resultante dos cristais de formazana liberados pelas células, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular, conforme descrito por (Mosmann, 1983).

2.3.3 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Estudos toxicológicos de plantas são cruciais para confirmar sua toxicidade e devem considerar fatores como dose, tempo, frequência e via de administração. Ensaio preliminares de toxicidade frequentemente utilizam organismos simples, como *Artemia salina*, sendo esses ensaios indispensáveis para investigar compostos com potencial atividade biológica e para guiar o fracionamento em estudos fitoquímicos ou de produtos naturais (Ferreira *et al.*, 2017).

Deste modo, os ensaios biológicos servem como teste preliminar para nortear próximos passos de estudos com extratos vegetais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades antibacteriana e citotóxica das folhas da espécie *Aeschynomene americana*.

3.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

- ✓ Isolar e identificar compostos presentes nas frações de *Aeschynomene americana*;
- ✓ Avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) quanto Gram-negativas (*Escherichia coli*).
- ✓ Verificar citotoxicidade *in vitro* de amostras e frações em linhagens de células tumorais e não tumoral.
- ✓ Avaliar a bioatividade de extratos de *Aeschynomene americana* em ensaio de toxicidade para náuplios de *Artemia salina*.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

O material botânico foi triturado em um Moinho de facas tipos willey da marca MA-580. As extrações e purificações, foram realizadas com a utilização de reagentes comerciais com diferentes graus de pureza (P.A., 96-99%) e com purificações prévias. Os solventes foram removidos das amostras com o uso de um rota-evaporador (IKA® RV3 eco), com uma bomba de alto vácuo SL 62 (SOLAB).

Tabela 1 - Reagentes utilizados

| Reagente | Marca |
|-----------------------|--------------|
| Acetato de etila PA | Neon |
| Diclorometano PA | Neon |
| Etanol PA | synth e Neon |
| Metnol PA | Êxodo |
| Hexano PA | Neon |
| Clorofórmio deuterado | Merck |
| Metanol deuterado | Merck |
| Vanilina ácida | - |

O monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado em cromatoplasacas de alumínio recobertas de sílica GF₂₅₄ (Sigma Aldrich). Como agentes reveladores foram empregados: luz ultravioleta (U.V.) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm (câmara Prodicil), vapores de iodo e vanilina sulfúrica. Foram adotados diversos solventes como eluentes como por exemplo: acetato de etila, hexano, metanol, em diversas proporções.

Tabela 2 - Materiais utilizados

| Material | Marca |
|--|----------------|
| Celulose microcristalina D | Loba Chemie |
| Sílica gel 70-230 <i>mesh</i> | Macherey-Nagel |
| Cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 F254 | Macherey-Nagel |
| Lâmpada UV (254 e 365 nm) | Vilber Lourmat |

Os compostos isolados foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN), no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em um espectrômetro Bruker Avance III (11, 75T), com sondas utilizadas (ATB e SW), 5 mm de diâmetro interno, à temperatura ambiente e com pulso de 45°. A frequência utilizada para o RMN de ¹H foi de 500 MHz e para o RMN ¹³C foi de 125 MHz. Os compostos foram solubilizados em solventes deuterados: dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) ou clorofórmio (CDCl₃).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS), as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para a multiplicidade dos sinais foram aplicadas algumas abreviaturas, sendo elas: *s*-simpleto, *d*-duplete, *t*-triplete, *q*-quadruplete, *dd*-duplo duplete e *m*-multiplete ou não resolvido.

4.2 MATERIAL BOTÂNICO

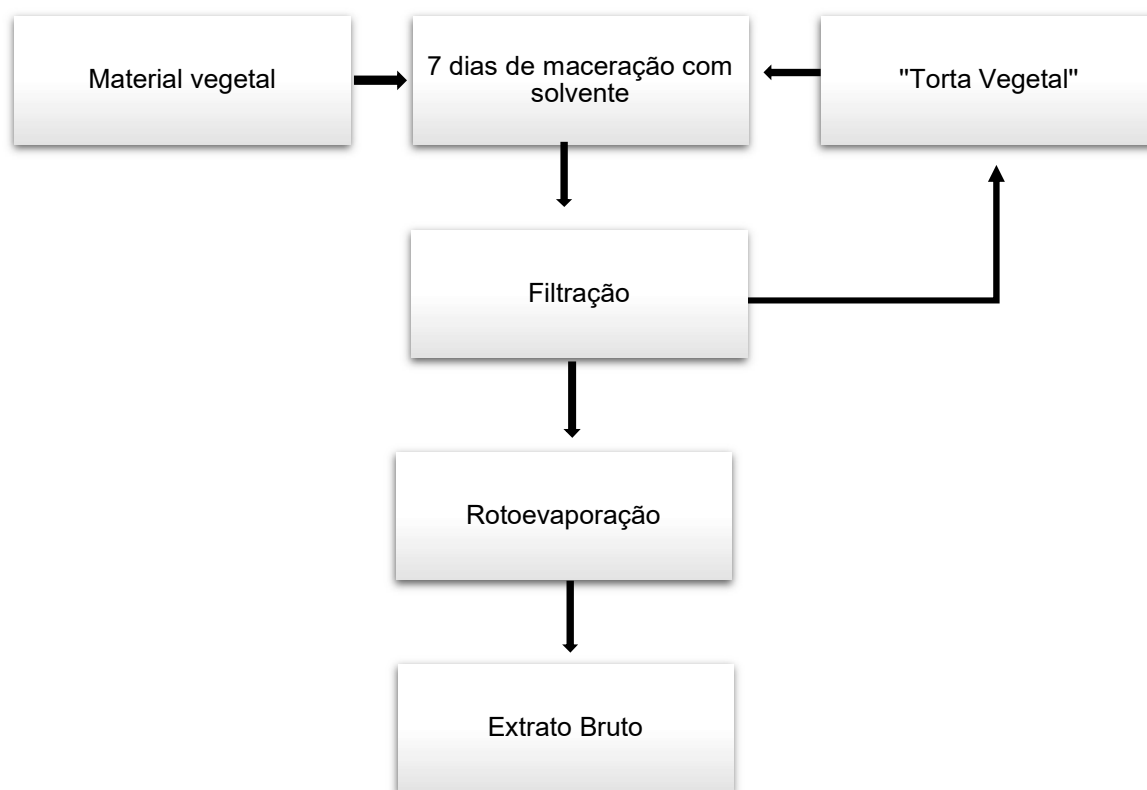
A planta *Aeschynomene americana* foi coletada em abril de 2023, localizada no Campus da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO: latitude 16°22'49"S, longitude 48°56'51"O, 1112 metros de altitude; A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (número AC59619). A identificação do material vegetal foi feita pela Profa. Dra. Mirley Luciene dos Santos e as exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás (registro HUEG 16.339).

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

O material foi seco por 26 dia em ar livre. Posteriormente, realizou-se a separação das folhas que foram pulverizadas em moinho de facas. Foi realizado a maceração do material moído com etanol 95,0% à temperatura ambiente durante sete dias e submetida a evaporação do solvente em rotaevaporador.

O resíduo vegetal resultante (torta vegetal) foi extraído por mais três vezes de maneira análoga à descrita anteriormente, conforme representado no esquema abaixo:

Figura 11 - Esquema de obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de *Aeschynomene americana*

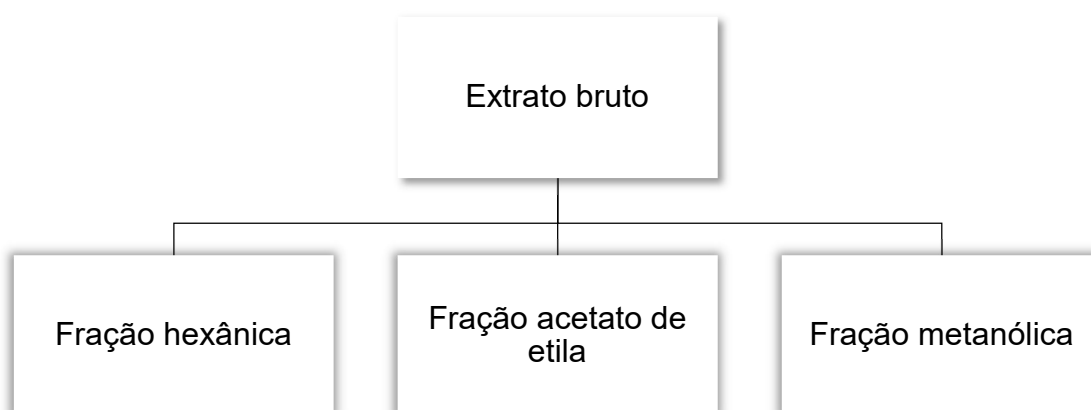


Fonte: Autor

4.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

Adicionou-se ao extrato bruto etanólico das folhas, celulose microcristalina D, mistura que foi fracionada por meio de filtração a vácuo, utilizando-se como eluentes, os seguintes solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. Após o fracionamento, os solventes foram rotaevaporados, originando as frações hexânica (AAFE-H), acetato de etila (AAFE-A) e metanólica (AAFE-M) das folhas, conforme a figura abaixo:

Figura 12 - Esquema do fracionamento do extrato etanólico das folhas



Fonte: Autor

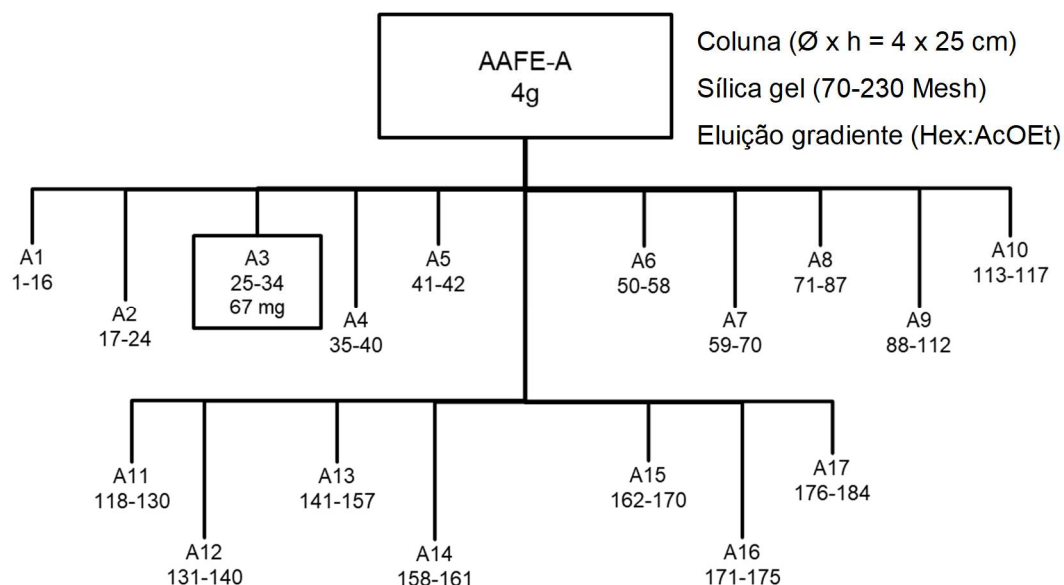
4.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aeschynomene americana*

Para realização do isolamento dos constituintes químicos de *Aeschynomene americana* foram utilizadas técnicas cromatográficas, conforme descrito nas seções seguintes, as quais estão organizadas de modo a apresentar as etapas do estudo fitoquímico das folhas de *Aeschynomene americana*.

4.5.1 Estudo fitoquímico de AAFE-A

Parte da fração de acetato de etila das folhas (4g) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna ($\varnothing \times h = 4 \times 25$ cm) utilizou sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária e eluição gradiente com hexano:acetato de etila nas proporções de (9:1/8:2/7:3/1:1/3:7 e acetato de etila (100%). Foram obtidas 183 frações, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCD, foram reunidas em 17: A1 - A17 conforme Figura 13, já as frações (43 a 49) não foram reunidas por não apresentarem semelhança no teste realizado através da CCD.

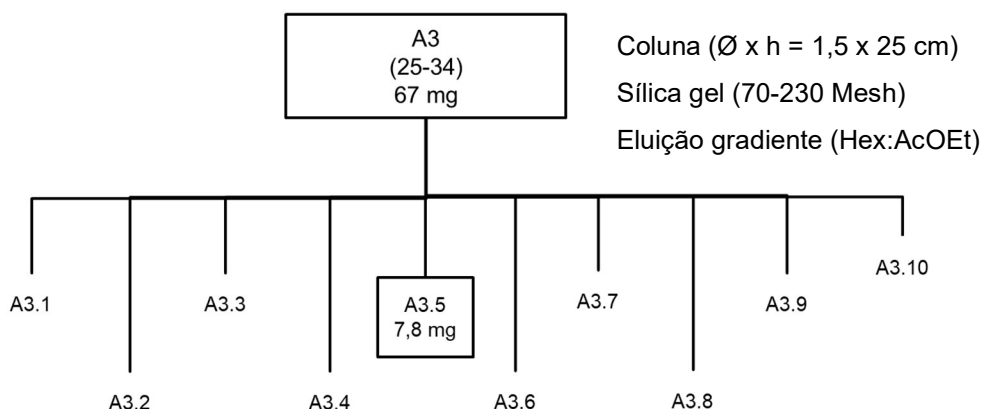
Figura 13 - Fluxograma de refracionamento da fração de acetato de etila das folhas de *Aeschynomene americana*



Fonte: Autor

4.5.1.1 Isolamento da substância (I)

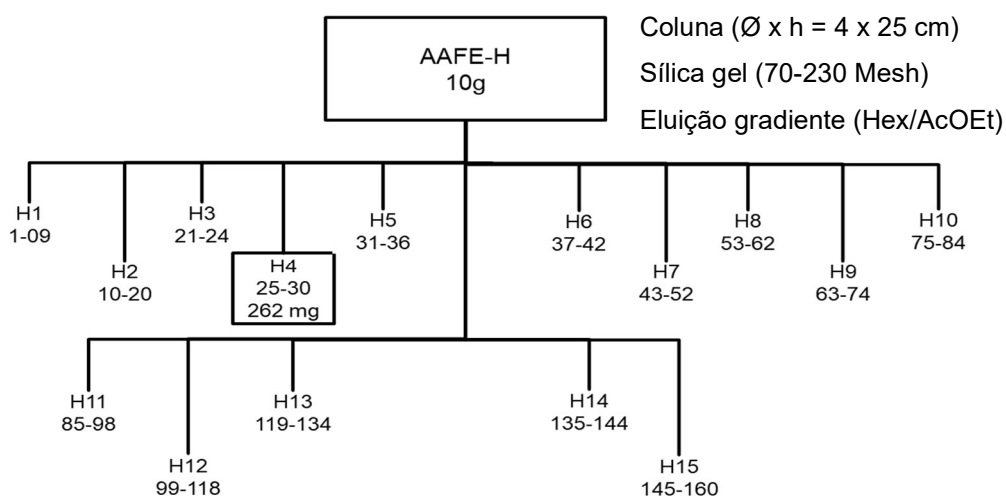
A fração A3 (67 mg) foi recromatografada em coluna de vidro (Ø x h = 1,5 x 25 cm) com sílica gel (70-230 Mesh) e eluição gradiente com hexano:Acetato de etila (8:2/7:3/5/1:1). Foram obtidas 10 frações. A fração A3.5 (7,8 mg) mostrou uma única mancha na CCDA, que apresentou coloração verde ao ser revelada com vanilina ácida e foi identificada por RMN de ^1H , HSQC e HMBC como sendo a substância (I). A Figura 14, apresenta um fluxograma do processo de isolamento desta substância (I).

Figura 14 - Fluxograma do isolamento da substância (I)

Fonte: Autor

4.5.2 Estudo fitoquímico de AAFE-H

Parte da fração de hexano das folhas (10 g) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna (Ø x h = 4 x 25 cm) utilizando sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária e eluição gradiente com hexano:acetato de etila nas proporções de (9:1/8:2/7:3/6:4/1:1/3:7 e acetato de etila (100%). Foram obtidas 160 frações, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCD, foram reunidas em 15: H1 - H15 conforme Figura 15.

Figura 15 - Fluxograma de refração da fração hexânica das folhas de *Aeschynomene americana*

Fonte: Autor

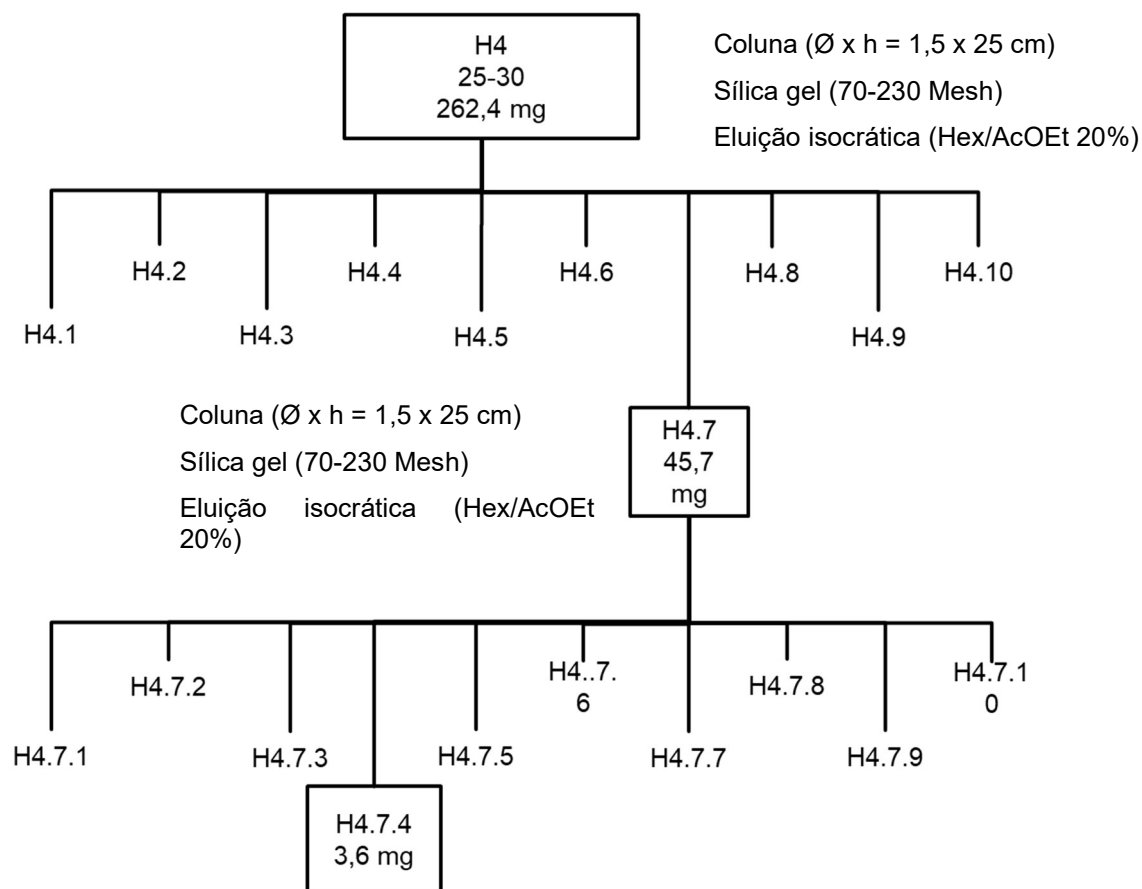
4.5.2.1 Isolamento das substâncias (II), (III) e (IV)

A fração H4 (262,4 mg) foi recromatografada em coluna de vidro ($\varnothing \times h = 1,5 \times 25$ cm) com sílica gel (70-230 Mesh) e eluição isocrática com hexano:acetato de etila (8:2). Foram obtidas 10 subfrações: H4.1 – H4.10.

A fração H4.7 (45,7 mg) foi recromatografada em coluna de vidro ($\varnothing \times h = 1,5 \times 25$ cm) com sílica gel (70-230 Mesh) e eluição isocrática com hexexano:acetato de etila (8:2). Foram obtidas 10 frações: H4.7.1 – H4.7.10.

A fração H4.7.4 (3,6 mg) mostrou uma única mancha na CCD, que apresentou coloração roxa ao ser revelada com vanilina ácida e identificada por RMN de ^1H , HSQC e HMBC como sendo a substância (II), (III) e (IV). A Figura 16 apresenta um fluxograma do processo de isolamento desta substância.

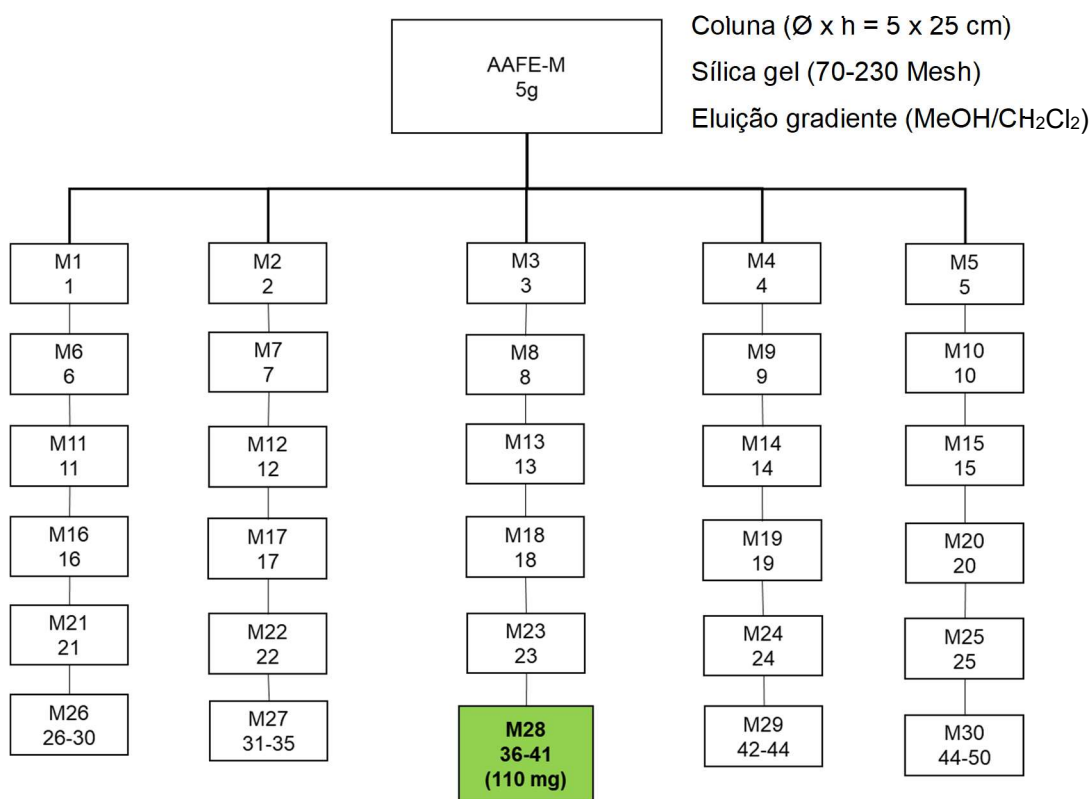
Figura 16 - Fluxograma do isolamento da substância (II)



4.5.3 Estudo fitoquímico de AAFE-M

Parte da fração de metanol o das folhas (5g) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna ($\varnothing \times h = 5 \times 25$ cm) utilizando sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária e eluição gradiente com diclorometano:metanol nas proporções de (9:1/8:2/7:3/6:4/1:1/3:7 e metanol (100%). Foram obtidas 50 frações, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCD, foram reunidas e identificadas em 30: M1 – M30.

Figura 17 - Fluxograma de refracionamento da fração metanólica das folhas de *Aeschynomene americana*

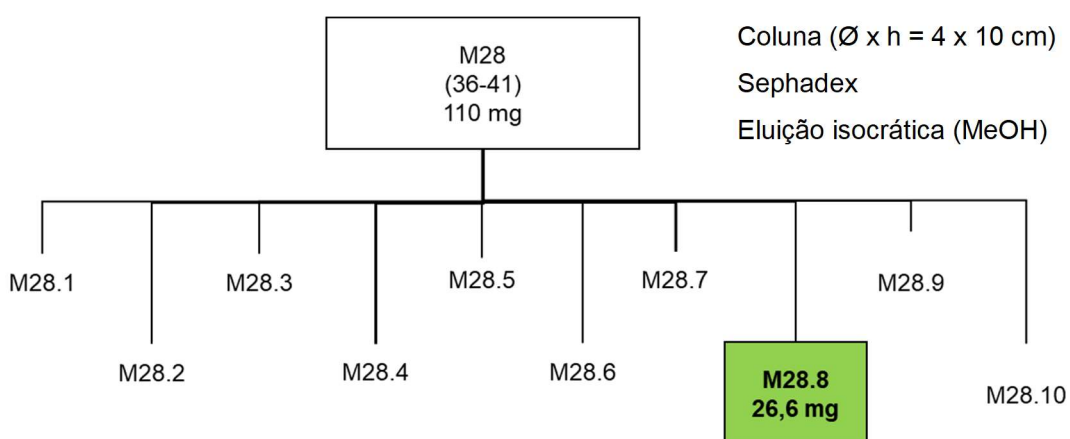


Fonte: Autor

4.5.3.1 Isolamento da substância V

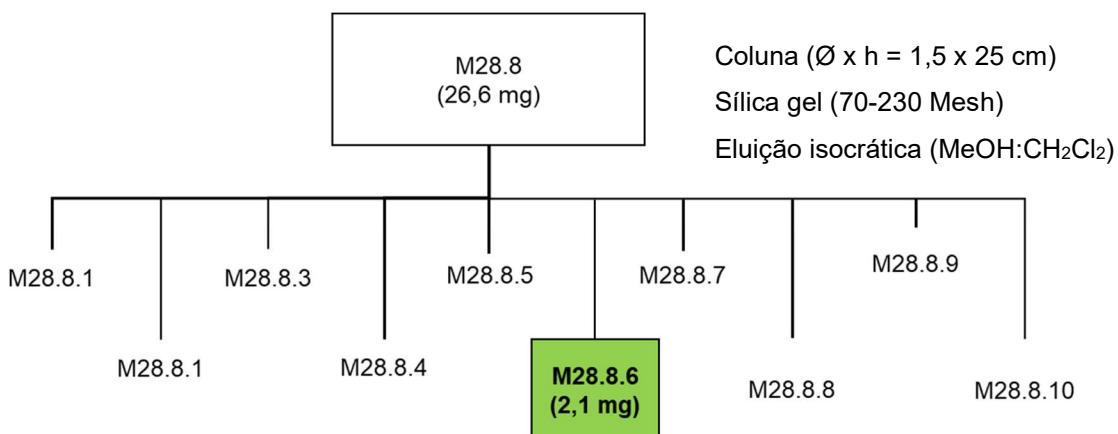
A fração M28 (110 mg) foi recromatografada em coluna de vidro ($\varnothing \times h = 4 \times 10$ cm) com sephadex e eluição isocrática com metanol. Foram obtidas 10 subfrações: M28.1 – M28.10.

Figura 18 - Fluxograma do isolamento da substância V



A fração M28.8 (26,6 mg) apresentou-se cristais impuros e foi recromatografada em coluna de vidro ($\varnothing \times h = 2 \times 25$ cm) com sílica gel (70-230 Mesh) e eluição isocrática com metanol e diclorometano (80:20). Foram obtidas 10 frações: M28.8.1 – M28.8.10.

Figura 19 - Fluxograma do isolamento da substância V



A fração M28.8.6 (2,1mg) mostrou uma única mancha na CCD, que apresentou coloração amarela ao ser revelada com vanilina ácida e identificada por RMN de ^1H , HSQC e HMBC como sendo a substância (**V**).

4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

O extrato bruto e as frações das folhas e do caule de *Aeachynomene americana* foram testados quanto ao potencial antibacteriano e citotóxico, conforme descrito nas seções seguintes.

4.6.1 Avaliação da atividade antibacteriana

A determinação da atividade antimicrobiana do extrato foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme o protocolo recomendado pela *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testes de susceptibilidade antimicrobiana por diluição de agentes antimicrobianos em caldo (CLSI, 2016). Foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) mantidas no Laboratório de Microbiologia da (UEG), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Microrganismos utilizados na determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

| Microrganismos | | ATCC |
|----------------|------------------------------|-------|
| Gram (+) | <i>Staphylococcus aureus</i> | 25923 |
| Gram (-) | <i>Escherichia coli</i> | 25312 |

Para a realização do experimento as amostras foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e diluídos em caldo Mueller Hinton MH para obtenção de uma solução-estoque de concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo posteriormente diluída para as concentrações 2000, 1000, 500, 250 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U” foram colocados 50 μL /poço de caldo MH com inóculo bacteriano a 1×10^6 UFC. mL^{-1} e 50 μL por poço da amostra diluída em MH, de modo que as concentrações finais das amostras foram 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O antibiótico cloranfenicol nas concentrações 64, 32, 16, 8, 4 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi utilizado como controle de técnica para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CLSI, 2016). Para controle de viabilidade foram utilizados caldo MH estéril (100 μL por poço) e caldo MH estéril com 5% de DMSO (100 μL por poço), além das amostras nas concentrações testadas.

As microplacas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 10 μL de resazurina sódica a 0,01% em cada poço, e após 30 minutos de incubação a 35 °C foi realizada a leitura visual dos resultados. O predomínio da cor azul foi considerado indicativo de inibição do crescimento bacteriano e o predomínio do vermelho rosáceo indicou a atividade metabólica devido ao crescimento bacteriano. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração do composto, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano visível a olho nu.

A determinação da concentração mínima bactericida (CMB) consistiu em avaliar a concentração subsequente àquela onde se observou CMI, através de semeadura em placa com ágar MH e incubação da placa a 35 °C por 24 horas. Após incubação, foi verificado se houve ou não crescimento de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2 Avaliação da atividade citotóxica

O extrato e as frações das folhas foram submetidos à avaliação da citotoxicidade *in vitro* em quatro linhagens de células tumorais e uma não tumoral, conforme descrito na (**Tabela 4**), no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 4 - Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade

| + | Marca/Modelo |
|---------|-------------------------|
| SNB-19 | Astrocitoma |
| HCT-116 | Carcinoma de cólon |
| PC-3 | Carcinoma de próstata |
| HL-60 | Leucemia promielocítica |
| L-929 | Fibroblasto murinho |

Fonte: o Autor

As linhagens tumorais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), e a não tumoral pelo Banco de células do Rio de Janeiro- BCRJ. As células SNB-19, HCT-116, PC3 foram cultivadas meio RPMI 1640 e L929 em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos obtido de GIBCO Laboratories (NY, USA), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As substâncias foram solubilizadas em DMSO (Dimetilsulfóxido) e os testes foram realizados na concentração de 100 µg/mL para extratos e 50 µg/mL para frações. As amostras foram sonicadas por cerca de 40 minutos para completa solubilização.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT foi realizada seguindo o método de Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas nas concentrações de 0,7 x 10⁵ céls/mL (HCT-116 e L929), 0,1 x 10⁶ céls/mL (SNB-19, e PC3) e 0,3 x 10⁵ céls/mL (HL60). As placas foram incubadas com a substância por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, elas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 8.0.1* e a concentração inibitória média – CI_{50} foi realizada por regressão não linear.

4.6.3 Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*

Para realização do ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, amostras do extrato etanólico das folhas e das frações hexânica, metanólica e acetato de etila foram testadas nas concentrações de 125, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os controles de viabilidade utilizados foram solução salina 36,5 g.L^{-1} em 5% de DMSO e como controle de letalidade foi utilizado o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nas diluições 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluídas na solução salina 36,5 g.L^{-1} . Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Meyer *et al.* (1982) e adaptado por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006). Foram empregados o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho 36,5 g em 1 L de água destilada. O pH da solução salina foi controlado através do pHmetro na faixa entre 8,4 - 8,8 tornando ideal para que as larvas de *Artemia salina* sobrevivam.

Em funil de decantação os ovos e *Artemia salina* foram incubados por 36 horas em 1 litro da solução salina 36,5 g.L^{-1} com iluminação artificial, temperatura ambiente (20-25°C) e oxigenação constante, assim promoveu a eclosão dos cistos e liberação dos náuplios.

Após a eclosão, 10 ± 1 náuplios foram atraídos, coletados e transferidos para cada tudo de ensaio contendo 2 mL das amostras do extrato, Frações, controle de viabilidade e controle de letalidade.

Os tubos contendo as amostras e 10 ± 1 de larvas foram deixados na presença de luz visível em repouso e descobertos à temperatura ambiente por 24 horas. Após este tempo, efetuou-se a contagem do número de larvas vivas e mortas em cada tubo de ensaio. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos.

Os valores de CL_{50} foram obtidos a partir da regressão linear obtida da relação entre a porcentagem de náuplios mortos e a concentração dos extratos. Para tanto, foi utilizado o método *PROBIT* de análise, através do *software* *STATPLUS®*.

A classificação da toxicidade do extrato e das frações foi realizado segundo classificação de Dolabela (1997) em que valores de $DL_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram considerados de forte toxicidade, DL_{50} entre $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de toxicidade moderada; DL_{50} entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de baixa toxicidade e $DL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram considerados não tóxicos.

Tabela 5 - Classificação da toxicidade

| Valores DL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Toxicidade |
|---|------------|
| 100 | Forte |
| 100 – 500 | Moderada |
| 500 – 1000 | Baixa |
| 1000 | Não toxico |

Fonte: O Autor

5 RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES

O material vegetal utilizado no preparo do extrato bruto de *Aeschynomene americana*, quantidade de solvente utilizado na extração e a massa de extrato obtida está descrita na (Tabela 6).

Tabela 6 - Massa do material vegetal, volume do solvente e quantidade do extrato obtido

| Material vegetal seco (g) | Solvente (L) | Massa do extrato obtida (g) | Rendimento (%) | Código |
|------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------|--------|
| Folhas (730) | Etanol (20) | 74,5 | 10,2 | AAFE |

AAFE – *A. americana* – folha – etanol

Fonte: O Autor

Após o fracionamento de parte do extrato das folhas (70g) de *Aeschynomene americana*, conforme apresentado na Tabela 7, foram obtidas três frações: hexânica (AAFE-H), em acetato de etila (AAFE-A) e metanólica (AAFE-M).

Tabela 7 - Massas obtidas e volume de solvente gasto no fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de *Aeschynomene americana*

| Extrato (g) | Solvente (L) | Massa obtida (g) | Rendimento (%) | Código |
|-------------|-----------------------|---------------------|----------------|--------|
| Folhas (70) | Hexano (15) | 26,7 | 38,1 | AAFE-H |
| | Acetato de etila (15) | 5,3 | 7,6 | AAFE-A |
| | Metanol (15) | 35,5 | 50,7 | AAFE-M |

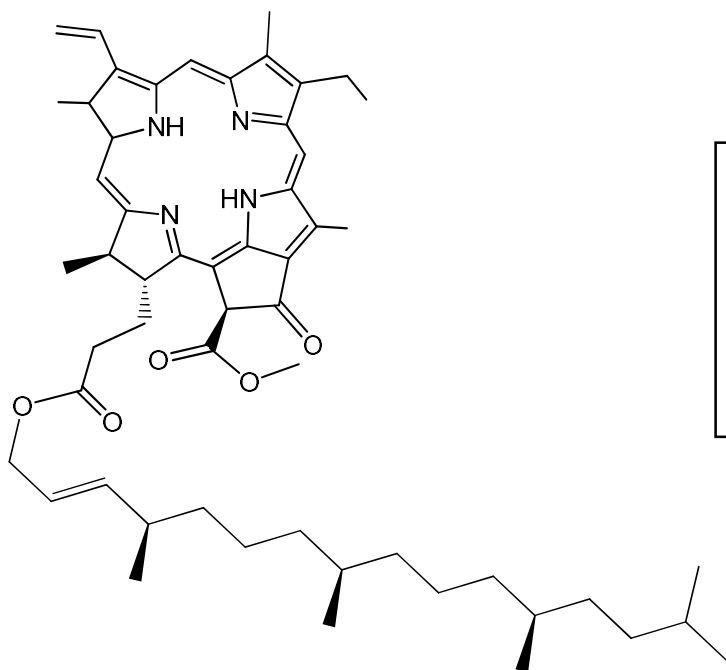
AAFE-H = *A. americana* - folhas - etanol - fração hexânica. AAFE-A = *A. americana* - folhas - etanol - fração em acetato de etila. AAFE-M *A. americana* - folhas - etanol - fração metanólica.

Fonte: O Autor

5.2 SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

O estudo fitoquímico de *Aeschynomene americana*, levou à identificação de cinco substâncias conforme a Figura 20.

Figura 20 - Representação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *Aeschynomene americana*



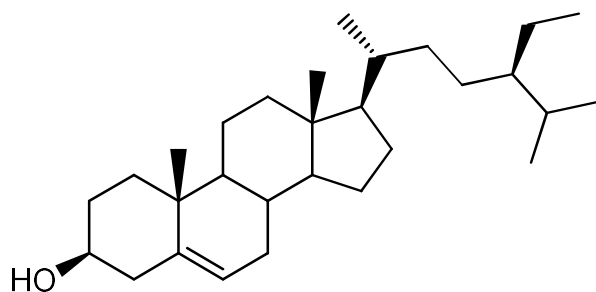
Feofitina A (I)

Procedência: fração acetato de etila das folhas

Massa: 7,8 mg

Isolamento: página 34

Identificação: página 46



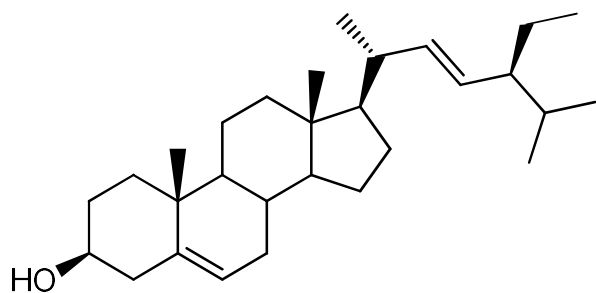
β -sitosterol (II)

Procedência: fração hexânica das folhas

Massa: 3,6 mg (em mistura)

Isolamento: página 36

Identificação: página 58



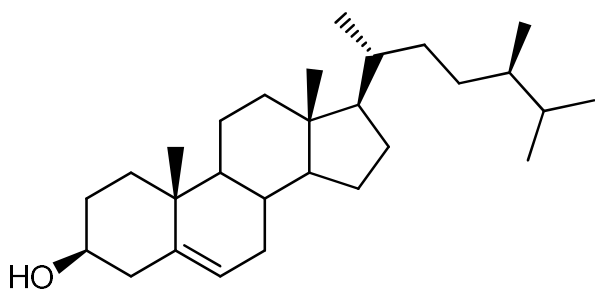
Stigmasterol (II)

Procedência: fração hexânica das folhas

Massa: 3,6 mg (em mistura)

Isolamento: página 36

Identificação: página 58

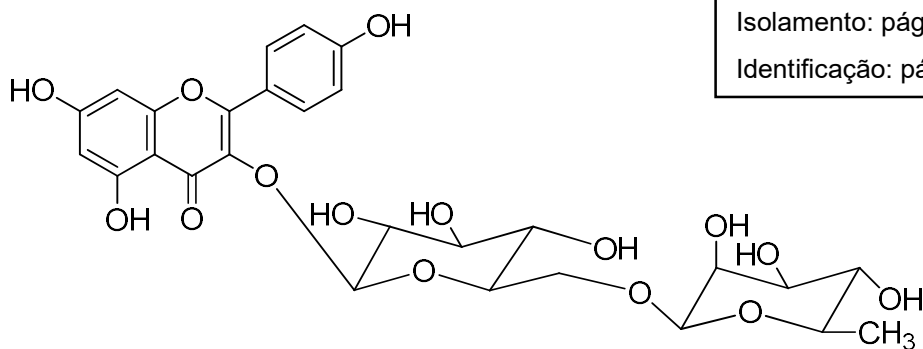

Campesterol (IV)

Procedência: fração hexânica das folhas

Massa: 3,6 mg (em mistura)

Isolamento: página 36

Identificação: página 58


Kaempferol-3-Rutinosídeo (V)

Procedência: fração metanólica das folhas

Massa: 2,1 mg

Isolamento: página 38

Identificação: página 62

Fonte: O Autor

5.2.1 Identificação do Clorofilóide

5.2.2 Identificação da feofitina A, substância (I)

A feofitina A é uma substância formada a partir da clorofila A, após a perda do magnésio que normalmente está presente no centro da molécula. Apesar dessa modificação, ela ainda conserva parte da estrutura da clorofila, incluindo uma cauda longa chamada fitol, que a mantém ligada às membranas das células vegetais. Essa molécula tem um papel importante no processo de fotossíntese, pois atua como a primeira receptora de elétrons logo após a absorção de luz no fotossistema II, ajudando a iniciar a cadeia de reações que convertem energia luminosa em energia química (Blankenship, 2014).

A identificação estrutural da substância analisada foi realizada por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando os experimentos unidimensionais de ^1H e os bidimensionais HSQC e HMBC em CDCl_3 , a 500 MHz. O espectro de RMN de ^1H revelou sinais característicos de prótons, observados nas regiões de δ 10,2 (H-10), 9,6 (H-5) e 8,8 ppm (H-20), compatíveis com prótons internos do anel tetrapirrólico presente em porfirinas e clorinas. Além disso, foram observados sinais vinílicos (H-3'(E), (Z) e 3¹ na região de δ 6,2 - 6,7 e 6,9 ppm, associados às duplas ligações laterais, estrutura lateral típica da feofitina A (Zhao *et al.*, 2014).

O espectro HSQC (Figura 24 e Figura 25) confirmou a correlação direta entre os prótons e seus carbonos ligados, permitindo a atribuição inequívoca de C-H em diversas posições da molécula. Destacam-se as correlações de H-13³ (δ 4,3 ppm) com C-13³ (δ ~63 ppm), bem como as de H-17 e H-18 (δ ~2,3 e 1,8 ppm) com C-17 e C-18 (δ ~29 e 20 ppm, respectivamente). A presença de múltiplas correlações na região de δ 0,8–1,6 ppm reforça a complexidade da cadeia lateral, composta por metilas e metilenos típicos de diterpenos como o fitol.

O espectro HMBC forneceu correlações de longo alcance entre os núcleos de hidrogênio e carbonos até três ligações de distância, permitindo a confirmação de conectividade entre diferentes fragmentos moleculares. Por exemplo, as correlações entre os prótons vinílicos H-3'(E) e (Z) com os carbonos C-2 e C-3 estabeleceram com clareza a extensão lateral do sistema conjugado.

A posição 2¹: $\delta_H = 3,40$ ppm, indica um ambiente onde o próton não está acoplado a outros próximos, possivelmente em um grupo metílico. Posição 3¹: $\delta_H = 7,95$ ppm (*dd*), indica próton em um ambiente aromático ou conjugado com duplo acoplamento, já na posição 3²: $\delta_H = 6,27$ ppm (*d*) e $6,17$ ppm (*d*), sugere dois prótons em um ambiente com acoplamento duplo, possivelmente em um sistema de ligação dupla conjugada. A Posição 17³: $\delta_C = 172,4$ ppm, correspondendo a um carbono em um grupo carbonílico conforme a (Figura 21 e Figura 22).

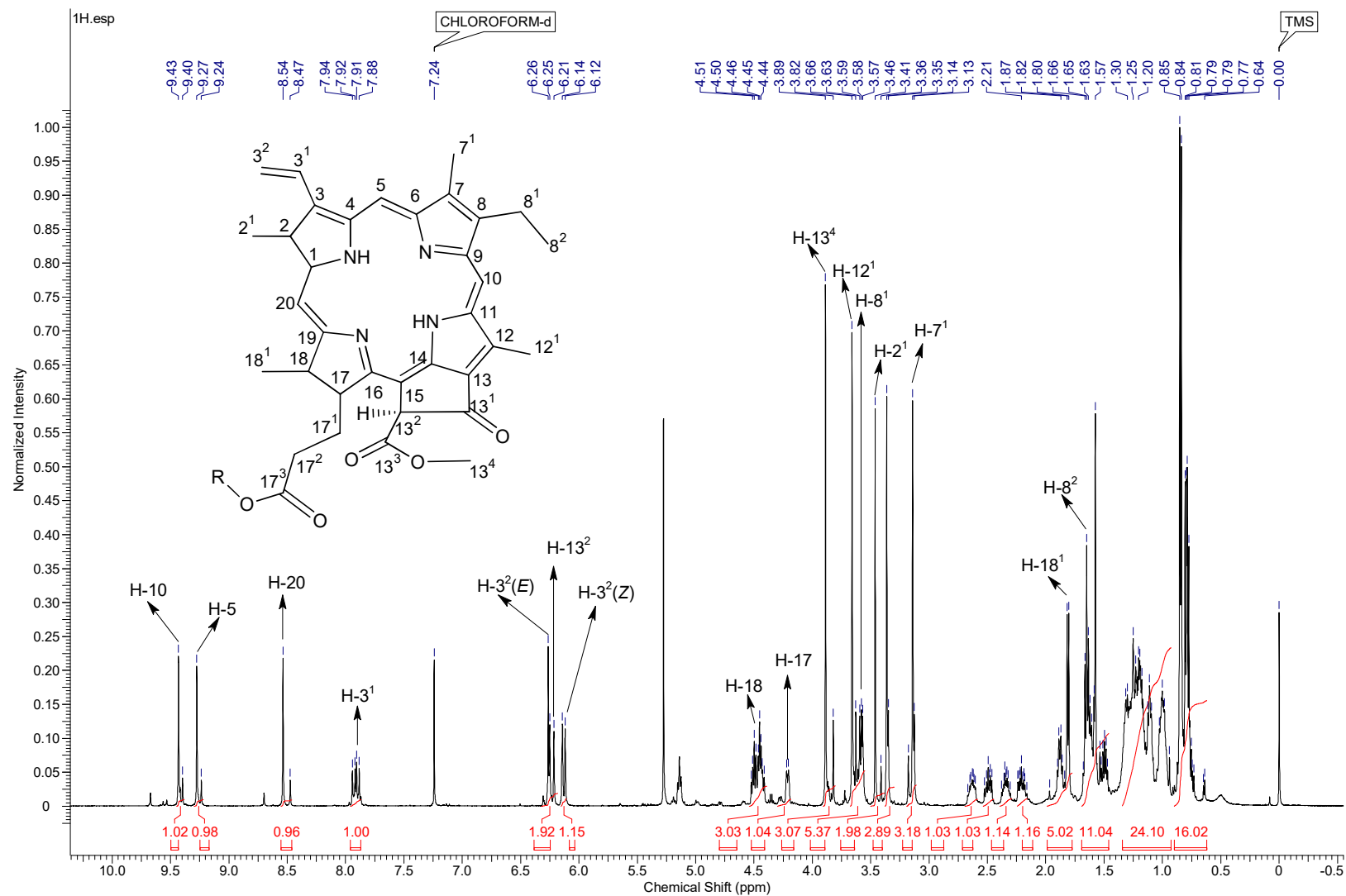
Os carbonos em Anéis Aromáticos normalmente encontrados entre 120-150 ppm, esses valores são comuns em carbonos envolvidos em anéis aromáticos, como os encontrados em feofitinas, estruturas relacionadas à feofitina. Grupos Metílicos (CH₃): geralmente se refletem em valores δ_C em torno de 15-40 ppm e δ_H em torno de 0,9-1,3 ppm. Os valores de deslocamento químico fornecidos na (Tabela 8) podem ser associados aos diferentes ambientes químicos encontrados em moléculas grandes e complexas como a feofitina.

Tabela 8 - Dados de ^1H -RMN (500 MHz), ^{13}C -RMN (125 MHz) (CDCl_3) para a substância I em comparação com os dados de RMN de ^1H -RMN (500 MHz), ^{13}C -RMN (125 MHz) (CDCl_3) de feofitina A

| Substância I | | | Teles, 2015 | | D'Abrasca <i>et al.</i> 2010 | | |
|-----------------|--|---------------------------|---|---------------------------|--|---------------------------|--|
| H/C | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | HMBC (H \rightarrow C) |
| 1 | - | 141,9 | - | 141,97 | - | 143,6 | - |
| 2 | - | 131,7 | - | 131,75 | - | 132,2 | - |
| 2 ¹ | 3,35 (s) | 11,8 | 3,39 (s) | 12,05 | 3,36 (s) | 12,0 | 1, 2, 3 |
| 3 | - | 136,2 | | 136,11 | | 137,7 | - |
| 3 ¹ | 7,94 (dd, J=17,8 e 11,5) | 128,9 | 7,95 (dd, J=17,85 e 11,48) | 129,97 | 7,96 (dd, 17,7 e 11,4) 6,22 dd (11,4 e 1,2) | 128,6 | 2, 3, 3 ² |
| 3 ² | 6,26 (trans) (d, J=17,65) e 6,14 (cis) (d, J=11,9) | 122,5 | 6,27 (trans) (d, J=17,95) e 6,18 (cis) (d, J=11,10) | 122,67 | 6,35 dd (17,7 e 1,2) | 123,5 | 3 ² 3 ² |
| 4 | - | 136,4 | - | 136,36 | - | 137,1 | - |
| 5 | 9,27 (s) | 97,2 | 9,35 (s) | 97,35 | 10,31 (s) | 101,5 | 4, 6 |
| 6 | - | 155,6 | - | 155,53 | - | 151,1 | - |
| 7 | - | 136,2 | - | 136,00 | - | 132,8 | - |
| 7 ¹ | 3,13 (s) | 11,8 | 3,19 (s) | 11,09 | 11,09 (s) | 187,7 | 6, 7 |
| 8 | - | 145,1 | - | 145,05 | - | 159,4 | - |
| 8 ¹ | 3,58 (m) | 19,5 | 3,63 (m) | 19,29 | 3,97 (q, 7,5) | 19,3 | 7, 8, 9 |
| 8 ² | 1,62 (m) | 17,1 | 1,66 (m) | 17,36 | 1,80 (t, 7,5) | 19 | 8 |
| 9 | - | 150,9 | - | 150,84 | - | 147,1 | - |
| 10 | 9,43 (s) | 104,1 | 9,51 (s) | 104,29 | 9,56 (s) | 106,9 | 8, 11 |
| 11 | - | 137,9 | - | 137,80 | - | 138,0 | - |
| 12 | - | 128,7 | - | 128,77 | - | 128,6 | - |
| 12 ¹ | 3,65 (s) | 11,8 | 3,69 (s) | 12,05 | 3,65 (s) | 12,2 | 11, 12, 13, 14 |
| 13 | - | 128,7 | - | 128,77 | - | 132,4 | - |
| 13 ¹ | - | 189,6 | - | 189,71 | - | 189,4 | - |
| 13 ² | 6,21 (s) | 64,6 | 6,30 (s) | 64,65 | 6,23 (s) | 64,5 | 13 ¹ , 13 ³ , 14, 15 |
| 13 ³ | - | 169,8 | - | 173,92 | - | 159,2 | - |
| 13 ⁴ | 3,82 (s) | 52,6 | 3,91 (s) | 52,87 | 4,31 (q, 6,3) | 66,8 | 13 ³ |

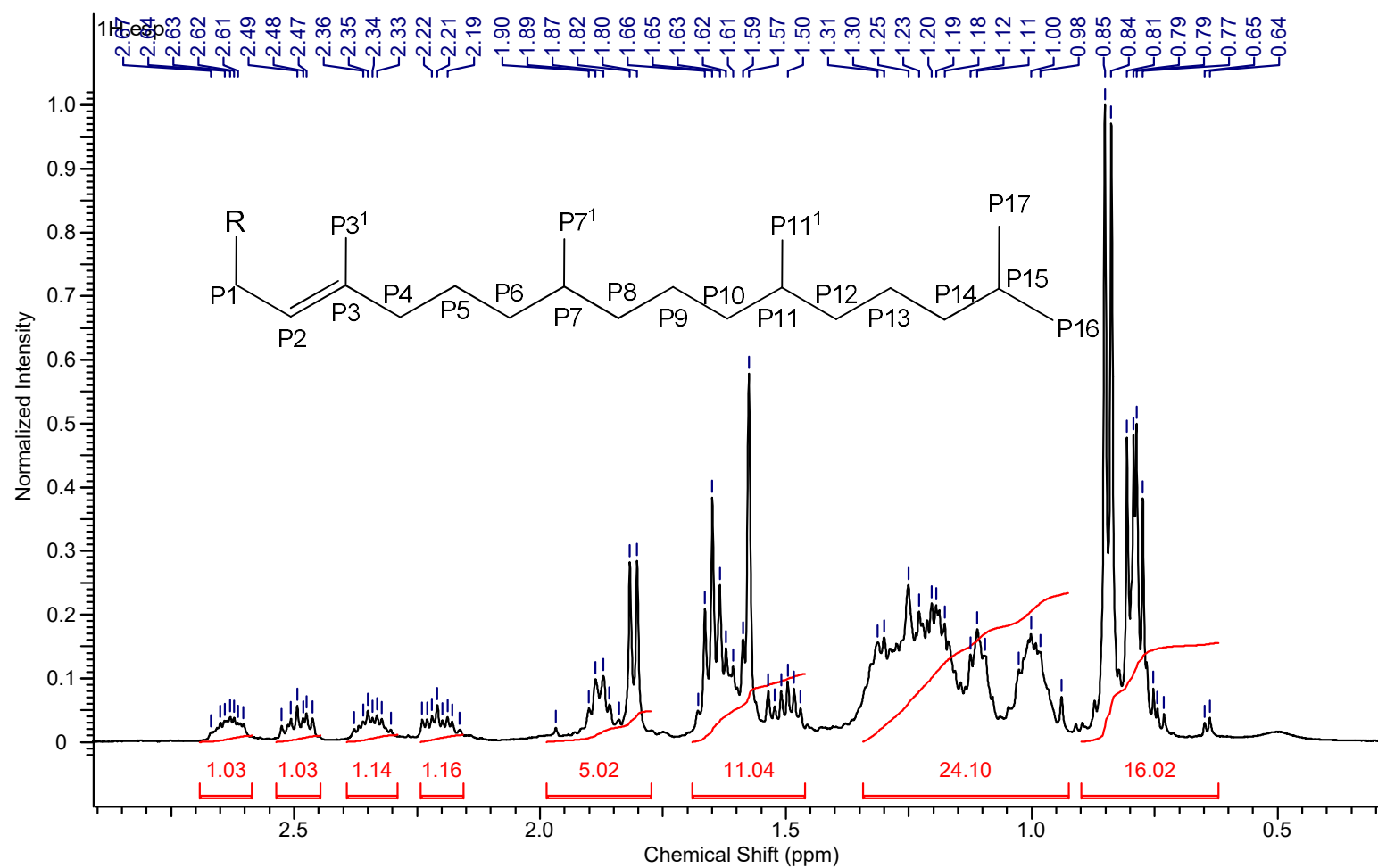
| | | | | | | | |
|------------------|----------|-------|----------|--------|----------------------|-------|--|
| 14 | - | 149,6 | - | 149,60 | - | 150,7 | - |
| 15 | - | 105,2 | - | 105,08 | - | 104,8 | - |
| 16 | - | 161,2 | - | 161,19 | - | 163,9 | - |
| 17 | 4,19 (m) | 50,8 | 4,15 (m) | 51,04 | 4,20 (m) | 51,2 | 17 ¹ , 17 ² , 18 |
| 17 ¹ | 2,60 | 30,2 | - | 29,67 | 2,55 (m) | 29,3 | 17 ² , 17 ³ |
| 17 ² | 2,46 | 31,1 | - | 30,06 | 2,32 (m) | 31,9 | 17 ³ |
| 17 ³ | - | 172,4 | - | 173,92 | - | 176,4 | - |
| 18 | 4,43 (m) | 50,0 | 4,34 (m) | 50,06 | 4,45 (dq, 7,5 e 1,8) | 50,1 | 17, 17 ¹ , 18 ¹ , 19 |
| 18 ¹ | 1,81 (d) | 23,0 | 1,84 (d) | 23,04 | 1,83 (t, 7,5) | 23,1 | 17, 18, 19 |
| 19 | - | 172,4 | - | 172,21 | - | 173,9 | - |
| 20 | 8,50 (s) | 93,0 | 8,60 (s) | 93,05 | 8,54 (s) | 93,4 | 1, 2, 19 |
| P1 | - | - | - | 62,07 | - | - | - |
| P2 | - | - | - | 117,62 | - | - | - |
| P3 | - | - | - | 142,84 | - | - | - |
| P4 | - | - | - | 39,75 | - | - | - |
| P5 | - | - | - | 25,58 | - | - | - |
| P6 | - | - | - | 37,32 | - | - | - |
| P7 | - | - | - | 32,70 | - | - | - |
| P8 | - | - | - | 37,25 | - | - | - |
| P9 | - | - | - | 24,37 | - | - | - |
| P10 | - | - | - | 37,19 | - | - | - |
| P11 | - | - | - | 32,55 | - | - | - |
| P12 | - | - | - | 37,25 | - | - | - |
| P13 | - | - | - | 24,82 | - | - | - |
| P14 | - | - | - | 39,30 | - | - | - |
| P15 | - | - | - | 27,92 | - | - | - |
| P16 | - | - | - | 22,67 | - | - | - |
| P17 | - | - | - | 22,55 | - | - | - |
| P11 ¹ | - | - | - | 19,62 | - | - | - |
| P7 ¹ | - | - | - | 19,68 | - | - | - |
| P3 ¹ | - | - | - | 16,25 | - | - | - |

Figura 21 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância I



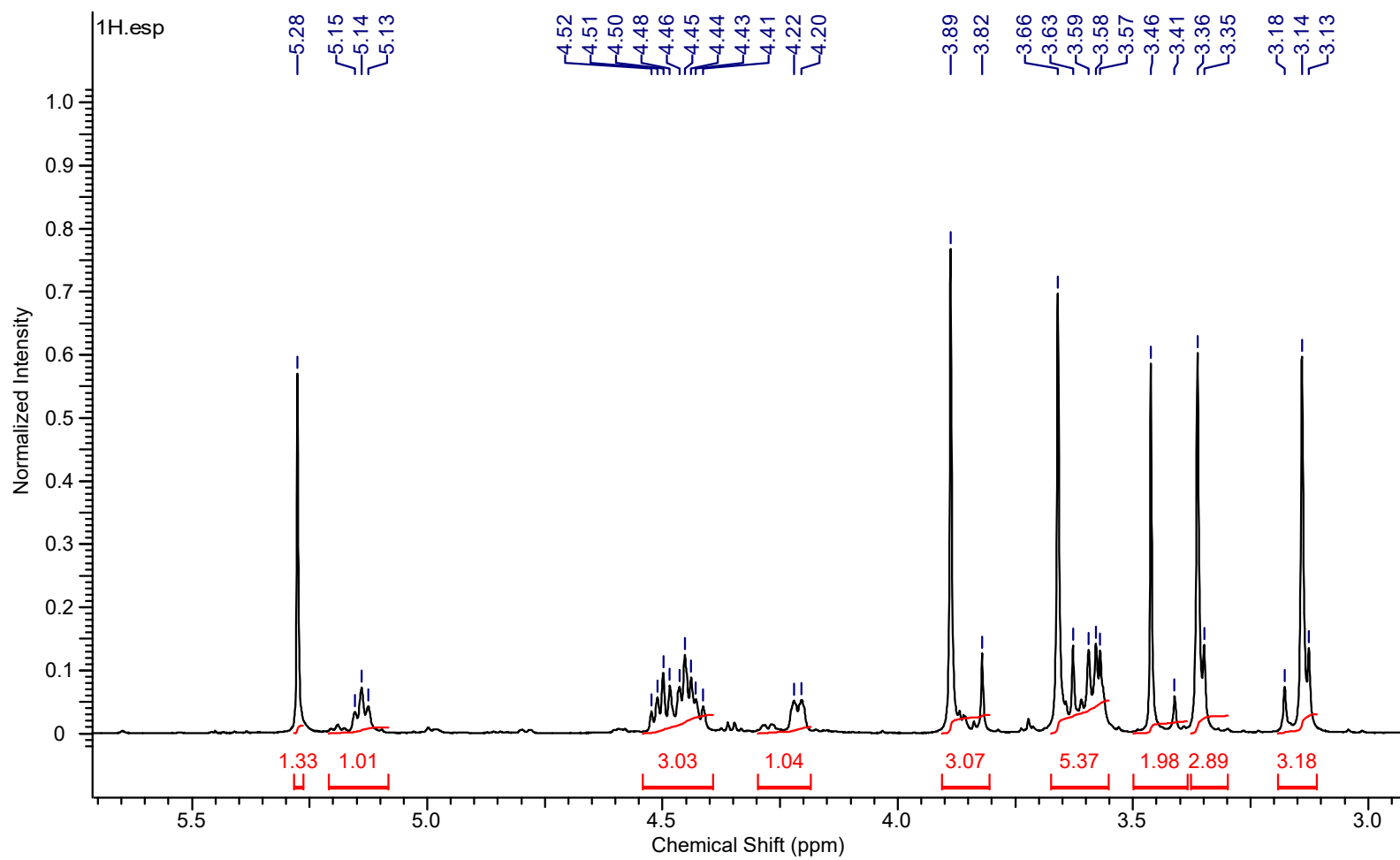
Fonte: O autor

Figura 22 - Ampliação do espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância **I**



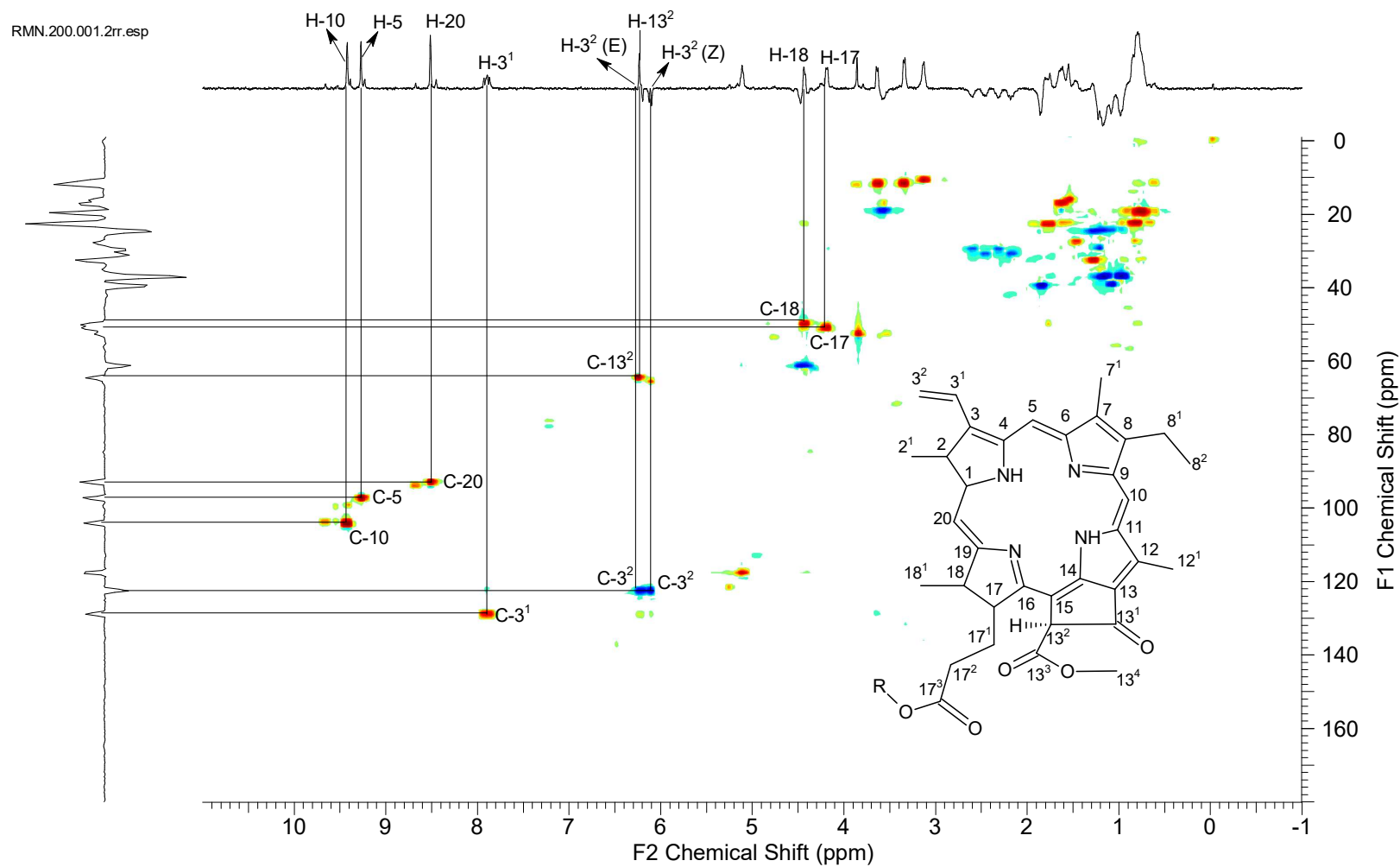
Fonte: O autor

Figura 23 - Ampliação do espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância **I**



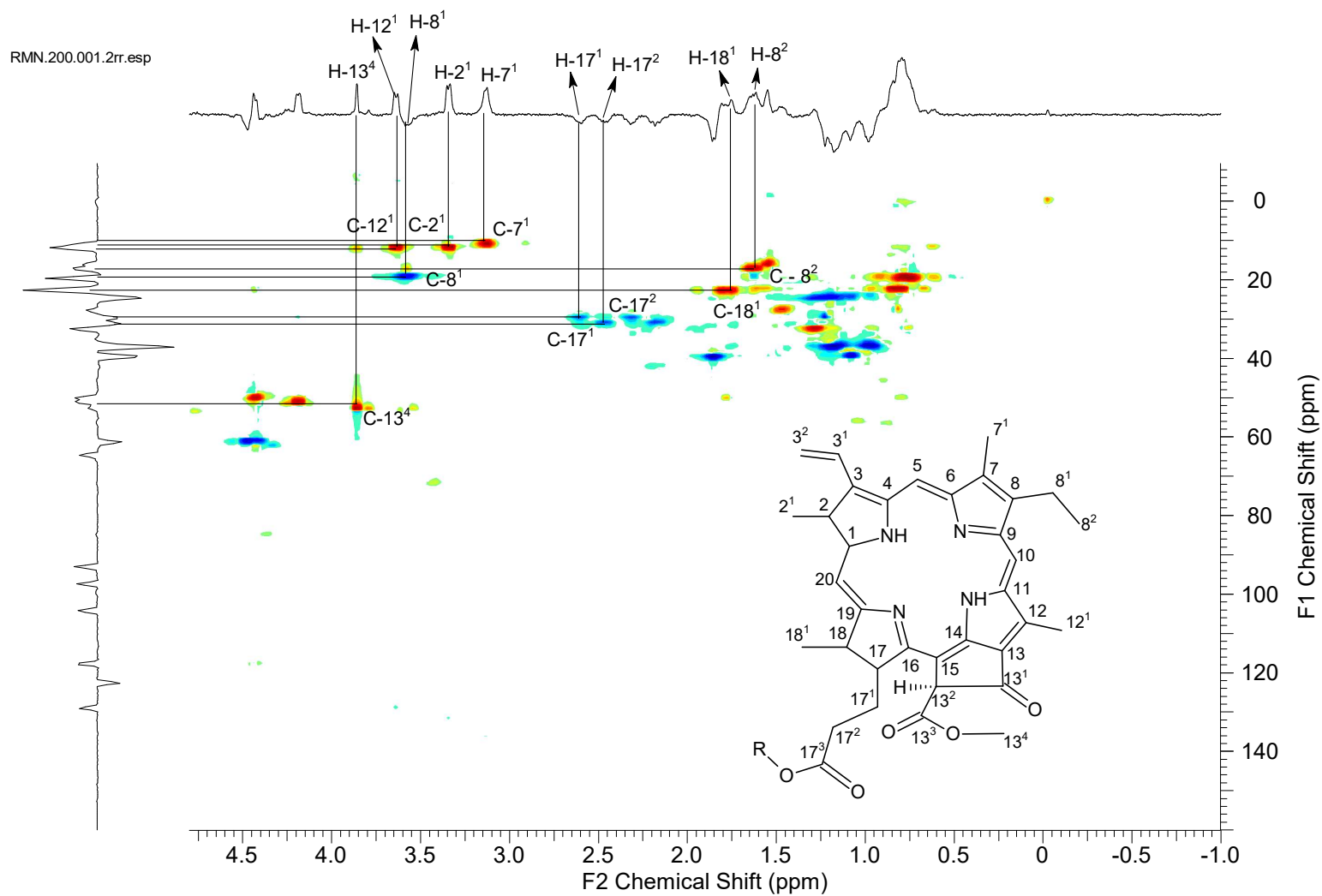
Fonte: O autor

Figura 24 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância **I** (500 MHz, CDCl_3)



Fonte: O Autor

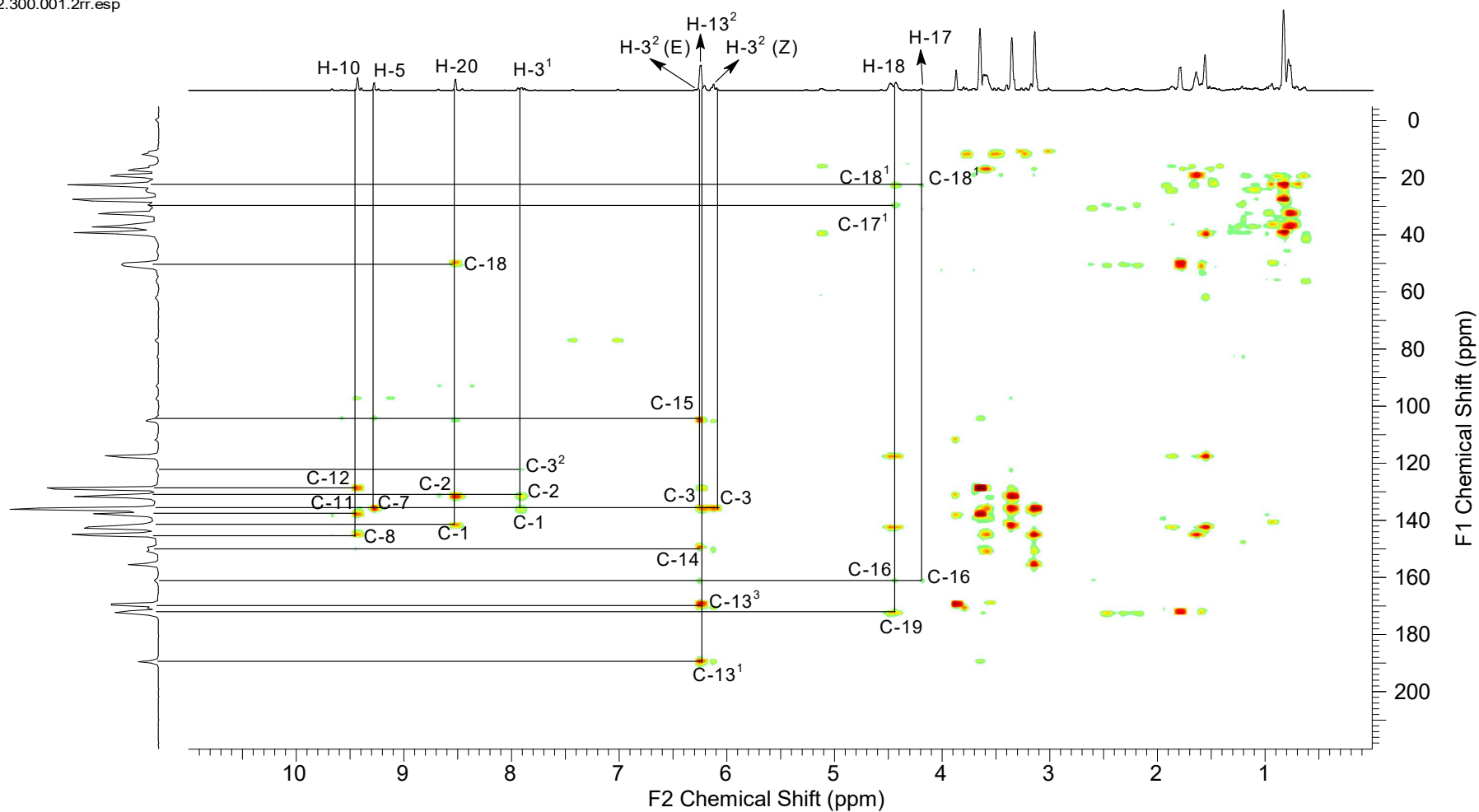
Figura 25 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância **1** (500 MHz, CDCl_3)



Fonte: O Autor

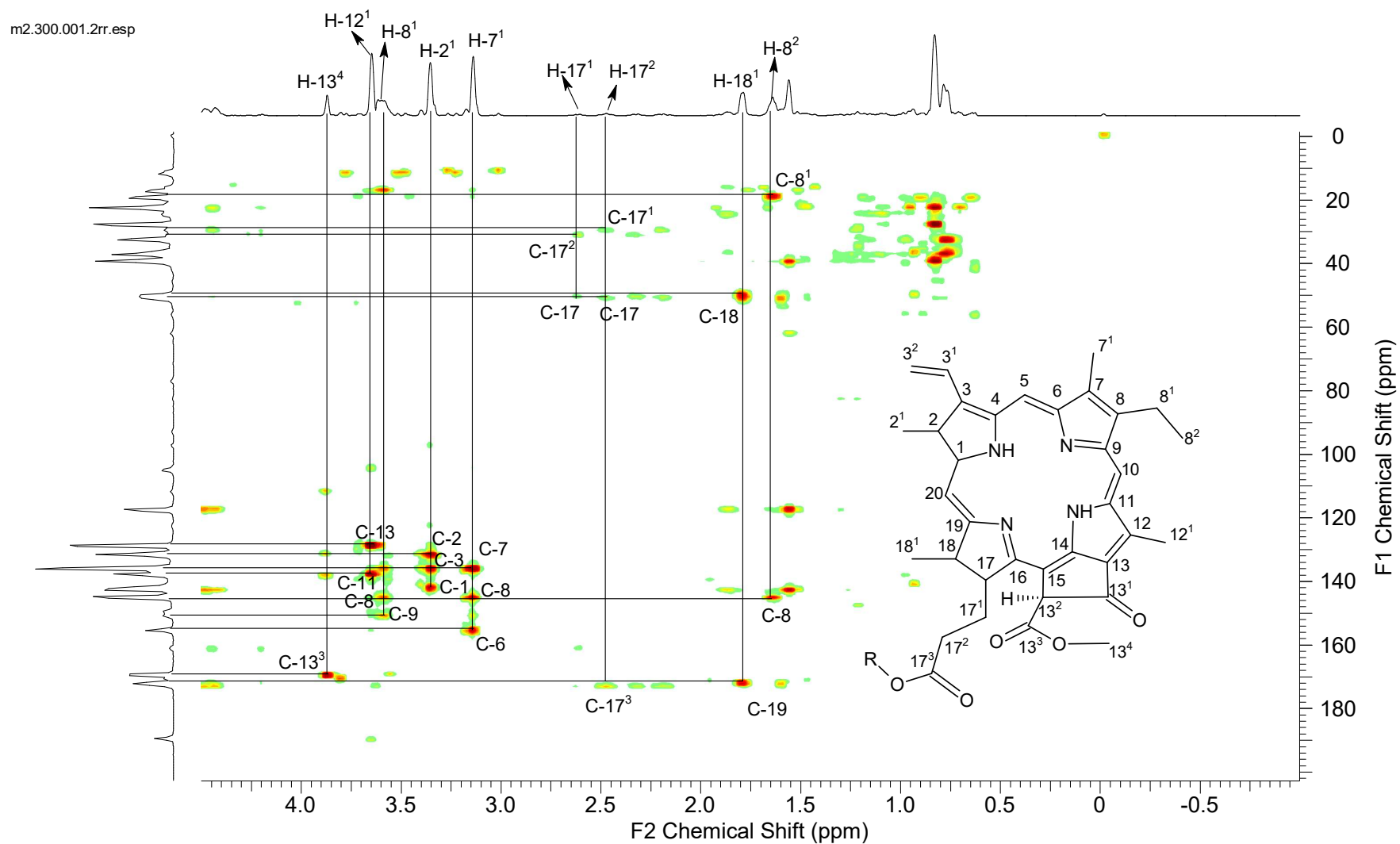
Figura 26 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMCB, da substância I (500 MHz, CDCl_3)

m2.300.001.2rr.esp



Fonte: O Autor

Figura 27 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMCB, da substância **I** (500 MHz, CDCl_3)



5.2.3 Identificação dos fitoesteróis

5.2.3.1 Identificação das substâncias (II), (III) e (IV)

A caracterização da amostra por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , associada aos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, permitiu a identificação de três fitoesteróis: β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (Tabela 9). A presença do campesterol foi sustentada principalmente pela ausência de correlação entre grupos metilênicos e grupos metila adicionais, o que excluiria a presença do etil em C-24 característico do β -sitosterol.

Os dados de RMN de ^1H (Figura 28) revelaram três prótons olefínicos nos deslocamentos químicos $\delta_{\text{H}} = 5,15$; $5,02$ e $5,35$ ppm, atribuídos às posições H-22, H-23 e H-6, respectivamente. Observou-se ainda um triplo de duplete de duplete em $\delta_{\text{H}} = 3,52$ ppm, correspondente ao próton H-3. Os sinais em $\delta_{\text{H}} = 1,25$; $0,69$; $1,17$; $0,82$; $0,92$ e $1,02$ ppm confirmaram a presença de seis grupos metila, associados às posições 18, 19, 21, 26, 27 e 29, em concordância com os dados da literatura.

A espectroscopia de RMN de ^{13}C (Figura 29) evidenciou três carbonos quaternários, onze grupos metileno, nove metinos e seis carbonos metílicos. Sinais característicos de duplas ligações foram observados para os carbonos C-5 e C-6 em $\delta_{\text{C}} = 140,8$ e $121,7$ ppm, respectivamente. O carbono angular C-18 foi identificado em $\delta_{\text{C}} = 12,1$ ppm, enquanto o carbono C-3, portador de grupo hidroxila, apresentou deslocamento em $\delta_{\text{C}} = 71,8$ ppm.

Um dos aspectos distintivos do estigmasterol é a ausência de sinais que indicariam grupos etilados em C-24, como ocorre no β -sitosterol, e a presença de correlações específicas dos grupos metila em C-26, C-27 e C-28, cujos deslocamentos químicos são consistentes com descrições conforme apontado por (Okoro *et al.*, 2017). Este conjunto de dados permite diferenciar com precisão o estigmasterol de seus análogos.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (II) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)

| H/C | Substância (II) | | Okoro <i>et al.</i> , 2017 | |
|-----|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
| 1 | | 37,3 | | 37,3 |
| 2 | | 31,7 | | 31,7 |
| 3 | 3,52 (<i>td</i> , J = 11,0; 4,2 e 3,8 Hz) | 71,8 | 3,54 (<i>td</i> , 1H) | 71,8 |
| 4 | | 42,3 | | 42,2 |
| 5 | | 140,8 | | 141,0 |
| 6 | 5,35 (<i>d</i> , J = 3,8 Hz) | 121,7 | 5,36 (<i>m</i> , 1H) | 121,7 |
| 7 | | 31,9 | | 31,9 |
| 8 | | 29,7 | | 31,0 |
| 9 | | 50,2 | | 50,1 |
| 10 | | 36,5 | | 36,5 |
| 11 | | 24,3 | | 24,3 |
| 12 | | 39,8 | | 39,8 |
| 13 | | 40,5 | | 40,5 |
| 14 | | 56,8 | | 56,8 |
| 15 | | 23,1 | | 23,1 |
| 16 | | 28,9 | | 28,9 |
| 17 | | 56,1 | | 56,0 |
| 18 | 1,25 (<i>d</i> , J = 10,75 Hz) | 12,1 | 1,27 (<i>d</i> , 3H) | 12,1 |
| 19 | 0,69 (<i>d</i> , J = 9,0 Hz) | 19,4 | 0,71 (<i>d</i> , 3H) | 19,4 |
| 20 | | 39,7 | | 39,7 |
| 21 | 1,17 (<i>d</i> , J = 9,3 Hz) | 21,1 | 1,17 (<i>d</i> , 3H) | 21,1 |
| 22 | | 138,3 | | 138,3 |
| 23 | | 129,3 | | 129,3 |
| 24 | | 51,2 | | 51,2 |
| 25 | | 36,1 | | 36,2 |
| 26 | 0,82 (<i>d</i> , J = 4,2 Hz) | 19 | 0,86 (<i>d</i> , 3H) | 19,0 |
| 27 | 0,92 (<i>d</i> , J = 6,4 Hz) | 18,8 | 0,94 (<i>d</i> , 3H) | 18,8 |
| 28 | | 25,4 | | 25,4 |
| 29 | 1,02 (<i>t</i> , J = 3,3 Hz) | 12 | 1,04 (<i>t</i> , 3H) | 12,0 |

Fonte: O Autor

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (III) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)

| H/C | Substância (III) | | Okoro <i>et al.</i> , 2017 | |
|-----|---|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
| 1 | | 37,3 | | 37,3 |
| 2 | | 31,7 | | 31,7 |
| 3 | 3,52 (<i>ddd</i> , J = 11,0; 4,2 e 3,8 Hz) | 71,8 | 3,54 (<i>ddd</i> , 1H) | 71,8 |
| 4 | | 42,3 | | 42,2 |
| 5 | | 140,8 | | 141,0 |
| 6 | 5,35 (<i>d</i> , J = 3,8 Hz) | 121,7 | 5,36 (<i>m</i> , 1H) | 121,7 |
| 7 | | 31,9 | | 31,9 |
| 8 | | 29,7 | | 31,0 |
| 9 | | 50,2 | | 50,1 |
| 10 | | 36,5 | | 36,5 |
| 11 | | 24,3 | | 24,3 |
| 12 | | 39,8 | | 39,8 |
| 13 | | 40,5 | | 40,5 |
| 14 | | 56,8 | | 56,8 |
| 15 | | 23,1 | | 23,1 |
| 16 | | 28,9 | | 28,9 |
| 17 | | 56,1 | | 56,0 |
| 18 | 1,25 (<i>d</i> , J = 10,75 Hz) | 12,1 | 1,27 (<i>d</i> , 3H) | 12,1 |
| 19 | 0,69 (<i>d</i> , J = 9,0 Hz) | 19,4 | 0,71 (<i>d</i> , 3H) | 19,4 |
| 20 | | 39,7 | | 39,7 |
| 21 | 1,17 (<i>d</i> , J = 9,3 Hz) | 21,1 | 1,17 (<i>d</i> , 3H) | 21,1 |
| 22 | 5,15 (<i>dd</i> , J = 8,7 e 6,5 Hz) | 138,3 | 5,16 (<i>m</i> , 1H) | 138,3 |
| 23 | 5,02 (<i>dd</i> , J = 11,5 e 4,5 Hz) | 129,3 | 5,33 (<i>m</i> , 1H) | 129,3 |
| 24 | | 51,2 | | 51,2 |
| 25 | | 36,1 | | 36,2 |
| 26 | 0,82 (<i>d</i> , J = 4,2 Hz) | 19 | 0,86 (<i>d</i> , 3H) | 19,0 |
| 27 | 0,92 (<i>d</i> , J = 6,4 Hz) | 18,8 | 0,94 (<i>d</i> , 3H) | 18,8 |
| 28 | | 25,4 | | 25,4 |
| 29 | 1,02 (<i>t</i> , J = 3,3 Hz) | 12 | 1,04 (<i>t</i> , 3H) | 12,0 |

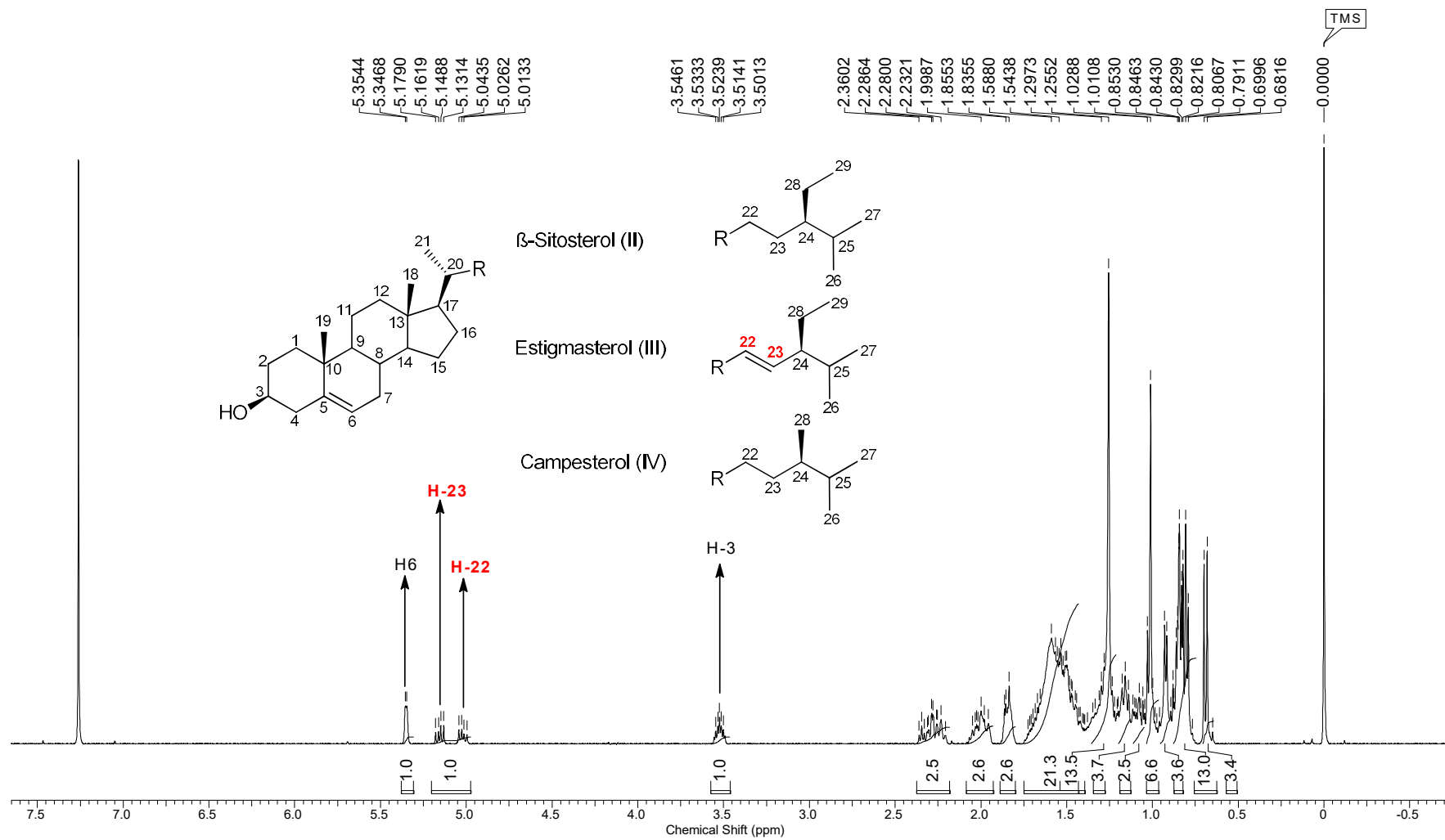
Fonte: O Autor

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância (IV) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz)

| H/C | Substância (IV) | | Okoro <i>et al.</i> , 2017 | |
|-----|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | δ_{H} (ppm), J (Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
| 1 | | 37,3 | | 37,3 |
| 2 | | 31,7 | | 31,7 |
| 3 | 3,52 (<i>td</i> , J = 11,0; 4,2 e 3,8 Hz) | 71,8 | 3,54 (<i>td</i> , 1H) | 71,8 |
| 4 | | 42,3 | | 42,2 |
| 5 | | 140,8 | | 141,0 |
| 6 | 5,35 (<i>d</i> , J = 3,8 Hz) | 121,7 | 5,36 (<i>m</i> , 1H) | 121,7 |
| 7 | | 31,9 | | 31,9 |
| 8 | | 29,7 | | 31,0 |
| 9 | | 50,2 | | 50,1 |
| 10 | | 36,5 | | 36,5 |
| 11 | | 24,3 | | 24,3 |
| 12 | | 39,8 | | 39,8 |
| 13 | | 40,5 | | 40,5 |
| 14 | | 56,8 | | 56,8 |
| 15 | | 23,1 | | 23,1 |
| 16 | | 28,9 | | 28,9 |
| 17 | | 56,1 | | 56,0 |
| 18 | 1,25 (<i>d</i> , J = 10,75 Hz) | 12,1 | 1,27 (<i>d</i> , 3H) | 12,1 |
| 19 | 0,69 (<i>d</i> , J = 9,0 Hz) | 19,4 | 0,71 (<i>d</i> , 3H) | 19,4 |
| 20 | | 39,7 | | 39,7 |
| 21 | 1,17 (<i>d</i> , J = 9,3 Hz) | 21,1 | 1,17 (<i>d</i> , 3H) | 21,1 |
| 22 | | 138,3 | | 138,3 |
| 23 | | 129,3 | | 129,3 |
| 24 | | - | | - |
| 25 | | 36,1 | | 36,2 |
| 26 | 0,82 (<i>d</i> , J = 4,2 Hz) | 19 | 0,86 (<i>d</i> , 3H) | 19,0 |
| 27 | 0,92 (<i>d</i> , J = 6,4 Hz) | 18,8 | 0,94 (<i>d</i> , 3H) | 18,8 |
| 28 | | 25,4 | | 25,4 |
| 29 | 1,02 (<i>t</i> , J = 3,3 Hz) | 12 | 1,04 (<i>t</i> , 3H) | 12,0 |

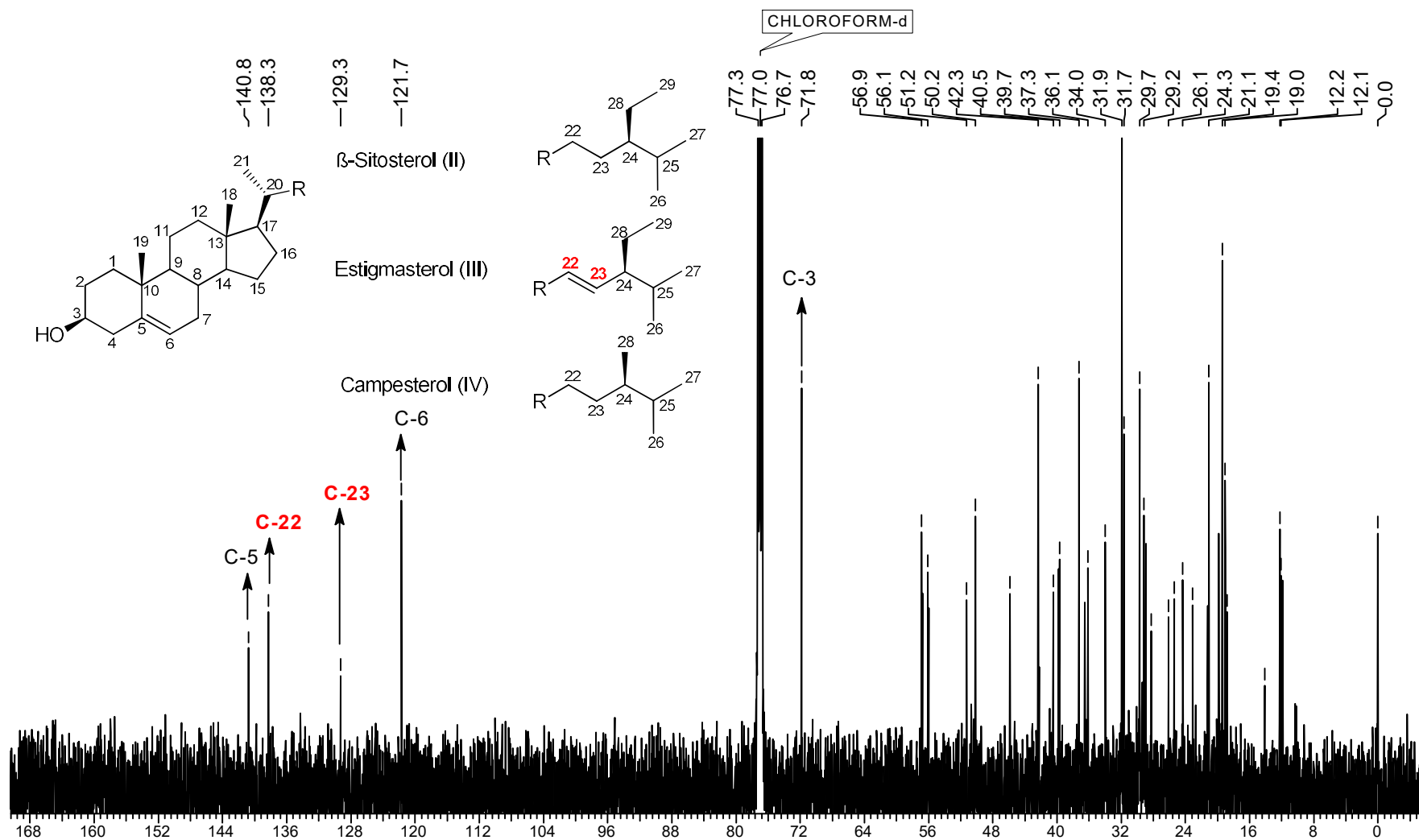
Fonte: O Autor

Figura 28 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz) (CDCl_3) da substância (II, III e IV)



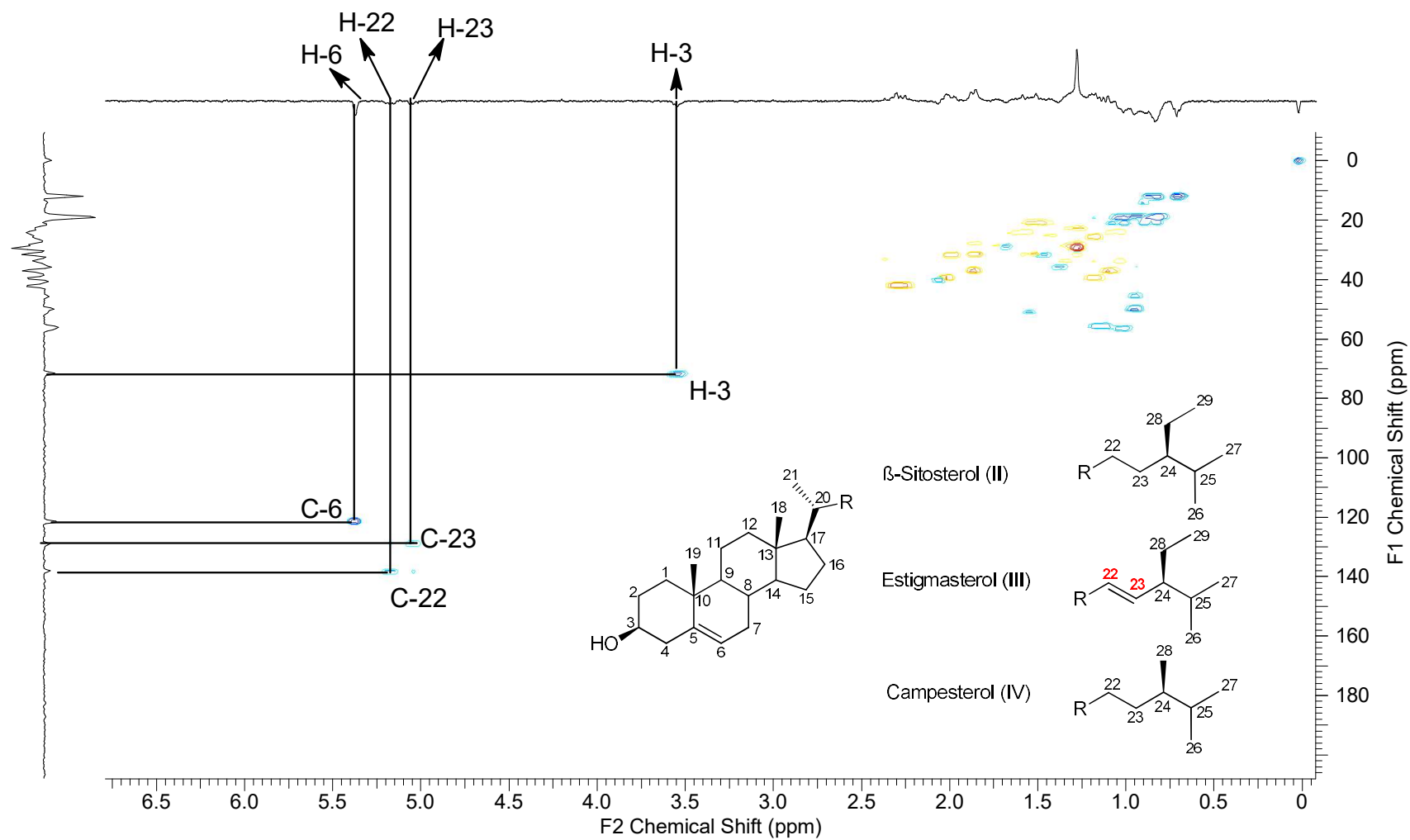
Fonte: O autor

Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias (II), (III) e (IV) em (CDCl_3 , 125 MHz)



Fonte: O Autor

Figura 30 - Ampliação do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, das substâncias II, III e IV (500 MHz, CDCl_3)



Fonte: O Autor

5.2.4 Identificação do flavonoide

5.2.4.1 Identificação da substância (V)

A substância (V) foi isolada da fração metanólica das folhas, que apresentou uma característica cristalina. Esta substância foi identificada através da análise de experimentos de RMN de ^1H (Figura 31), incluindo experimentos 2D como HSQC (Figura 31), revelou sinais característicos de flavonóis, incluindo dois dupletos no sistema orto aromático do anel B (δ_{H} 6,89 e 8,10 ppm), além de dupletos no anel A em (δ_{H} 6,23 e 6,43 ppm). Já no HSQC, observou-se o padrão de deslocamentos químicos e acoplamentos característico de dois açúcares: glicose e ramnose, conectados ao aglicona (flavonoide). Os sinais geminais observados em δ_{H} 3,64 ppm e δ_{H} 3,77 ppm (H-6'') apresentaram acoplamentos duplos coerentes com literatura ($J = 9,0$ e $5,5\text{--}6,0$ Hz), e mostraram correlação com carbono a δ_{C} 68,1 ppm, confirmando a presença da unidade glicose descritos na (Tabela 10) (Cardoso et. al., 2005).

A presença do sinal anomérico em δ_{H} 4,47 (d , $J = 7,7$ Hz) é característica de um próton H-1'' de glicose com configuração β , enquanto o sinal em δ_{H} 4,51 ppm (d , $J = 1,2$ Hz) confirma o H-1''' da rhamnose com configuração α , de acordo com os padrões clássicos descritos por Agrawal (1989).

A presença de um metil (CH_3) em δ_{H} 1,18 (d , $J = 6,3$ Hz), associado ao sinal de carbono em δ_{C} 16,5 ppm, é característica diagnóstica da rhamnose, reforçando sua identificação. Destaque para a correlação entre o H-1'' da glicose e o C-6''' da rhamnose (δ 68,5 ppm), estabelecendo a ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 6) entre os dois monossacarídeos. Tais características são consistentes com os dados reportados para a nicotiflorina (kaempferol-3-O-rutinosídeo) isolado de *Anchusa itálica* (Osw e Hussain, 2020).

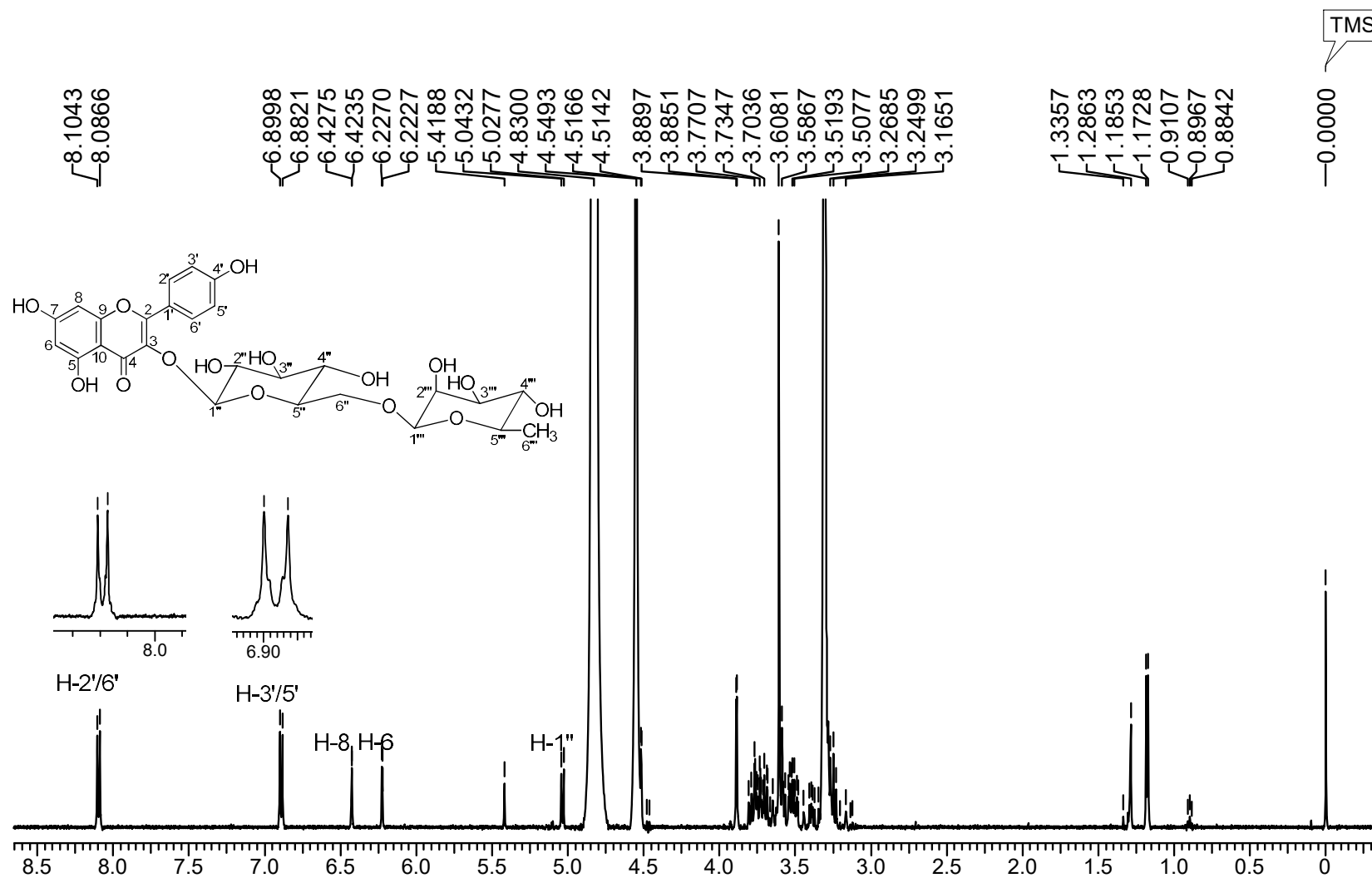
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância (**V**) em comparação com os dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e em DMSO- d_6

| H/C | Substância (V) | | Osw; Hussain, 2020 | | Cardoso <i>et. al.</i> , 2005 | |
|-------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}(\text{ppm}), J (\text{Hz})$ | $\delta_{\text{C}} (\text{ppm})$ | $\delta_{\text{H}}(\text{ppm}), J (\text{Hz})$ | $\delta_{\text{C}} (\text{ppm})$ | $\delta_{\text{H}}(\text{ppm}), J (\text{Hz})$ | $\delta_{\text{C}} (\text{ppm})$ |
| 2 | | 157,4 | | 156,4 | | 157,1 |
| 3 | | 134,2 | | 133,1 | | 134,2 |
| 4 | | 178,1 | | 177,3 | | 179 |
| 5 | | 160,2 | | 161,1 | | 161,5 |
| 6 | 6,23 (<i>d</i> , $J = 2,2$) | 98,2 | 6,20 (<i>d</i> , $J = 1,8$) | 98,6 | 6,13 (<i>S</i>) | 98,5 |
| 7 | | 160 | | 164 | | 164,6 |
| 8 | 6,43 (<i>d</i> , $J = 2,0$) | 93,1 | 6,40 (<i>d</i> , $J = 1,8$) | 93,6 | 6,31 (<i>S</i>) | 93,4 |
| 9 | | 160 | | 156,8 | | 158,2 |
| 10 | | 100,2 | | 103,9 | | 105,9 |
| 1' | | 121,3 | | 120,8 | | 126,3 |
| 2'/6' | 8,10 (<i>d</i> , $J = 8,9$) | 130,7 | 8,00 (<i>d</i> , $J = 8,8$) | 130,8 | 8,08 (<i>d</i> , $J = 8,9$) | 130,9 |
| 3'/5' | 6,89 (<i>d</i> , $J = 8,9$) | 114,5 | 6,88 (<i>d</i> , $J = 8,8$) | 115 | 6,88 (<i>d</i> , $J = 8,9$) | 114,6 |
| 4' | | 159,9 | | 159,8 | | 160,9 |
| 1'' | 5,04 (<i>d</i> , $J = 7,8$) | 103,5 | 5,30 (<i>d</i> , $J = 7,3$) | 101,3 | 5,12 (<i>d</i> , $J = 7,7$) | 103,1 |
| 2'' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 72,1 | 3,16 (<i>m</i>) | 74,1 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 74,3 |
| 3'' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 70,6 | 3,21 (<i>m</i>) | 76,3 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 76,6 |
| 4'' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 69 | 3,05 (<i>m</i>) | 69,9 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 70,1 |

| | | | | | | |
|------|--|-------|--|-------|--|-------|
| 5" | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 73,7 | 3,24 (<i>m</i>) | 75,7 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 75,7 |
| 6" | 3,64 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 5,5) e 3,77 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 6,0) | 68,1 | 3,70 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,0) e 3,30 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,0) | 66,8 | 3,64 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 5,5) e 3,79 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 6,0) | 67,1 |
| 1''' | 4,51 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,2) | 100,2 | 4,37 (<i>S</i>) | 100,7 | 4,40 (<i>S</i>) | 100,9 |
| 2''' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 70,1 | 3,24 (<i>m</i>) | 70,3 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 70,8 |
| 3''' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 71,6 | 3,68 (<i>m</i>) | 70,5 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 70,6 |
| 4''' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 72,5 | 3,10 (<i>m</i>) | 71,7 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 72,4 |
| 5''' | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 68,5 | 3,68 (<i>m</i>) | 68,1 | 3,00 - 4,00 (<i>m</i>) | 68,6 |
| 6''' | 1,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,3) | 16,5 | 0,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,1) | 17,6 | 1,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,2) | 16,4 |

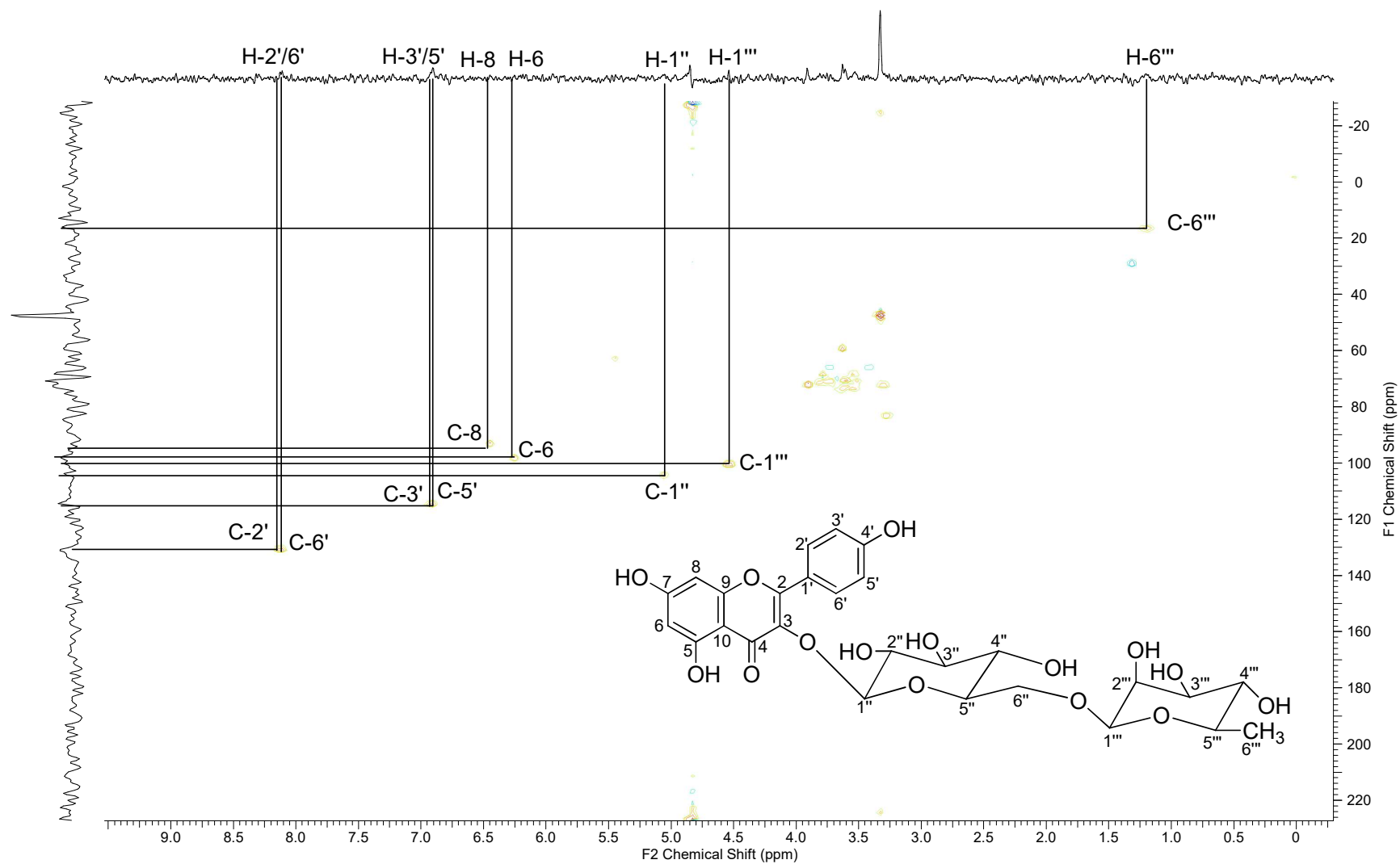
Fonte: O Autor

Figura 31 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) em (CD_3OD)



Fonte: O Autor

Figura 32 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQB, da substância (**V**) (500 MHz, CD_3OD)



Fonte: O Autor

5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Para Hertz *et al.*, (2002) os extratos que apresentam CMI inferior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ atividade antibacteriana é considerada boa, de 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a atividade antibacteriana é moderada, de 500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a atividade antibacteriana é fraca, mais de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o extrato pode ser considerado inativo.

Tabela 13 - Resultado do ensaio de atividade microbiana frente aos extratos de *Aeschynomene americana* em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

| Amostras | <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Escherichia coli</i> | |
|----------|------------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | CMI | CMB | CMI | CMB |
| AAFE | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| AAFE-H | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| AAFE-A | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| AAFE-M | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |

Legenda: AAFE: *Aeschynomene Americana* Folha Etanol; AAFE-H: *Aeschynomene Americana* Folha Etanol Hexano; AAFE-A: *Aeschynomene Americana* Folha Etanol Acetato de etila; AAFE-M: *Aeschynomene Americana* Folha Etanol Metanol; CMI: Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); CMB: Concentração mínima bacteriostática ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Fonte: O Autor

Segundo Pinto *et al.* (2003), a atividade antibacteriana de extratos vegetais é avaliada pela determinação da menor quantidade de substância necessária para inibir o crescimento de microrganismos, conhecida como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Este parâmetro é crucial para identificar o potencial antimicrobiano de compostos naturais. O extrato e as frações testadas não possuem valores de CMI dentro da faixa de concentração e para as cepas testados,

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extratos vegetais envolve várias considerações importantes. Entre os métodos utilizados, destaca-se a microdiluição em caldo, que possui suas vantagens e limitações. Além dos aspectos

metodológicos, é fundamental considerar as implicações toxicológicas dos extratos vegetais.

A preocupação com os aspectos toxicológicos e microbiológicos dos compostos naturais ou suas combinações é crucial na determinação da CMI. Esses fatores explicam, em parte, a inatividade observada em alguns extratos. Comparando com os resultados das espécies estudadas do gênero, apresentaram atividade moderada ou fraca contra bactérias. Por exemplo: *Aeschynomene indica* que apresentou atividade antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* assim como *Aeschynomene sensitiva* que apresentou atividade antimicrobiana, porém em concentrações mais altas nos extratos testados.

5.3.2 Avaliação da atividade citotóxica

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, como SA: sem atividade; BA: baixa atividade (inibição do crescimento celular variando de 1 a 50%); AM: atividade moderada (inibição do crescimento celular variando de 50,1 a 75%); AA: alta atividade (inibição do crescimento celular superior a 75%), escala relatada na literatura por Almeida *et al.*, (2014) e Comitê Técnico ISO / TC 194 (2009).

Na análise de concentração única, as amostras AAFE, AAFE-H apresentaram alta atividade em todas as linhagens testadas. AAFE-M apresentou alta atividade apenas frente a linhagem leucêmica (HL60), AAFE-A apresentou alta inibição frente HCT-116 e HL60 e atividade moderada frente PC3 e SNB-19. Os dados detalhados da atividade citotóxica das amostras testadas estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) com Desvio Padrão (DP) das amostras na concentração única de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para extratos e 50 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para frações

| Inibição do crescimento - IC% | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| AMOSTRA | PC-3 | | SNB-19 | | HCT-116 | | HL60 | |
| | IC% (MÉDIA) | DP | IC% (MÉDIA) | DP | IC% (MÉDIA) | DP | IC% (MÉDIA) | DP |
| AAFE | 85,93 | 0,98 | 78,57 | 1,43 | 79,52 | 0,58 | 93,20 | 1,49 |
| AAFE-A | 70,53 | 5,71 | 74,08 | 0,98 | 78,87 | 0,12 | 84,80 | 5,42 |
| AAFE-H | 74,94 | 3,44 | 75,51 | 3,50 | 79,35 | 0,60 | 83,60 | 1,00 |
| AAFE-M | 59,33 | 5,63 | 27,62 | 3,54 | 1,54 | 2,67 | 75,16 | 0,61 |

Fonte: O Autor

Diante da análise dos dados de concentração máxima de teste, com amostras apresentando inibição do crescimento celular em pelo menos duas linhagens tumorais, realizou-se o teste de Concentração Inibitória Média (CI₅₀). A fração AAFE-A apresentou os melhores resultados de inibição, com os menores valores de CI₅₀. Para a linhagem PC3, o valor de CI₅₀. foi de 7,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC: 6,39 - 9,89), indicando alta atividade citotóxica. Na linhagem HCT-116, a concentração inibitória média foi de 13,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC: 11,62 - 15,24). Já para a linhagem leucêmica HL60, o CI₅₀. foi de 4,54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC: 3,38 - 6,10), demonstrando a maior citotoxicidade entre todas as amostras para essa linhagem.

A fração AAFE também mostrou boa resposta na linhagem SNB-19, com um CI₅₀. de 9,29 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC: 6,45 - 13,40), sendo o menor valor para essa linhagem. Portanto, a fração AAFE-A apresentou os menores valores de CI₅₀. na maioria das linhagens, com exceção da linhagem SNB-19, onde a fração AAFE obteve melhor desempenho.

Tabela 15 - Concentração Inibitória Média (Cl₅₀) com intervalo de confiança (IC) das amostras com concentração 50 e 100 µg.mL⁻¹.

| Amostras | Cl ₅₀ µg/mL | | | | |
|----------|------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| | Intervalo de confiança | | | | |
| | PC3 | HCT-116 | SNB-19 | HL60 | L929 |
| | 17,78 | 28,68 | 9,29 | 26,85 | 33,90 |
| AAFE | 12,58 - 25,11 | 19,12 - 40,49 | 6,45 - 13,40 | 18,05 - 40,40 | 26,90 - 40,33 |
| | 7,95 | 13,26 | | 4,54 | 23,94 |
| AAFE-A | 6,39 - 9,89 | 11,62 - 15,24 | >50 | 3,38 - 6,10 | 19,59 - 30,45 |
| | 25,97 | 31,07 | | 14,19 | 29,37 |
| AAFE-H | 17,85 - 42,42 | 24,16 - 39,90 | >50 | 10,19 - 18,55 | 21,22 - 44,20 |
| | 36,07 | 48,10 | | 33,85 | 28,70 |
| AAFE-M | 27,56 - 51,61 | 38,20 - 79,97 | >50 | 26,34 - 41,41 | 24,71 - 33,18 |

Fonte: O Autor

A análise do índice de seletividade (IS) das amostras, com base nos valores de Cl₅₀ nas linhagens tumorais e na linhagem não tumoral L929, é essencial para avaliar o potencial desses extratos para futuros testes pré-clínicos e/ou clínicos. O cálculo desse índice corresponde à divisão entre o valor de Cl₅₀ de cada composto-teste na linhagem de células não tumorais (L929) e o valor de Cl₅₀ do mesmo composto na linhagem de células tumorais ($IS = Cl_{50} \text{ L929} / Cl_{50} \text{ células tumorais}$). Conforme Suffness e Pezzuto (1991), um IS é considerado significativo quando é maior ou igual a 2,0, indicando uma maior seletividade para células tumorais em relação às normais.

A amostra AAFE apresentou seletividade significativa apenas para a linhagem SNB- 19, com um IS de 3,65, o que indica uma boa seletividade para essa linhagem de células tumorais. A amostra AAFE-A mostrou boa seletividade para PC3 e HL60, com IS de 3,01 e 5,27, respectivamente, demonstrando potencial citotóxico para essas linhagens tumorais. A amostra AAFE-H apresentou seletividade apenas para a linhagem HL60, com um IS de 2,07, indicando que essa amostra é mais ativa contra células tumorais leucêmicas. A amostra AAFE-M não apresentou seletividade significativa para nenhuma das linhagens testadas (Tabela 15).

Tabela 16 - Valores Índice de seletividade IC_{50} (células não tumorais) / IC_{50} (célula tumoral)

| AMOSTRA | $IC_{50} \mu g.mL^{-1}$ Intervalo de confiança | | | |
|---------|---|---------|-------------|-------------|
| | PC-3 | HCT-116 | SNB-19 | HL60 |
| AAFE | 1,92 | 1,18 | 3,65 | 1,26 |
| AAFE-A | 3,01 | 1,81 | - | 5,27 |
| AAFE-H | 1,13 | 0,95 | - | 2,07 |
| AAFE-M | 0,80 | 0,60 | - | 0,85 |

Fonte: O Autor

Os dados indicam que as amostras AAFE-A e AAFE possuem maior potencial citotóxico em comparação com as demais, sendo mais promissoras para o desenvolvimento de compostos com atividade anticancerígena, especialmente nas linhagens PC3, HL60 e SNB-19. Entre as amostras, AAFE-A foi a que apresentou melhor seletividade, com valores de IS elevados para PC3 (IS = 3,01) e HL60 (IS = 5,27). AAFE também mostrou boa seletividade para SNB-19 (IS = 3,65). As demais amostras, como AAFE-H e AAFE-M, não demonstraram seletividade significativa, com valores de IS abaixo de 2 para a maioria das linhagens testadas. Comparando com os resultados obtidos em espécies do mesmo gênero, observou-se que as espécies *Aeschynome indica*, *Aeschynomene sensitiva*, *asechynomene fascicularis* e *Aeschynomene elaphroxylon* demonstraram atividade contra várias linhagens celulares cancerígenas em estudos preliminares incluindo potencial antitumoral.

5.3.3 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Todos os compostos testados, com exceção da fração de acetato de de etila AAFE-A ($DL_{50} > 1000 \mu g.mL^{-1}$), se mostraram tóxicos a náuplios de *A. salina*, ou seja, apresentaram valores menores que $1000 \mu g.mL^{-1}$. A fração de metanol AAFE-M ($DL_{50} = 345 \mu g.mL^{-1}$) apresentou toxicidade moderada, conforme Dolabela (1997), enquanto a fração hexânica AAFE-H ($DL_{50} = 706 \mu g.mL^{-1}$) e o extrato etanólico das folhas AAFE ($DL_{50} = 974 \mu g.mL^{-1}$) apresentaram baixa toxicidade, sugerindo grande potencial de bioatividade destes compostos.

Tabela 17 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

| Amostras | DL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) | Toxicidade |
|----------|---|------------|
| AAFE | 974 | Baixa |
| AAFE-H | 706 | Baixa |
| AAFE-A | >1000 | Não tóxico |
| AAFE-M | 345 | Moderada |

Fonte: O Autor

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu a realização de um estudo fitoquímico inédito para espécie *Aeschynomene americana*, pertencente à família Fabaceae, que a partir da obtenção de extratos, frações e com a avaliação preliminar de suas atividades antibacteriana, tóxica e citotóxica, foram isolados a feofitina A, da fração acetato de etila. Também foram identificados três fitoesteróis: β -sitosterol, Estigmasterol e campesterol, a partir da fração hexânica, e o flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo, que por meio de análise espectroscópica e comparação com dados da literatura.

Os ensaios antibacterianos revelaram que os extratos brutos e frações testadas não apresentaram atividade inibitória significativa frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nas concentrações avaliadas. Apesar disso, a presença de compostos com reconhecido potencial biológico, como os fitoesteróis e a feofitina A, justifica a continuidade das investigações.

Sobretudo em relação à atividade citotóxica, os dados indicam que as amostras AAFE-A e AAFE possuem maior potencial citotóxico em comparação com as demais, sendo mais promissoras para o desenvolvimento de compostos com atividade anticancerígena, especialmente nas linhagens PC3, HL60 e SNB-19. Entre as amostras, AAFE-A foi a que apresentou melhor seletividade, com valores de IS elevados para PC3 (IS = 3,01) e HL60 (IS = 5,27). AAFE também mostrou boa seletividade para SNB-19 (IS = 3,65). As demais amostras, como AAFE-H e AAFE-M, não demonstraram seletividade significativa, com valores de IS abaixo de 2 para a maioria das linhagens testadas.

Contudo, os resultados de toxicidade frente a *Artemia salina* encontrados são promissores, em que o extrato etanólico e as frações de hexano e metanol apresentaram DL₅₀ menor que 1000 µg.mL⁻¹, sendo apenas a fração acetado de etila com valor de DL₅₀ maior que 1000 µg.mL⁻¹. Portanto, este estudo amplia o conhecimento sobre os constituintes químicos da espécie *A. americana* e oferece subsídios importantes para futuras pesquisas que visem à valorização da biodiversidade do Cerrado e à prospecção de moléculas com potencial farmacológico, além dos compostos serem inéditos para o gênero *Aeschynomene*.

7 REFERÊNCIAS

ACHIKA, J; NDUKWE, G. Phytochemical Screening and Antimicrobial Studies of the Aerial Part of *Aeschynomene uniflora* Mey. **Industrial Chemistr**, v. 02, n. 01, p. 1, 2016. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2469-9764.1000113>.

AKILABALAMURUGAN, M; ISWARYALAKSHMI, K. Phytochemical screening antioxidant and antimicrobial activity of *aeschynomene aspera* linn root extract. **Journal Of Pharmaceutical And Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 29-33, 2019. IP Innovative Publication Pvt Ltd. <http://dx.doi.org/10.18231/j.jpbs.2019.005>.

ALMEIDA, J.R.G.S; ARAÚJO, C.S.; PESSOA, C.O.; COSTA, M.P.; PACHECO, A.G.M. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Rev Bras Frutic** ,36:258 – 64, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500030>.

ALVES, Leandro Albano; CUNHA, Gracielle Oliveira Sabbag; CRUZ, Danielle Coelho da; LIMA, Dayane Cláudia Ambrosio de; SANTOS, Cássia Kênia Garcia; MENEZES, Antônio Carlos Severo. Estudo fitoquímico e propriedades de *Andira paniculata* Benth (Fabaceae) na inibição de linhagens tumorais de leucemia, próstata e carcinoma de cólon. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 23, n. 1, p. 140-152, 2024. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v23i1.54353>.

ANAS, A; AMBI, A.A.; ZAINAB, M; JAJERE, U.M.; UMAR, S. Evaluation of phytochemicals and anti-inflammatory effects on methanol extracts of *Aeschynomene uniflora*. **Bayero Journal Of Pure And Applied Sciences**, v.11, n.2, p.32, 23, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v11i2.5>.

ANTUNES, L. L. C.; SILVA, M. J. **Aeschynomene (Fabaceae, Papilionoideae) no estado de Goiás, Brasil**. Rodriguésia, v. 69, n. 4, p. 2163-2207, 2018.

ASFAW, M. M.; ABEBE, F. B. Traditional Medicinal Plant Species Belonging to Fabaceae Family in Ethiopia: a systematic review. **International Journal Of Plant**

Biology, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 8473, 5 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.4081/pb.2021.8473>.

ARRUDA, R. F.; ALVES-OLHER, V. G.; VANDRESEN, F.; SCHUQUEL, I. T. A.; BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, C. C. Chemical Study and Evaluation of Anti-Inflammatory, Antitumor and Antioxidant Activities of Aerial Parts from *Aeschynomene sensitiva*. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 684-697, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20180050>.

AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, C. D.; BANKS, H.; BARBOSA, A. R.; PINTO, R. B.; BOATWRIGHT, J. S.; B., LEONARDO M.; BROWN, G. K.; BRUNEAU, A. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: the legume phylogeny working group (lpwg). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.12705/661.3>.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.

BLANKENSHIP, R. E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2. ed. **Chichester: Wiley-Blackwell**, 2014.

CAAMAL-FUENTES, E; PERAZA-SÁNCHEZ, S; TORRES-TAPIA, L; MOO-PUC, R. Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from *Aeschynomene fascicularis*, a Mayan Medicinal Plant. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13563-13574, 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200813563>.

CANNELL R. J. P. Natural Products Isolation; **Humana Press**, New Jersey, 1998.

CASTILLO-BAUTISTA, C. M; TORRES-TAPIA, L. W; LAGUNAS-MARTÍNEZ, A; CONTRERAS-OCHOA, C. O; PERAZA-SANCHEZ, S. R; MOO-PUC, R. Secundiflorol G isolated from *Aeschynomene fascicularis*, a Mayan medicinal plant, induces apoptosis in cervical cancer cells. **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 826-828, 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1601092>.

CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. D. S. New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 16, n. 6b, p. 1353–1359, nov. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800008>.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-

56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3° ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial CLSI. **supplement M100S**. Wayne, PA, 2016.

D'ABROSCA B.; SCOGNAMIGLIO M.; TSAFANTAKIS N.; FIORENTINO A.; MONACO P. Derivados fitotóxicos de clorofila de folhas de *Petrorrhagia velutina* (Guss.) Ball et Heyw. **Natural Product Communications**. 2010. doi: [10.1177/1934578X1000500124](https://doi.org/10.1177/1934578X1000500124).

DOLABELA M.F (1997) Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 130p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I.; MOHAMED, A. A. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3266, 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24043266>.

FERREIRA, M. D. D. S.; NOGUEIRA, E. V.; MARQUES, I. M.; LIMA, G. S. B.; PEREIRA, R. M. Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos do fruto de *Buchenavia* sp. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p. 17, 23 maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.22571/Actabra12201732>.

FULLAS, F; KORNBERG, L. J; WANI, M. C; WALL, M. E; FARNSWORTH, N. R; CHAGWEDERA, T. E; KINGHORN, A. D. Two New Aromatic Constituents from the Rootwood of *Aeschynomene mimosifolia*. **Journal Of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 190-192, 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np960052v>.

HASHEM, M. M; SALAMA, M. M; MOHAMMED, F. F; TOHAMY, A. F; DEEB, K. S. E. Metabolic profile and hepatoprotective effect of *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. & Perr.). **Plos One**, v. 14, n. 1, p. 0210576, 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0210576>.

HERTZ, F. B; PESSINI, G. L; SANCHES, N. R; CORTEZ, D. A. G; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027-1031, 2002.

IGNOATO, M. C; FABRÃO, R. M; SCHUQUEL, I. T A; BOTELHO, M.F. P; SANTIN, S. M. O; ARRUDA, L. L. M; BERSANI-AMADO, C. A; SOUZA, M. C. Estudo fitoquímico

e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012001100028>.

IMTIAZ, H; HOSSAIN, A; ISLAM, F; SULTANA, R; RAHMAN, M. Bioactivities of *Aeschynomene aspera* (Fabaceae) Leaf Extract. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v.23, n.2, p.109-116, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3329/bpj.v23i1.48330>.

INCA. **O que é o câncer**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 25 maio. 2025

JUNIOR, V. C.; BOLZANI, S.V. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna: **Química Nova**, p. 326-327, 2006.

KRISHNA, P. M.; KNV, R. S, S.; BANJI, D. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1145-1154, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000043>.

LEI, Z. Y; CHEN, J. J; CAO, Z. J; AO, M. Z; YU, L. J. Efficacy of *Aeschynomene indica* L. leaves for wound healing and isolation of active constituent. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 228, p. 156-163, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.008>.

MAHMOUDI, F.; JALAYERI, M. H. T.; MONTASERI, A.; MOHAMEDKHOSROSHAHI, L.; BARADARAN, B. Microbial natural compounds and secondary metabolites as Immunomodulators: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 278, p. 134778, 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134778>.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M.. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. In: Embrapa: Comunicato técnico 427. [S. l.], 2018.

MAROYI, A. Medicinal Uses of the Fabaceae Family in Zimbabwe: a review. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1255, 10 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12061255>.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. A.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A. Modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*. V.3, p.633- 638, 2006.

MORANTE-CARRIEL, J.; NÁJERA, H.; SAMPER-HERRERO, A.; SIVKOVIĆ, S.; MARTÍNEZ-ESTESO, M. J.; MARTÍNEZ-MÁRQUEZ, A.; SELLÉS-MARCHART, S.; OBREBSKA, A.; BRU-MARTÍNEZ, R. Therapeutic Potential of Prenylated Flavonoids of the Fabaceae Family in Medicinal Chemistry: an updated review. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 13036, 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252313036>.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OKORO, I.; TOR-ANYIIN, T.; IGOLI, J.; NOUNDOU, X.; KRAUSE, R. Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β -Sitosterol from *Anthocleista djalensis* A. Chev. **Asian Journal Of Chemical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2018. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/ajocs/2017/37147>.

Osw, P. S.; Hussain, F. H. S. Isolation of Kaempferol 3-O-Rutinoside from Kurdish Plant *Anchusa italica* Retz. and Bioactivity of Some Extracts. **Eurasian Journal of Science & Engineering**, v. 6, n. 2, p. 141-156, 2020.

SÁ, R. E; ARAÚJO, G. S; MACHADO, F. S; ARAÚJO, D. D; SILVA, R. E; SANTIAGO, R. F; ALMEIDA, L. T. G; MARINHO FILHO, J. D. B; ARAJO, A. R; CHAVES, M. H. Chemical composition, antibacterial and cytotoxic activities of essential oil obtained from aerial parts of *Aeschynomene denticulata* Rudd. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 54, p. 102908, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102908>.

TELES, Y. C. F. Estudo Fitoquímico De *Wissadula Periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae) E Desenvolvimento De Metodologia Analítica Para Quantificação Do Seu Marcador Químico. 2015.

UEDA, M; NIWA, M; YAMAMURA, S. Trigonelline, a leaf-closing factor of the nyctinastic plant, *Aeschynomene indica*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 817-819, jul. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00064-e](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00064-e).

PETRUZZELLO, M. "lista de plantas da família Fabaceae". *Encyclopedia Britannica*, 2023, <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Fabaceae-2021803>.

PINTO T. J. A; KANEKO T. M; OHARA M. T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, **Correlatos e Cosméticos** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p. 2003.

PRATHIBHA BHARATHI, M; MURALIDHARA RAO, D. Evaluation of In vitro Antioxidant Activity of *Aeschynomene indica*. **Journal of Pharmacy Research**, v.9 n.1, p.21-26, 2015. ISSN: 0974-6943.

RAMOS, F. A.; SANTOS, J. L.; SILVA, M. T. Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros. Vol. 2. Ponta Grossa: **Editora Científica Digital**, 2022.

SELMY, A; HEGAZY, M; EL-HELA, A; SALEH, A; EL-HAMOULY, M. In vitro and in silico studies of Neophytadiene; A diterpene isolated from *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. & Perr.) Taub. as apoptotic inducer. **Egyptian Journal Of Chemistry**, p.0, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.21608/ejchem.2023.178261.7296>.

STEVENS, P. F. *Angiosperm Phylogeny Website*. 2024. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 3 abr. 2025.

Technical Committee ISO/TC 194 (2009) Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests For In Vitro Cytotoxicity, ISO Guide 10993-5.

TELES, H. L. et al. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of pheophytin a. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, n. 4, p. 723–731, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000400012>.

WADHWA, K.; KAPOOR, N.; KAUR, H.; ABU-SEER, E. A.; TARIQ, M.; SIDDIQUI, S.; YADAV, V. K.; NIAZI, P. KUMAR, P.; ALGHAMDI, S. A Comprehensive Review of the Diversity of Fungal Secondary Metabolites and Their Emerging Applications in Healthcare and Environment. **Mycobiology**, v. 52, n. 6, p. 335-387, nov. 2024. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/12298093.2024.2416736>.

ZOUINE, N.; GHACHTOULI, N. E.; ABED, S. E.; KORAICHI, S. I. A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. **Scientific African**, [s. l.], v. 26, p. e02395, 1 dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>.