

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Hydrocotyle leucocephala* Cham. & Schltl.

Letícia Pinho Mello (IC) e Edgard Antonio Ferreira (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

A espécie *Hydrocotyle leucocephala*, uma macrofita aquática nativa do Brasil, conhecida popularmente como Acariçoba-míuda ou erva-capitão é amplamente encontrada em território brasileiro e utilizada na medicina popular. As folhas da espécie foram submetidas a um processo de extração com metanol para gerar o extrato que teve o solvente removido, para então obter o extrato seco. Sequencialmente, o extrato seco foi ressuspenso em uma solução de MeOH:H₂O (1:9) e submetido a um processo de extração líquido-líquido que forneceu duas fases, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente. A fase em acetato de etila foi submetida a procedimentos cromatográficos em coluna cromatográfica de sílica gel acompanhados por monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), além da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa visando a purificação de compostos. Estes procedimentos cromatográficos resultaram na purificação de uma substância, Hinokinina, uma lignana dibenzilbutirolactônica já identificada em grande variedade de espécies vegetais e com relatos de variadas propriedades biológicas. A determinação estrutural da Hinokinina teve como base os dados obtidos das análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ¹H e ¹³C), espectro de massas por ionização por elétrons, além da comparação com os resultados já descritos na literatura para total comprovação da identidade estrutural do composto obtido.

Palavras-chave: Lignana, Hinokinina, macrofita aquática.

ABSTRACT

The species *Hydrocotyle leucocephala* is an aquatic macrophyte native from Brazil, popularly known as Acariçoba-míuda or herb-captain, widely found in Brazilian territory and used in folk medicine. The leaves of the species *H. leucocephala* were subjected to an extraction process by maceration with methanol to generate the extract that had the solvent removed, to then generate the dry crude extract. Sequentially, the dry extract was then resuspended in a solution of methanol: water (1: 9) and subjected to a liquid-liquid extraction process to provide two phases, one phase in ethyl acetate and another phase in butanol. The ethyl acetate phase was subjected to chromatographic procedures on a silica gel chromatographic column accompanied by monitoring by analytical thin layer chromatography (TLC) and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) aiming at the purification of compounds. These chromatographic procedures resulted in the purification of Hinokinin, a dibenzylbutyrolactone lignan already identified in a wide variety of plant species. The structural elucidation of Hinokinin was based on the data obtained from the analysis of nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon (^1H and ^{13}C NMR), mass spectroscopy by electron ionization, in addition to the comparison with the results already described in the literature for full confirmation the structural identity of the compound obtained.

Keywords: Lignan, Hinokinin, aquatic macrophyte.

1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é constituída por uma grande diversidade de espécies vegetais que compõem uma rica fonte de compostos orgânicos. Entre estas espécies vegetais, tem-se o grupo das macrófitas aquáticas, popularmente chamadas de plantas aquáticas. Estudos envolvendo este vasto grupo de vegetais são limitados quando comparado com o número de espécies existentes na flora brasileira, assim reduzindo o potencial de obtenção novas moléculas a partir de tais espécies que poderiam ser utilizadas para fins variados. O acervo de substâncias descritos na literatura a partir de macrófitas aquáticas são limitados e carece de maior atenção levando em consideração que as plantas constituem uma imensurável fonte de moléculas com potencial em diversos segmentos. Dentre os gêneros de espécies aquáticas, o gênero *Hydrocotyle* apresenta espécies distribuídas por grande parte do território brasileiro.

De forma a contribuir com o conhecimento dos constituintes químicos presentes no gênero *Hydrocotyle*, torna-se importante o estudo fitoquímico de suas espécies. Assim, a espécie *H. leucocephala*, de ampla ocorrência no Brasil foi submetida ao estudo fitoquímico na busca de substâncias para o referido gênero e espécie.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os compostos obtidos a partir de fontes naturais são um dos principais métodos para a aquisição de moléculas biologicamente ativas. Pode ser citado inúmeras moléculas de origem natural que tiveram êxito no combate ou controle de diversas enfermidades. Como exemplos de grande sucesso pode ser citado a Morfina obtida a partir da Papoula (*Papaver somniferum*), que é um dos mais potentes analgésicos que se tem conhecimento (Luch, 2009; Beaudoin e Facchini, 2014); o Placlitaxel, extraído das cascas da árvore *Taxus brevifolia*, é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de câncer de mama (Wani *et al.*, 1971; Demain e Vaishnav, 2011); a Lovastatina, obtida a partir da colônia de fungos *Aspergillus terreus* (Endo, 1979; Alberts *et al.*, 1980), medicamentos amplamente utilizado no tratamento para redução da taxa de colesterol (Tobert, 2003) e a Penicilina obtida a partir da colônia de fungos *Penicillium chrysogenum*, é um potente antibiótico (Fleming, 1929; Chain *et al.*, 1940).

Além da utilização para fins terapêuticos, os compostos de origem natural, também podem ser considerados protótipos para a síntese de novas moléculas biologicamente ativas. Como exemplo a penicilina G, primeiro antibiótico da classe das β -lactamas que a partir de estudos sobre a relação estrutura-atividade, foi observado que a atividade do composto está presente no anel β -lactâmico. A partir desta observação, uma série de outros

compostos com atividade antibiótica foram sintetizados mantendo-se a estrutura responsável pela atividade biológica fazendo modificações somente nas cadeias laterais.

Com isto, a busca por novas moléculas biologicamente ativas é um processo contínuo, tanto pela necessidade de encontrar novos compostos que apresentem maior atividade biológica, como pela busca da redução dos efeitos colaterais aos medicamentos já existentes.

2.1 Macrófitas aquáticas

As macrófitas aquáticas contam com aproximadamente 2600 espécies. Estão distribuídas por mais de 450 gêneros e são representadas por sete grandes grupos: cianobactérias, clorófitas, rodófitas, xantófitas, briófitas, pteridófitas e espematófitas (CHAMBERS *et. al.*, 2008).

Uma característica marcante das macrófitas aquáticas é a grande versatilidade em relação ao meio que vivem, devido a um processo de evolução adaptivo muito eficiente. Assim, são estabelecidas sete classificações de acordo com as características de como estão presentes no meio aquático (**Figura 1**) (IRGANG *et. al.*, 1994; ESTEVES, 2011).

Figura 1: Classificação das macrófitas aquáticas



Fonte: IRGANG *et. al.*, 1994

- a. Anfíbia: capaz de viver tanto na forma emersa quando imersa;
- b. Emergente: apresenta as raízes no fundo do ambiente aquático, e parte dos caules e folhas estão parcialmente emersos;
- c. Flutuante fixa: as raízes estão no fundo do ambiente aquático, mas os caules e folhas estão flutuando;
- d. Flutuante livre: não apresentam raízes fixas e podem ser levadas pela correnteza;

- e. Submersas fixas: as raízes estão fixas no fundo do ambiente aquático assim como todas as outras partes da planta;
- f. Submersas livres: As raízes não estão fixas no fundo dos lagos ou rios e todas as outras partes da planta também estão submersas;
- g. Epífitas: estão instaladas sobre outras plantas aquáticas.

2.2 Aspectos químicos e biológicos

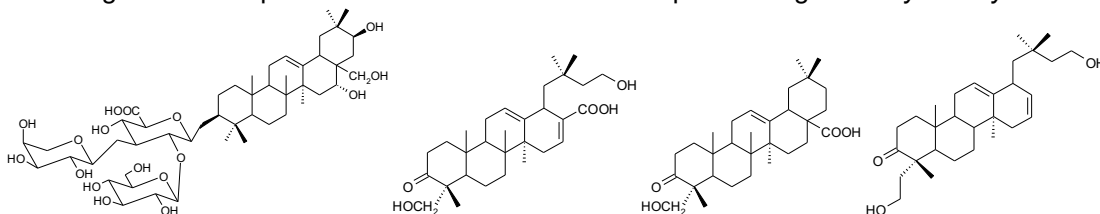
Apesar do grande número de espécies de macrófitas aquáticas, para muitos gêneros não há nenhuma descrição da composição química de suas espécies. Assim, segue uma breve descrição do conhecimento acerca do gênero *Hydrocotyle* e da espécie *Hydrocotyle leucocephala*.

2.2.1 Gênero *Hydrocotyle*

O gênero *Hydrocotyle* pertence à família Araliaceae que compreende 40 gêneros e cerca de 1500 espécies que tem ocorrência desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile (SILVA et al., 2010). A medicina popular faz grande uso das espécies do gênero *Hydrocotyle* como para o tratamento de úlceras de pele, dermatites, reumatismo, tuberculose e eczema (FLORENTINO et al., 2013).

Uma grande diversidade de compostos químicos foi isolada a partir de espécies de *Hydrocotyle*, no entanto a grande maioria pertencente a classe de triterpenos e saponinas. A partir do extrato metanólico de *H. ranunculoides* foram isolados triterpenos polioxigenados e glicosilados (GRECA et al., 1993). Estudos realizados com *H. sibthorpioides* e *H. bonariensis* revelaram a presença de saponinas glicosiladas (MATSUSHITA et al., 2004; HUANG et al., 2008; TABOPDA et al., 2012). (Figura 3)

Figura 3: Exemplos de substâncias isoladas de espécies do gênero *Hydrocotyle*.



Fonte: autora

2.2.2 *Hydrocotyle leucocephala*

A *Hydrocotyle leucocephala* Cham. & Schtdl., popularmente conhecida como Acariçoba-míuda ou erva-capitão é originária do Brasil e pertence à família Apiaceae. A espécie tem distribuição bastante diversificada com ocorrência nas regiões Norte, Centro-

oeste, Sudeste e Sul do Brasil nos domínios de Cerrado e Mata Atlântica (**Figura 4**) (FIASHI, *et. al.*, 2015).

Figura 4: *Hydrocotyleleucocephala*



Fonte: Edgard Antonio Ferreira

A espécie é comumente utilizada como planta ornamental para aquários devido a sua beleza e fácil cultivo, desta forma também apresentando valor econômico. Na Colômbia é utilizada na medicina popular por suas propriedades diuréticas, anti-helmitica e no combate a diarreia. (RAMOS, *et. al.*, 2006)

3. METODOLOGIA

Os solventes utilizados nas extrações, colunas cromatográficas e partições líquido-líquido, hexano, acetato de etila, metanol e butanol, foram de grau PA da marca labsynth utilizados sem prévio tratamento. Para a concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador BUCCHI, equipado com bomba de vácuo BUCCHI modelo V- 700/710.

As amostras injetadas em CLAE foram previamente filtradas em filtro de seringa PVDF hidrofílico (0,22 µm).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Infinity Series com detector por varredura de

espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos (DAD-UV/VIS), modelo 1260 Infinity Series e módulo de tratamento de dados ChemStationEditon.

Como fase estacionaria foi utilizada coluna Ascentis de fase reversa C18 (250 x 10,00 mm) e 5 µm de diâmetro de partícula.

Para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (Merck).

Para as colunas cromatográficas abertas foram utilizadas sílica gel do tipo 60, com partículas 63-200 µm da Merck.

Para cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 PF₂₅₄, sobre suporte de alumínio da Merck. As placas de CCDA foram reveladas sob lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

Os espectros de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Varian 300 localizado na Universidade Federal do ABC (UFABC) e solubilizadas em CDCl₃ da Sigma-Aldrich.

As análises de espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons foram realizadas no equipamento Agilent 5975C MSD, equipados com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30m x 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm), fonte de ionização de 70 eV e detecção de massa entre 15 a 550 Da.

3.1 Coleta do material vegetal, identificação e preparo dos extratos

O material vegetal foi coletado em um produtor de plantas aquáticas para aquários e lagos artificiais no município de Suzano/SP, buscando trabalhar de forma sustentável e preservar a biodiversidade (**Figura 5**).

Figura 5: Local de coleta da espécie *Hydrocotyle leucocephala*



Fonte: Edgard Antonio Ferreira

A identidade da espécie vegetal foi confirmada pela Profa. Dra. Oriana Aparecida Fávero, da Universidade Presbiteriana Mackenzie e pela Profa. Dra. Fátima Otaviana de

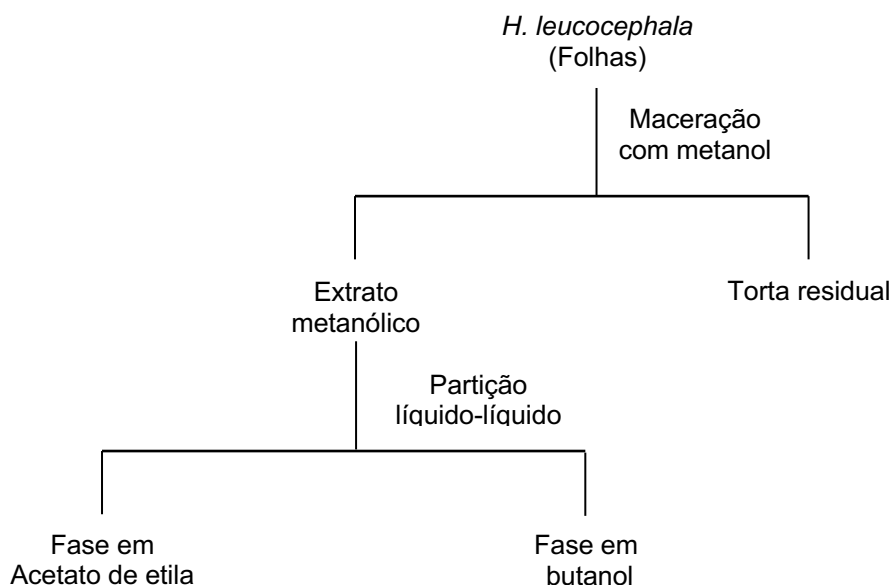
Souza Buturi da Universidade São Judas a partir da excicata da espécie contendo galho, folhas e flores e a excicata foi depositada no herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O material vegetal recém obtido (folhas) foi submetido à secagem em estufa sob ventilação a 40°C por 24 horas visando eliminação de água.

Após esse período, o material vegetal foi moído e extraído com metanol. O solvente então foi removido em um evaporador rotatório sob pressão reduzida obtendo-se o extrato bruto seco.

O extrato em metanol seco foi então ressuspendido em uma mistura metanol : água (1:9/ v:v) e submetido a uma extração líquido-líquido utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (acetato de etila e butanol, respectivamente), conforme ilustrado na figura 6.

Figura 6: Fluxograma de obtenção das fases orgânicas a partir do extrato bruto.



3.2 Fracionamento cromatográfico, purificação e identificação dos constituintes químicos

3.2.1 Fracionamento cromatográfico da fase em acetato de etila.

O método utilizado para a purificação das substâncias foi a cromatografia de adsorção em sílica gel com monitoramento da separação por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Desta forma 4,1 g da fase em acetato de etila foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica aberta com 515,0 g de sílica gel 60 e dimensões 6,0 cm x 38 cm. A eluição foi realizada no modo gradiente de polaridade com o aumento gradativo da mistura dos solventes hexano : acetato de etila nas proporções, 4:6, 2,5:7,5, 0:10, e acetato de etila : metanol nas proporções 7,5:2,5, 5:5 2,5:7,5, 0:10.

Este processo gerou 178 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e de acordo com a similaridade em que as substâncias se dispuseram pela placa após revelação sob luz UV ($\lambda = 254$ nm e 365 nm). Desta forma a partir da fase em acetato de etila foram obtidos 7 grupos (1–7) conforme tabela 1.

Tabela 1: Grupos gerados a partir do fracionamento do extrato seco em acetato de etila

GRUPO	FRAÇÕES	MASSA (mg)
F1	1-35	1,2416
F2	36-61	0,3953
F3	62-72	0,1544
F4	73-87	0,3957
F5	88-96	0,4104
F6	97-142	1,151
F7	143-178	0,1052

Em seguida, todos os grupos foram submetidos a análise de RMN de ^1H , onde foi possível observar sinais característicos de Lignanas na fração F1.

As demais frações mostraram-se compostas por material graxo ou em misturas complexas em pequena quantidade, não justificando o fracionamento cromatográfico.

3.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração F1

Dando continuidade ao processo de purificação, a fração F1 (1,2350 g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica aberta com 145,0 g de sílica gel 60 e dimensões 4,0 cm x 88 cm. A eluição foi realizada no modo gradiente de polaridade com o aumento gradativo da mistura dos solventes hexano : acetato de etila nas proporções 7:3, 5:5, 3:7, 0:10 e metanol 100%.

Este processo forneceu 70 frações de aproximadamente 15 ml cada. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e de acordo com a similaridade em que as substâncias se dispuseram pela placa após revelação sob luz UV ($\lambda=254\text{nm}$ e 365 nm). Desta forma a partir da fase em acetato de etila foi possível obter 4 novos grupos (F1A – F1D) conforme tabela 2.

Tabela 2: Fracionamento cromatográfico do grupo F1		
GRUPOS	FRAÇÕES	MASSA (mg)
F1A	1-15	771,9
F1B	16-20	128,3
F1C	21-36	227,4
F1D	37-70	158,8

As subfrações obtidas pelo fracionamento da fração F1 foram submetidas a análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o intuito de verificar possíveis classes de compostos pelos espectros UV-VIS de cada composto.

3.2.3 Análise cromatográfica das subfrações originadas a partir de F1

Para a análise cromatográfica das quatro subfrações (F1A – F1D), foram preparadas soluções em acetonitrila com concentração de 1 mg mL^{-1} e filtradas com filtro de teflon (3 mm, $20\text{ }\mu\text{m}$). Em seguida, $20\text{ }\mu\text{L}$ das amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna analítica de fase reversa C18. Como fase móvel foi utilizada acetonitrila e água ultrapura com um fluxo de 1 mL min^{-1} com eluição no modo gradiente conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Gradiente de eluição

Tempo (min.)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	60	40
8	60	40
45	0	100
55	60	40
60	60	40

3.2.4 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa

De acordo com o cromatograma e espectros UV-VIS, a subfração F1B foi selecionada para purificação de compostos. Para tal, foi utilizado CLAE semi-preparativa utilizando coluna C18. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água ultrapura com um fluxo de 2,0 mL min⁻¹ e eluídos com gradiente de polaridade conforme tabela 3.

A fração injetada foi solubilizada em acetonitrila e preparada em concentração de 11 mg mL⁻¹ seguidas de filtração com filtro teflon (3 mm, 20 µm) e repetidas injeções com volume de 75 µL até o esgotamento da solução preparada. Como resultado foi isolado o composto **1** com cor amarela na forma de uma goma com massa de 10 mg.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Fracionamento cromatográfico

O Fracionamento cromatográfico realizado com a fase em acetato de etila das folhas de *Hydrocotyle leucocephala* resultou no isolamento de uma substância

A etapa determinante para o isolamento da substância foi a purificação por CLAE semi-preparativa. A análise cromatográfica representada pelo cromatograma apresentado na figura 7 revela a presença de dois constituintes majoritários. O composto 1 tem seu espectro UV-VIS (Figura 8) característico de lignana destes dois compostos apontam características de substâncias de interesse com base na comparação com dados da literatura (RAMOS, *et. al.*, 2006)

Figura 7: Cromatograma do grupo F1B

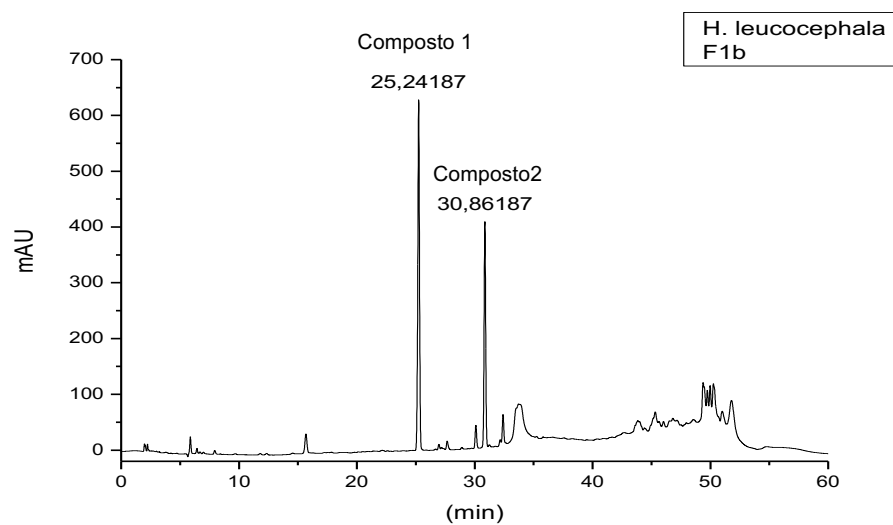
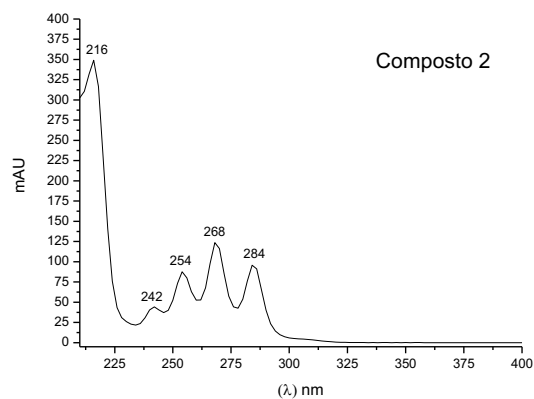
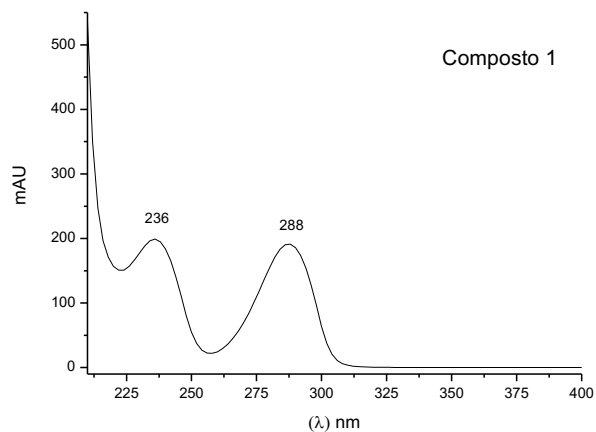


Figura 8: Espectro de absorção UV-VIS para dois compostos presentes no grupo F1B



4.2 Determinação estrutural composto 1

Nos espectros de RMN de ^1H do composto **1** (Figura 9) foram observados sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamento químico na faixa de δ 6,72 – 6,46. Os simpletos que contam com valor de integral de 4 hidrogênios observados na região de δ 5,93 (4H) são característicos de grupo metilenodioxifenílicos. Assim, pode-se atribuir duas unidades de metilenodioxifenílicas ao composto analisado.

Os sinais presentes em δ 4,12 (*dd*, 1H) e δ 3,86 (*dd*, 1H) foram assinalados respectivamente aos hidrogênios alifáticos H-9' da lactona.

Os hidrogênios H-7', H-8 e H-8' são identificados pelos multipletos na região de δ 2,50 -2,61 (m), δ 2,42 - 2,48 (m) e δ 2,50 – 2,61 (m).

Por sua vez, os hidrogênios em H-7 de **1** são identificados pelos sinais em δ 2,84- δ 2,97 (*dd*).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10) os sinais dos carbonos C-7 e C-7' são observados na em δ 35,0 e 38,5, respectivamente, indicando que os substituintes benzílicos na butirolactona estão em configuração *trans*. O sinal em δ 101,1(CH₂) confirmou a presença do anel metilenodioxifenílico. No espectro é observado sinal em δ 178,5, característico da carbonila C-9. Demais sinais característicos do anel butirolactonico são observados em δ 46,6, 41,4 e 71,2 referentes aos carbonos C-8, C-8' e C-9', respectivamente.

Figura 9: Espectro de RMN de ^1H da Hinokinina (δ /ppm, CDCl₃, 500 MHz)

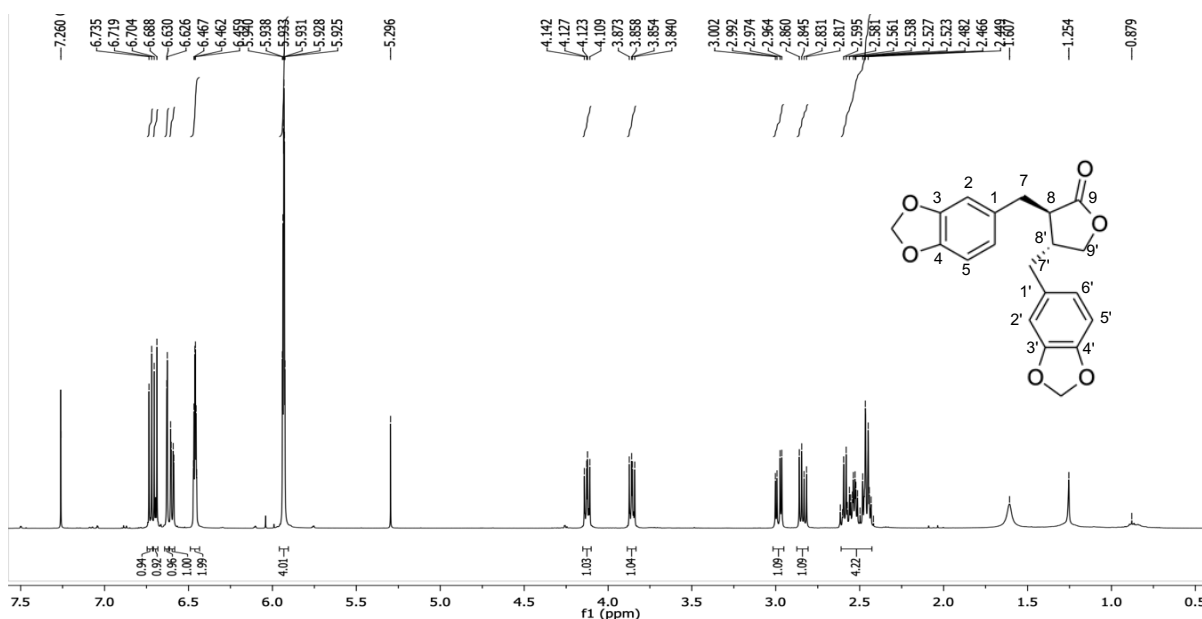
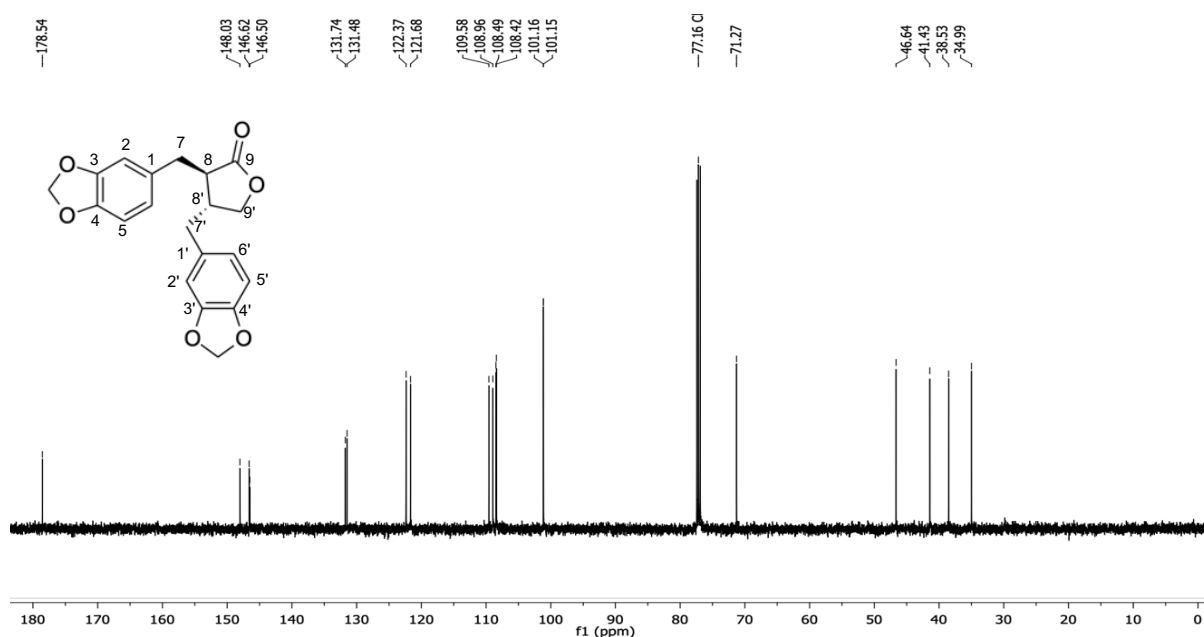
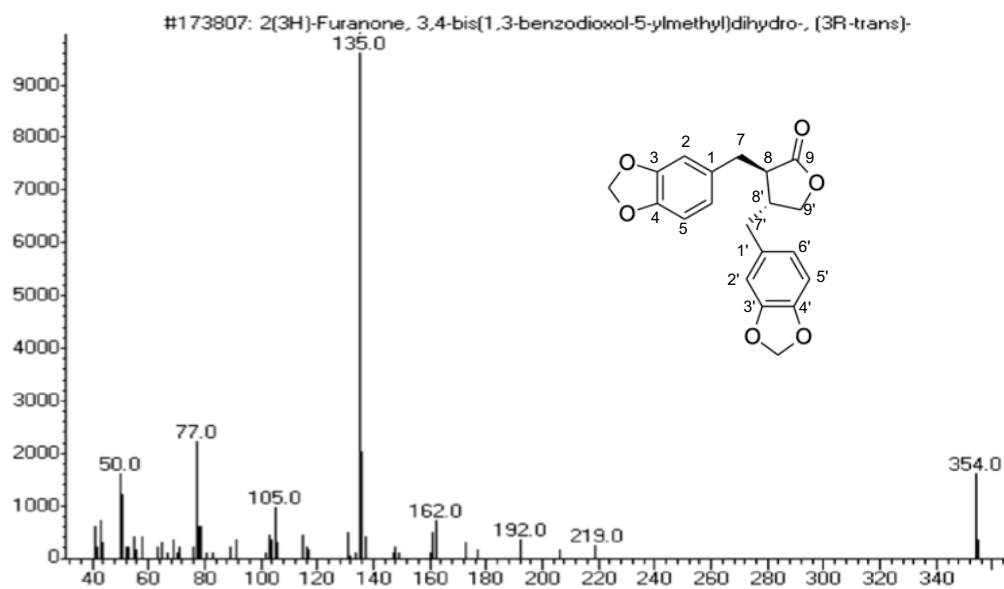


Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C da Hinokinina (δ /ppm, CDCl₃, 125 MHz)



O espectro de massas do composto 1 (Figura 11) obtido com ionização por elétrons apresentou o pico do íon molecular com $m/z = 354$ Da compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_6$. O pico base apresentou $m/z = 135$ Da compatível com o fragmento metilenodioxílico.

Figura 11: Espectro de massas da Hinokinina (ionização por elétrons a 70eV).



Tanto os dados de RMN de 1H como de RMN de ^{13}C foram comparados com resultados presentes na literatura (Tabela 4) para confirmar a identidade estrutural da substância (Takaku et. al, 2001).

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Hinokinina (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz).

<i>Posição</i>	δ_{H} (multipl., J/Hz)	δ_{H} Lit.	δ_{C}	δ_{C} Lit.
1	-	-	131,7	131,6
2	6,46 (m)	6,39 (dd, 8,0, 2,0)	108,5	108,8
3	-	-	148,0	147,9
4	-	-	146,6	146,4
5	6,72 (d, 8,0)	6,66 (d, 8,0)	108,9	108,3
6	6,60 (dd, 8,0, 2,0)	6,53 (dd, 8,0, 2,0)	122,3	122,2
7	2,97 (dd, 14,0 e 5,0)	2,91 (dd, 14,0, 5,0)	35,0	34,8
	2,84 (dd, 14,2, 7,5)	2,77 (dd, 14,0, 7,5)		
8	2,42 – 2,48 (m)	2,46 (ddd, 8,0, 7,5, 5,0)	46,6	46,5
9	-	-	178,5	178,3
1'	-	-	131,5	131,3
2'	6,62 (d, 2,0)	6,56 (d, 2,0)	108,4	109,4
3'	-	-	148,0	147,9
4'	-	-	146,5	146,5
5'	6,69 (d, 2,0)	6,63 (d, 8,0)	109,6	108,2
6'	6,46 (m)	6,39 (dd, 8,0, 2,0)	121,6	121,5
7'	2,50 – 2,61 (m)	2,52 (m)	38,5	38,4
	2,50 – 2,61(m)	2,39 (m)		
8'	2,50 – 2,61(m)	2,39 (m)	41,4	41,3
9'	4,12 (dd, 9,2, 7,5)	4,06 (dd, 9,0, 7,0)	71,2	71,1
	3,86 (dd, 9,2, 7,5)	3,86 (dd, 9,0, 7,5)		
-OCH ₂ O-	5,93 (s)	5,86 (s)	101,1	101,0

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado resultou no isolamento e caracterização estrutural de uma substância, Hinokinina que teve sua identidade estrutural conformada com base nos resultados de RMN de ^1H e ^{13}C , além de espectrometria de massas. Além da Hinokinina, o composto **2** está em fase de purificação e identificação estrutural.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, A. W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., J. HUFF, HOFFMAN, C., J. ROTHROCK, LOPEZ, M., JOSHUA, H., HARRIS, E., A. PATCHETT, MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY, E., ALBARS-SCHONBERG, G., HENSENS, O., J. HIRSHFIELD, K. HOOGSTEN, J. LIESCH, SPRINGER, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **77**, 3957-3961.
- BEAUDOIN, G. W., FACCHINI, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 1-14.
- CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., ORR-EWING, J., SANDERS, A. G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet* **236**, 226-228.
- CHAMBERS, P. A., LACOUL, P., MURPHY, K. J., THOMAZ, S. M. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 9-26, 2008.
- DEMAIN, A. L., VAISHNAV, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology* **4**, 687-699.
- ENDO, A. (1979). Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *The Journal of Antibiotics* **32**, 852-854.
- FLEMING, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Journal of Experimental Pathology* **10**, 226-236.
- GRECA, M. D., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. Polyoxygenated oleanane triterpenes from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Phytochemistry*, v.35, 201-204, 1993.
- ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de limnologia: 3 ed. *Editora Interciência*, 2011.
- FIASCHI, P. *Araliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5122>> acesso em 20/01/2021.
- FLORENTINO, I. F., NASCIMENTO, M. V. M., GALDINO, P. M., BRITO, A. F. D., ROCHA, F. F. D., TONUSSI, C. R., LIMA, T. C. M. D., PAULA, J. R. D., COSTA, E. A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., *Araliaceae* (acaricoba) in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, 987-997, 2013.
- HUANG, H.-C., LIAW, C.-C., ZHANG, L.-J., HO, H.-U., KUO, L.-M. Y., SHEN, Y.-C., KUO, Y.-H. Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry*, v. 69, 1597-1603, 2008.
- IRGANG, B. E.; PEDRALLI, G.; WAECHETER, J. L. Macrófitos aquáticos da estação ecológica do Taim. *Roessléria*, v. 6, p. 395-404, 1994.
- LUCH, A. (2009). Molecular, clinical and environmental toxicology. *Springer* **1**, p. 20.

MATSUSHITA, A., SASAKI, Y., WARASHINA, T., MIYASE, T., NOGUCHI, H., VANDER VELDE, D. Hydrocotylosides I–VII, New Oleanane Saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Journal of Natural Products*, v. 67, 384-388, 2004.

RAMOS, F., TAKAISHI, Y., KAWAZOE, K., OSORIO, C., DUQUE, C., ACUÑA, R., FUJIMOTO, Y., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., AHMED, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. *Phytochemistry*, v. 67, 1143-1150, 2006.

SILVA, C. B., CÂNDIDO, A. C. S., SIMIONATTO, E., FACCENDA, O., SCALON, S. D. P. Q., PERES, M. T. L. P. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). *Technology Acta Scientiarum* v. 32, 413-420, 2010.

TABOPDA, T. K., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., NGADJUI, B. T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochemistry*, v.73, 142-147, 2012.

TAKAKU N., CHOI, D., MIKAME, K., OKUNISHI, T., SUZUKI, S., OHASHI, H., UMEZAWA, T. (2001) *Journal of wood science* **47**, 476-482.

TOBERT, J. A. (2003). Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews* **2**, 517-526.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., MCPHAIL, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 2325-2327.

Contatos: lets_mello@hotmail.com e edgard.ferreira@mackenzie.br