

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

ANA PAULA PALARO KLEIN

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE CAPIM ANNONI-2
(*Eragrostis plana* Nees) COLETADAS NO INVERNO E
VERÃO**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2015

ANA PAULA PALARO KLEIN

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE CAPIM ANNONI-2
(*Eragrostis plana* Nees) COLETADAS NO INVERNO E
VERÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2015



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 29

Título da Dissertação

**“ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE CAPIM ANNONI-2 (ERAGROSTIS
PLANA NEES) COLETADAS NO INVERNO E VERÃO”**

Autora

Ana Paula Palaro Klein

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 25 de maio de 2015, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias Teixeira - UTFPR
Presidente

Prof^a. Dr^a. Marlene Capelin Ignoato - UTFPR
Examinador

Prof^a. Dr^a. Alessandra Machado Lunkes-
UTFPR-FB
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof.^a Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar ao meu lado sempre e me ajudar principalmente nos momentos em que tudo parecia dar errado.

Aos meus pais e ao meu marido pelo carinho, companheirismo e compreensão.

À Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias Teixeira pela orientação, dedicação, incentivo, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pelos conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

Ao CNPq (processo: 484934/2011-2) pela aquisição do software Pirouette versão 4.0 (Infometrix, Seattle, Washington, USA).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

KLEIN, Ana Paula P. Estudo Fitoquímico das Folhas de Capim Annoni-2 (*Eragrostis Plana* Nees) Coletadas no Inverno e Verão. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

O Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma *poaceae* que apresenta potencial alelopático conforme observado em trabalhos anteriores. Neste estudo os extratos, obtidos com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo, acetato de etila e metanol), das folhas de Capim Annoni-2, coletadas no verão e inverno, foram analisados e comparados, levando-se em conta composição e/ou concentração de metabólitos produzidos, utilizando-se técnicas de Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, sendo que, os dados de Infravermelho foram comparados estatisticamente por PCA, em seguida realizou-se o fracionamento dos extratos de acetato de etila verão e inverno, as substâncias isoladas foram identificadas através de métodos espectrométricos e espectroscópicos: RMN de ^1H e ^{13}C , experimentos de HSQC e HMBC e CG-EM. Verificou-se que os extratos apresentam riqueza em termos de provável variedade de compostos químicos, além disso, observa-se que os solventes utilizados para a extração resultam, estatisticamente, em maiores diferenças, em termos de composição química, do que a estação do ano em que as folhas foram coletadas. Foram identificadas duas substâncias resultantes do fracionamento do extrato de acetato de etila verão, um triacilglicerol e um rotenóide. A presença de um rotenóide nas folhas de Capim Annoni-2, pode justificar a ação alelopática observada nesta espécie em outros trabalhos.

Palavras-chave: Metabólitos. Poaceae. Sazonalidade.

ABSTRACT

KLEIN, Ana Paula P. Phytochemical study of leaves Annoni-2 grass (*Eragrostis plana* Nees) collected in winter and summer. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

The Annoni-2 grass (*Eragrostis plana* Nees) is a *poaceae* that presents allelopathic potential as observed in other research. In this study, the extracts were obtained from leaves collected during summer and winter. The extraction process was performed using solvents in a increasing order of polarity (petroleum ether, ethyl acetate and methanol) and the extracts were analyzed and compared regarding the composition and/or concentration of metabolites produced. The techniques utilized were high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy, and, the data obtained from the infrared analysis was compared using PCA, then the fractionation of summer and winter ethyl acetate extracts was carried out and the isolated compounds were identified by spectrometric and spectroscopic methods: NMR ^1H and ^{13}C , experiments of HSQC and HMBC and GC-MS. The results show the extracts are rich when it comes to probable variety of chemical compounds. It is also observed that, statistically, the solvents used in the extraction process influence the diversity of chemical compounds more than the season in which the leaves were collected. Triacylglycerol and rotenoid were identified from the fractionation summer ethyl acetate extract, and the presence of a rotenoid in the leaves of Annoni-2 grass, can justify the allelopathic action observed in this species in other works.

Keywords: Metabolites. Poaceae. Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via metabólica da biossíntese de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides	20
Figura 2 - Núcleo fundamental de flavonoides e alguns tipos de flavonoides resultantes da modificação na estrutura dos três átomos de carbono que ligam os anéis aromáticos	21
Figura 3 - Estrutura química de tanino hidrolisável	22
Figura 4 - Estrutura química de tanino condensado	23
Figura 5 - Estrutura química da cafeína	25
Figura 6 - Estrutura química da nicotina.....	25
Figura 7 - Esquema da biossíntese de terpenos	26
Figura 8 - Estrutura química de um monoterpeneo (Limoneno)	27
Figura 9 - Estrutura do beta-caroteno	28
Figura 10 - Estrutura zeaxantina	28
Figura 11 - Diagrama de um espectrômetro de massas	32
Figura 12 - <i>Eragrostis plana</i> Nees A) estação experimental da UTFPR – câmpus de Pato Branco; B) folhas coletadas.	33
Figura 13 - a) Extração a frio das folhas de Capim Annoni-2 com éter de petróleo- b) Filtração do extrato bruto - c) Evaporação do solvente do extrato bruto de Capim Annoni-2 utilizando evaporador rotativo.	39
Figura 14 - Espectro de infravermelho do extrato de éter de petróleo folha verão (em preto) X inverno (em vermelho), a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010)	45
Figura 15 - Espectro de infravermelho do extrato de acetato de etila folha verão (em vermelho) X inverno (em preto), a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010)	47
Figura 16 - Espectro de infravermelho do extrato de metanol folha verão (em vermelho) X inverno (em preto) a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010).	48
Figura 17 - Exclusão das variáveis utilizando o programa Pirouette, as áreas em amarelo representam as regiões excluídas.....	50
Figura 18 - Gráfico de scores obtido por PCA das duplicatas dos extratos folha verão metanol (FVM), folha inverno metanol (FIM), folha verão acetato de etila (FVA) folha inverno acetato de etila (FIA) folha verão éter de petróleo (FVE) e folha inverno éter de petróleo (FIE), as regiões circuladas representam a separação segundo a PC1.51	
Figura 19 – Cromatograma ampliado dos extratos de éter de petróleo verão (linha preta) e inverno (linha rosa) representando a área de maior concentração dos sinais	53
Figura 20 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais dos extratos de éter de petróleo verão (linha rosa) e inverno (linha preta), setas indicam os sinais do extrato mais diluído (verão) que são mais intensos que os sinais do extrato mais concentrado (inverno)	54
Figura 21 - Cromatograma ampliado dos extratos de acetato de etila verão (linha rosa) e inverno (linha preta) representando a área de maior concentração de sinais	55
Figura 22 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais do extrato de acetato de etila verão (linha rosa) e inverno (linha preta), as setas	

indicam os sinais do extrato mais diluído (verão) que são mais intensos que os sinais do extrato mais concentrado (inverno).....	56
Figura 23 - Cromatograma ampliado dos extratos de metanol verão (linha preta) e inverno (linha rosa) representando a área de maior concentração dos sinais	57
Figura 24 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre cromatogramas do extrato de acetato de etila verão (linha preta) e inverno (linha rosa), as setas indicam alguns sinais que se destacam por estarem em maior intensidade quando comparados os dois extratos.	58
Figura 25 - Comparação entre os extratos de éter de petróleo inverno folha (linha cinza), acetato de etila inverno folha (linha preta), metanol inverno folha (linha rosa)	59
Figura 26 - Comparação entre os extratos de éter de petróleo verão folha (linha cinza), acetato de etila verão folha (linha preta), metanol verão folha (linha rosa)....	60
Figura 27 - Cromatograma do extrato de folha éter de petróleo verão.....	61
Figura 28 – Cromatograma do extrato de folha acetato de etila verão.....	61
Figura 29 - Comparação entre os extratos éter de petróleo raiz (linha preta) e éter de petróleo inverno (linha rosa).....	62
Figura 30 - Áreas ampliadas dos extratos de éter de petróleo raiz (linha preta) e éter de petróleo folha (linha rosa), a seta indica o pico majoritário no extrato da raiz	63
Figura 31 - Cromatograma dos extratos de acetato de etila raiz (linha preta) e acetato de etila folha (linha rosa)	64
Figura 32 - Áreas ampliadas dos extratos de acetato de etila raiz (linha preta) e acetato de etila folha (linha rosa), a seta indica o pico majoritário no extrato da folha	65
Figura 33 - Espectro dos extratos de etanol raiz (linha rosa) e metanol folha (linha preta).....	66
Figura 34 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais do extrato de metanol folha (linha preta) e etanol raiz (linha rosa), as setas indicam alguns sinais que se destacam por estarem em maior intensidade quando comparados os dois extratos.....	67
Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto F7a	81
Figura 36 - Expansões relevantes do espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto F7a, ilustrando as constantes de acoplamento	81
Figura 37 - Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do composto F7a.....	82
Figura 38 - Estrutura do composto F7a, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de HMBC	83
Figura 39 - Esquema das propostas de fragmentação de massas para o composto F7a	84
Figura 40 - Proposta de fragmentação para o sinal mais intenso do espectro de massas utilizando rearranjo de McLafferty	85
Figura 41 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto A-3.....	86
Figura 42 - Expansões relevantes do espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto A-3, ilustrando as constantes de acoplamento	87
Figura 43 - Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do composto A-3	87
Figura 44 - Estrutura do composto A-3, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de HMBC.....	89
Figura 45 - Esquema das propostas de fragmentação de massas para o composto A-3.....	90

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F1. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	69
Fluxograma 2 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F2. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	70
Fluxograma 3 - Substâncias obtidas a partir da purificação da fração F4. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	71
Fluxograma 4 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações F5 e F6. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	72
Fluxograma 5 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F7. *Substância analisada por RMN ¹ H.....	73
Fluxograma 6 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 6I e 7I. *Substância analisada por RMN ¹ H.....	75
Fluxograma 7 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 8I e 9I. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	76
Fluxograma 8 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 11I e 12I. .	77
Fluxograma 9 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 37I e 38I. *Substâncias analisadas por RMN ¹ H	78
Fluxograma 10 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 40I e 41I	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extrato seco (folhas) e rendimento dos extratos brutos de Capim Annoni-2	43
Tabela 2 - Frações obtidas a partir de coluna cromatográfica do extrato de Acetato de Etila verão (1 g)	68
Tabela 3 - Frações obtidas a partir de coluna cromatográfica do extrato de Acetato de Etila Inverno (0,5 g)	74
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para o composto F7a.....	82
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para o composto A-3.....	88

SIGLAS

Acet	Acetato de Etila
HCA	Análise por Agrupamento Hierárquico
PCA	Análise dos Componentes Principais
J	Constante de Acoplamento
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
δ	Deslocamento Químico
DCM	Diclorometano
D	Dupleto
Dd	Duplo Dupleto
eV	Elétron-volt
EP	Éter de Petróleo
EM	Espectrometria de Massas
Rf	Fator de Retenção
FIA	Folha Inverno Acetato
FIE	Folha Inverno Éter
FIM	Folha Inverno Metanol
FVA	Folha Verão Acetato
FVE	Folha Verão Éter
FVM	Folha Verão Metanol
γ	Gama
HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HSQC	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
MHz	Mega-hertz
M	Multiplete

Π	Pi
PC1	Primeira Componente Principal
r/m	Razão massa carga
RS	Rio Grande do Sul
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
PC2	Segunda Componente Principal
S	Singleto
TR	Tempo de Retenção
TMS	Tetrametilsilano
T	Tripleto
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	18
3.1.1 Compostos fenólicos.....	19
3.1.2 Alcaloides	23
3.1.3 Terpenos.....	25
3.2 PLANTAS DANINHAS E O USO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COMO HERBICIDAS NATURAIS	28
3.3 FITOQUÍMICA.....	30
3.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	31
3.5 <i>Eragrostis plana</i> Nees	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	37
4.2 SECAGEM E MOAGEM	38
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	38
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS BRUTOS.....	39
4.4.1 Infravermelho	39
4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	40
4.4.3 Tratamento Estatístico	40
4.5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA VERÃO E INVERNO.....	41
4.5.1 Cromatografia em Coluna.....	41
4.5.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa	42
4.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS BRUTOS.....	43
5.1.1 Infravermelho	44
5.1.2 Análise dos Componentes Principais.....	49
5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	53
5.1.3.1 Éter de petróleo - Folhas - Verão X Inverno	53
5.1.3.2 Acetato de Etila - Folhas - Verão X Inverno.....	55
5.1.3.3 Metanol – Folha - Verão X Inverno	57

.....	58
5.1.3.4 Folhas – Inverno – Éter de Petróleo X Acetato de Etila X Metanol.....	58
5.1.3.5 Folhas – Verão – Éter de Petróleo X Acetato de Etila X Metanol.....	59
5.1.3.6 Éter de Petróleo - Inverno - Folha X Raiz.....	62
5.1.3.7 Acetato de Etila – Inverno – Folha X Raiz.....	64
5.1.3.8 Metanol – Folha Inverno X Etanol – Raiz Inverno.....	65
5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	67
5.2.1 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila Verão.....	67
5.2.2 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila Inverno.....	73
5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA VERÃO.....	80
5.3.1 Substância F7a.....	80
5.3.2 Substância A-3.....	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas pelo homem desde a antiguidade para diversos fins, como para o tratamento e cura de doenças e na agricultura. Essa utilização se deve ao fato de as espécies, em especial as daninhas, possuírem capacidade de sintetizar metabólitos secundários (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários são substâncias químicas sintetizadas pelas plantas, desempenham diversas funções, dentre as quais podemos citar, proteção contra herbívoros e patógenos, comunicação planta - planta ou planta - microorganismo e alelopatia, fenômeno pelo qual algumas espécies interferem, de forma positiva ou negativa, no crescimento e desenvolvimento de outras plantas (FILHO, 2010; OOTANI et al., 2013; WINK, 2013).

As espécies daninhas causam enormes prejuízos à agricultura, pois interferem no desenvolvimento de plantas que são de interesse humano, alterando significativamente a qualidade da colheita e do produto final. Dessa forma é necessário o uso de herbicidas para o controle dessas espécies (SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008; DASTAN et al., 2014).

Contudo, a intensa utilização de herbicidas sintéticos está tornando as espécies daninhas cada vez mais resistentes a estes, além de causar enormes danos ao meio ambiente o que justifica a investigação de novas substâncias produzidas naturalmente que apresentem potencial ação herbicida (AGOSTINETTO, 2009; RIBEIRO; LIMA, 2011). Isso resultou em um aumento significativo no número de estudos a cerca da melhor maneira de isolar e caracterizar essas substâncias.

Sendo assim, a fitoquímica é de grande importância, pois, envolve o esclarecimento, a caracterização estrutural, a avaliação das propriedades biossintéticas e o registro de substâncias naturais produzidas pelas plantas (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; FILHO, 2010).

O *Eragrostis plana* Nees, conhecido vulgarmente por Capim-Annoni-2, foi introduzido acidentalmente no Brasil em 1950. Possui atributos de planta invasora, e é responsável por prejuízos econômicos e sociais nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo este último, o estado mais afetado por essa daninha (ZENNI; ZILLER, 2011). O Capim Annoni-2 apresenta efeito alelopático o

que justifica o seu domínio sobre as demais espécies (MEDEIROS; FOCHT, 2007; FERREIRA MEDEIROS; SOARES, 2008a; GOULART et al., 2012).

Dentro desse contexto, aliado a escassez de literatura sobre o assunto, este trabalho tem por objetivo analisar e comparar, por meio de técnicas de IV e CLAE, os extratos de folhas de Capim Annoni-2 obtidos com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo, acetato de etila e metanol), além de isolar e identificar substâncias presentes nos extratos de acetato de etila, provenientes das folhas de *Eragrostis Plana* Nees, coletadas no verão e no inverno.

É importante ressaltar que este projeto faz parte de uma proposta de estudo do Capim Annoni-2, desenvolvida em parceria com o Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi. Alguns resultados provenientes desse estudo já foram obtidos, a partir da realização de testes alelopáticos com extratos brutos de folhas de Capim Annoni-2, coletadas no inverno e verão, utilizando os solventes éter de petróleo, acetato de etila e metanol (DALBOSCO, 2013). Com base nesses resultados, foi elaborado este trabalho, dando continuidade ao estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar estudo fitoquímico das folhas de Capim Annoni-2 (*E. plana* Nees) coletadas no verão e no inverno, no município de Pato Branco-PR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os extratos brutos obtidos de folhas de Capim Annoni-2 por IV e CLAE;
- Comparar os dados de IV-TF dos extratos brutos por meio da análise dos Componentes Principais (PCA);
- Realizar estudo fitoquímico, por meio de fracionamento e purificação, do extrato de acetato de etila verão e inverno;
- Realizar a identificação dos possíveis metabólitos isolados dos extratos de acetato de etila, por RMN ^1H , RMN ^{13}C , bidimensionais (HSQC e HMBC) e CG-EM;
- Realizar uma correlação entre os resultados da análise fitoquímica com os resultados obtidos em testes alelopáticos realizados em trabalhos anteriores.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são substâncias químicas sintetizadas pelas plantas, indispensáveis na adaptação e propagação das espécies vegetais (OLIVEIRA et al., 2011).

A bioatividade dos metabólitos secundários vem sendo explorada desde a Grécia antiga, nesse período a ingestão de remédios preparados a partir de ervas e folhas para o alívio e cura de doenças era muito comum (PAVARINI et al., 2012). Hoje os metabólitos secundários exibem diversas aplicações em muitas áreas, isso se deve ao fato de atuarem como agentes antibacterianos ou antifúngicos, agentes redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários e herbicidas (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

A descoberta de muitos desses compostos foi determinante no tratamento ou prevenção de uma variedade de distúrbios biológicos, que até então não apresentavam cura. Além disso, apresentam interessantes aplicações para o tratamento de doenças graves, como mal de *Alzheimer*, doenças cardiovasculares, doenças virais entre outras (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Os metabólitos secundários são específicos para cada espécie de organismo vivo, e participam das interações que ocorrem no próprio organismo ou com células de outros organismos. No caso específico de plantas, auxiliam no processo de polinização produzindo substâncias que atraem os agentes vivos, além de contribuir para a resistência dos organismos, na defesa contra pestes e outras doenças (FILHO, 2010). Sendo assim, são de grande importância para a agricultura, pois, ajudam a afastar os fungos, bactérias e herbívoros, assim como, podem tornar a planta indesejável como alimento para seres humanos e animais (TAIZ; ZEIGER, 2006). Pode-se afirmar, portanto, que os metabólitos secundários são a forma encontrada pelas plantas para se comunicar ou responder a estímulos externos (PAVARINI et al., 2012).

Uma planta pode interferir no crescimento e no desenvolvimento de sistemas biológicos por meio do fenômeno conhecido como alelopatia, que envolve a interação química de plantas e microorganismos através da produção e liberação no ambiente de compostos provenientes do metabolismo secundário. Esses compostos são conhecidos como aleloquímicos ou agentes aleloquímicos (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008a; OLIVEIRA et al., 2012).

Aleloquímicos são substâncias que podem ser produzidas em qualquer parte da planta, sendo que sua presença pode variar em quantidade e qualidade e de espécie para espécie, visto que sua ocorrência e síntese sofrem influência de fatores genéticos e ambientais. Essas substâncias podem ser lançadas no meio ambiente de várias maneiras, como exemplo, pode-se citar a volatilização das substâncias presentes nas partes aéreas da planta e a decomposição de seus tecidos no solo (VIDAL, 2010; LI et al., 2011).

Essas substâncias produzidas pelas plantas (atuando como aleloquímicos ou não), pertencem a uma grande variedade de classes de metabólitos, como pode ser observado no trabalho de Scrivanti, Anton e Zygadlo (2009) que estudando a composição do óleo essencial de espécies da família *poaceae*, identificaram, monoterpenos, sesquiterpenos e ésteres.

Na sequência apresenta-se o relato de três grandes grupos de metabólitos secundários, compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2006).

3.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos consistem em um ou mais anéis aromáticos que contém um ou mais grupos hidróxido (TARAHOVSKY et al., 2014) e são sintetizados principalmente a partir da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados deste (Figura 1) (OOTANI et al., 2013).

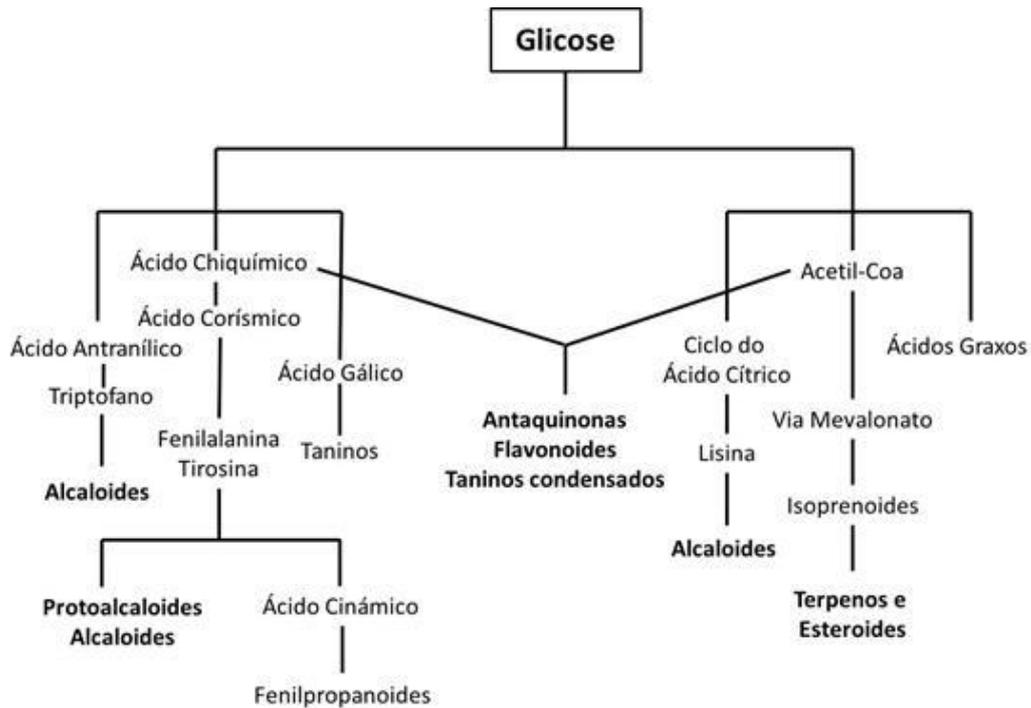


Figura 1 - Via metabólica da biossíntese de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides

Fonte: Adaptado de Ootani (2013).

Os flavonoides são compostos polifenólicos, que possuem o esqueleto básico formado por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de três átomos de carbono (C3) (SIMÕES et al., 2004) e sua classificação é baseada em diferenças na estrutura dos três átomos de carbono que ligam os anéis aromáticos. As características desta cadeia de C3 estão associadas com a presença ou ausência da ligação dupla, a escolha de uma porção carbonila ou carboxila e a possibilidade de formação de um anel C penta ou hexagonal (TARAHOVSKY et al., 2014). Cada modificação na cadeia de C3 resulta em uma enorme diversidade de flavonoides, dentre os quais pode-se destacar os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, os flavanóis (ou catequinas), as antocianidinas e as isoflavonas (Figura 2) (MORTON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2010).

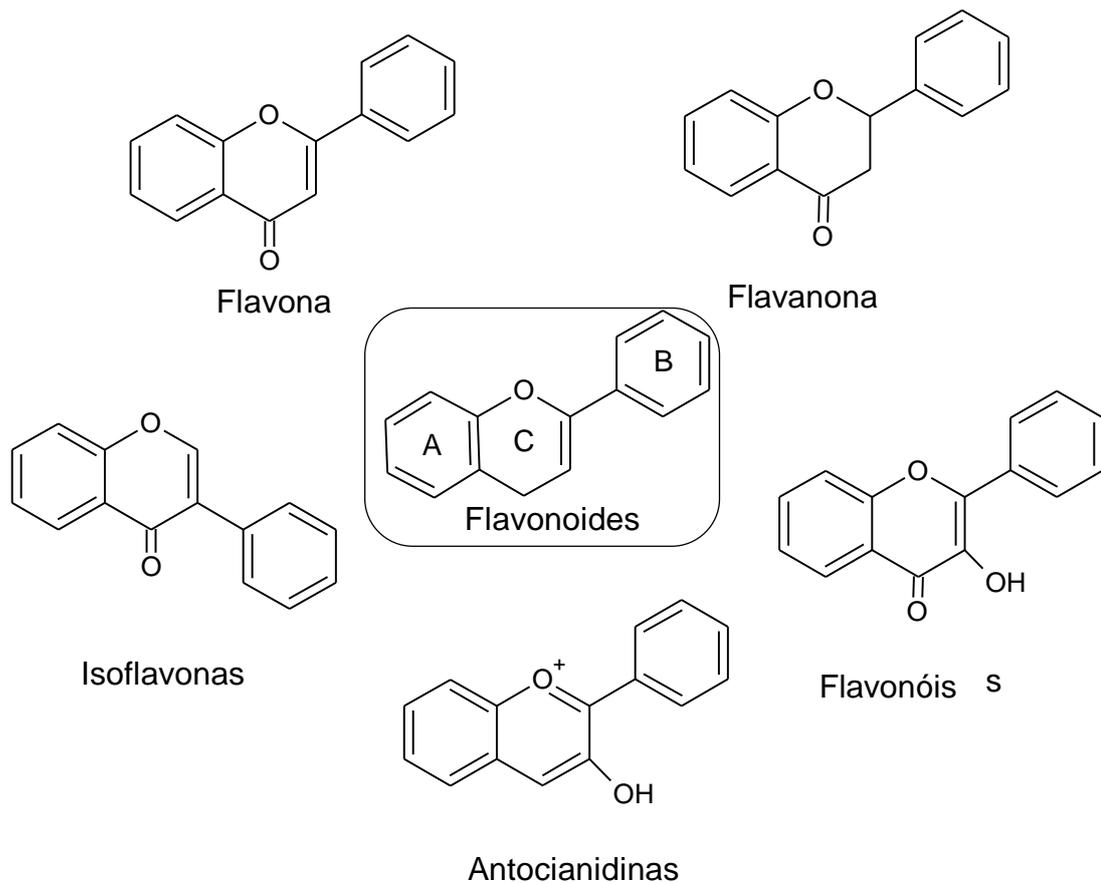


Figura 2 - Núcleo fundamental de flavonoides e alguns tipos de flavonoides resultantes da modificação na estrutura dos três átomos de carbono que ligam os anéis aromáticos
 Fonte: Adaptado de Tarahovsky et al. (2014).

Essa diversidade estrutural permite que os flavonoides executem funções biológicas variadas, tais como, auxiliar no processo de polimerização, enviar sinais moleculares para a interação de plantas com microorganismos, eliminar radicais livres, atuar como anticancerígeno e anti-inflamatório, além de, estarem envolvidos nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (SUHARTONO et al., 2012; LIU et al., 2013).

Segundo Agati et al. (2012) os flavonoides podem atuar como antioxidantes na planta, principalmente quando a mesma está sob condições de grande estresse, ou seja, a biossíntese dos flavonoides é mais intensa em espécies sensíveis ao estresse do que em espécies tolerantes a ele.

Os taninos são compostos fenólicos de elevada massa molar que possuem grande interesse econômico e ecológico. Eles podem ser encontrados na maioria dos vegetais, sendo comuns tanto em espécies gimnospermas, como angiospermas (KHANBABAEE; REE, 2001; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; SEKOWSKI

et. al, 2014). Os taninos são classificados de acordo com sua estrutura em taninos condensados e taninos hidrolisáveis (KOLECKAR et. al, 2008; SEKOWSKI et. al, 2014).

Os taninos hidrolisáveis (Figura 3) são unidos por ligações éster-carboxila. São caracterizados por um polioliol central, geralmente β -D-glicose, cujas funções hidroxila são esterificadas com o ácido gálico (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; SIMÕES, 2004).

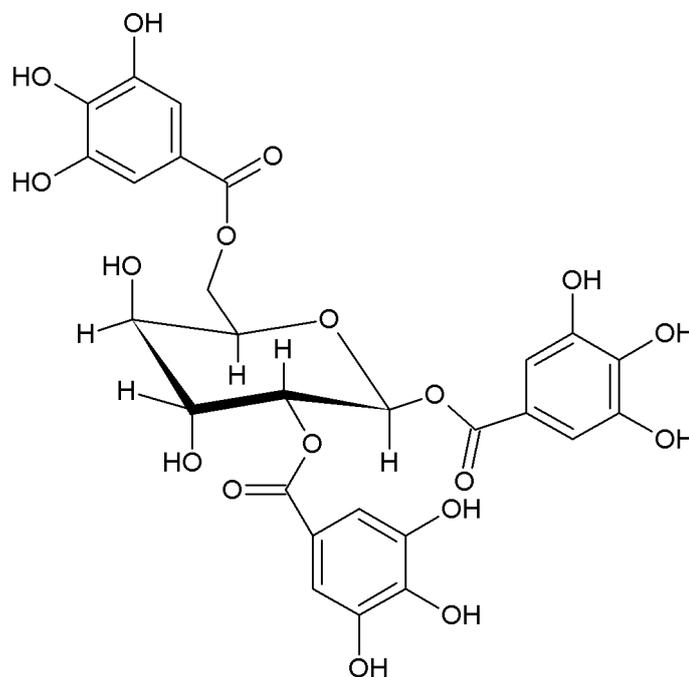


Figura 3 - Estrutura química de tanino hidrolisável

Os taninos condensados (Figura 4) ou proantocianidinas são formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol (catequina) e flavan 3,4-diol (leucoantocianinas) podendo conter de duas a cinquenta unidades de flavonoides (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Os taninos são responsáveis pela sensação de adstringência em vinhos, chás, sucos e outras bebidas. Nas plantas, acredita-se que eles participem na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra microorganismos patogênicos (SIMÕES, 2004).

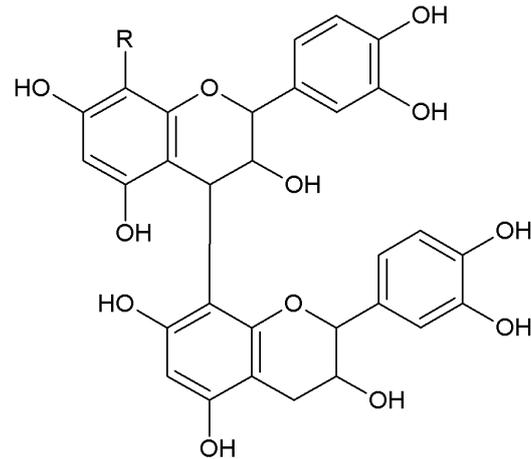


Figura 4 - Estrutura química de tanino condensado

3.1.2 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas (BESSA; TERRONES; SANTOS, 2007). Essa classe de compostos vem se tornando cada vez mais importantes devido ao seu elevado consumo na dieta humana, seu uso como medicamentos, sua biodisponibilidade e suas propriedades biológicas (HE et al., 2014).

A atividade biológica dos alcaloides abrange uma série de propriedades, que incluem, anticancerígena, antiparasitária, anti-inflamatória, antimicrobiana, inseticida, entre outras (NEBO et al., 2014). Eles podem ser derivados do ácido antranílico, triptofano, fenilalanina, histidina, ácido nicotínico, ornitina ou lisina e, em alguns casos, podem ser derivados de dois precursores (SIMÕES, 2004). Observa-se, com base na via do ácido chiquímico (Figura 1), que o ácido corísmico gera os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Desde os tempos antigos os seres humanos têm usado alcaloides na forma de extratos vegetais como venenos, estimulantes e narcóticos. Talvez o caso mais famoso envolvendo a utilização dessa classe de compostos como veneno seja a execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*), uma fonte do alcaloide coniína (HELDT, 2005).

Quase todos os alcaloides são tóxicos para os seres vivos quando ingeridos em quantidades suficientes (TAIZ; ZEIGER, 2006). Segundo Pavarini et al. (2012), a ingestão de plantas tóxicas que biossintetizam e acumulam altos níveis de alcaloides é a principal causa de morte do gado no sul do Brasil. Em doses mais baixas, no entanto, alguns alcaloides são úteis farmacologicamente, como a morfina que é muito utilizada na medicina (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A cafeína (Figura 5), por sua vez, é o alcaloide mais consumido no mundo moderno (HELDT, 2005). Ela é conhecida por ser uma substância psicoativa que pode contrariar a sensação de fadiga, além de afetar o sono, o estado de alerta, o humor e o desempenho, devido a um aumento da atividade do sistema nervoso central (HO; CHUNG, 2013).

Além disso, em se tratando de plantas, acredita-se que a cafeína apresenta um papel de defesa poderoso contra herbívoros (KIM; SANO, 2008). Quando altas concentrações de cafeína estão presentes na planta ela pode ajudar na defesa contra patógenos e herbívoros. Estudos alelopáticos propõem que a cafeína é liberada no solo durante a queda das folhas, o que ajuda a inibir a germinação de sementes ao redor das plantas-mães (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

Estudos realizados por Kim e Sano (2008) propõem que a cafeína pode ativar o sistema de defesa das plantas contra os estresses bióticos. Eles afirmam ainda que o mecanismo molecular para a ativação de genes de defesa por cafeína não é clara, mas que possivelmente ela estimula a produção de moléculas de sinalização, tais como ácido salicílico. O que sugere que os estudos de produção de cafeína podem fornecer uma nova tecnologia para produzir culturas tolerantes ao estresse biótico.

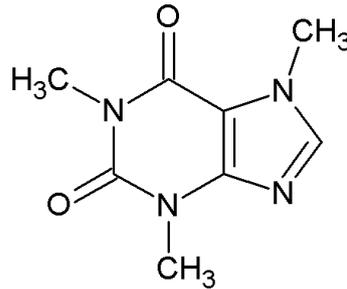


Figura 5 - Estrutura química da cafeína

A nicotina (Figura 6) é formada nas raízes do tabaco e pode ser utilizada como inseticida natural, pois protege as plantas nativas em seu habitat natural contra herbívoros. Quando as plantas de espécies que contém nicotina são atacadas por insetos ou outros animais, os níveis de alcaloides rapidamente tornam-se elevados, acredita-se que a ingestão de nicotina resulte em uma excitação contínua dos neurônios que leva o inseto à paralisia e até mesmo à morte. A nicotina também é responsável pelo elevado número de pessoas que consomem produtos de tabaco em função de seus efeitos viciantes (DEWEY; XIE, 2013).

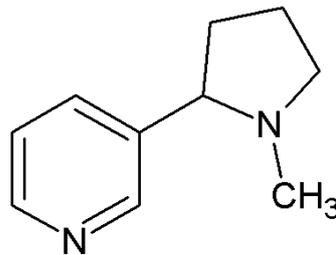


Figura 6 - Estrutura química da nicotina

3.1.3 Terpenos

Os terpenos são formados pela união sucessiva de unidades de cinco carbonos denominados isopentenilpirofosfato (IPP). O IPP é derivado do ácido

mevalônico ou mevalonato e dá origem a todos os outros terpenos (Figura 7) (PAVARINI et al., 2012).

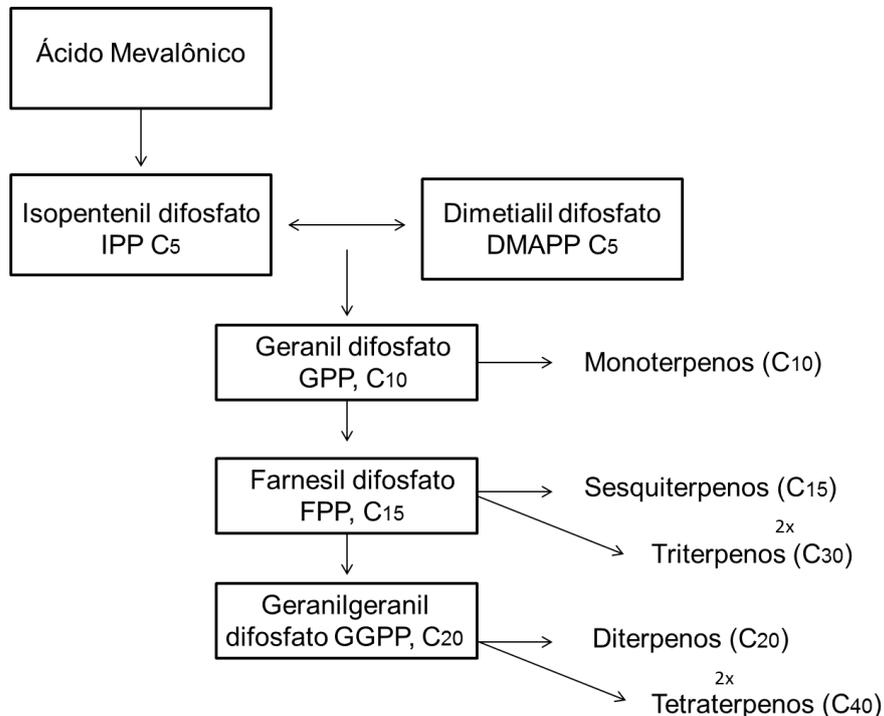


Figura 7 - Esquema da biossíntese de terpenos
Fonte: Adaptado de Ootani (2013).

Os terpenos tem a fórmula geral $(C_5H_8)_n$, geralmente são hidrocarbonetos insaturados de estrutura cíclica, mas podem apresentar grupos funcionais como hidroxila (OH) ou carbonila (C=O). Estes são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno ou IPP, que variam de 2 a 8. Os monoterpênicos, ou simplesmente terpenos (Figura 8), possuem duas unidades de isopreno, portanto, dez carbonos; os sesquiterpênicos, três unidades e os diterpênicos, quatro unidades. Ocorrem também os triterpênicos (30 átomos de carbono), entre outros (ARAÚJO, 2008; DEGENHARDT; KOLLNER; GERSHENZON, 2009).

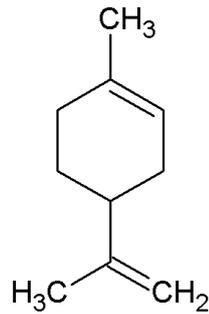


Figura 8 - Estrutura química de um monoterpeneo (Limoneno)

Os terpenos incluem 30.000 compostos com mais de 400 monoterpeneos de diferentes características de sabor e atividade biológica conhecida. Os monoterpeneos desempenham papéis importantes na saúde do ser humano por causa das suas atividades antibacteriana, antiviral, anticancerígena, entre outras. Estes compostos são caracterizados por aromas específicos e são produzidos naturalmente em frutas, legumes e ervas (KUPSKA, et al., 2014).

A maioria das plantas produz e emite um grande número de terpenos, que por serem voláteis, ajudam as plantas a atrair agentes polinizadores, podem participar na defesa contra fitopatógenos e herbívoros (YANG et al., 2013), além de possuírem efeitos inibitórios sobre a germinação de plantas (CARMO; LIMA; TAKAKI, 2007).

Dentre os terpenos mais importantes encontram-se os carotenoides (tetraterpenóides), responsáveis pela coloração na planta, podendo variar do amarelo ao vermelho (WONDRACEK et al., 2012). Existem, aproximadamente, 600 carotenoides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, denominados: carotenos (Figura 9), que consistem em hidrocarbonetos puros e xantofilas (Figura 10), hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (HAEGELE et al., 2000).

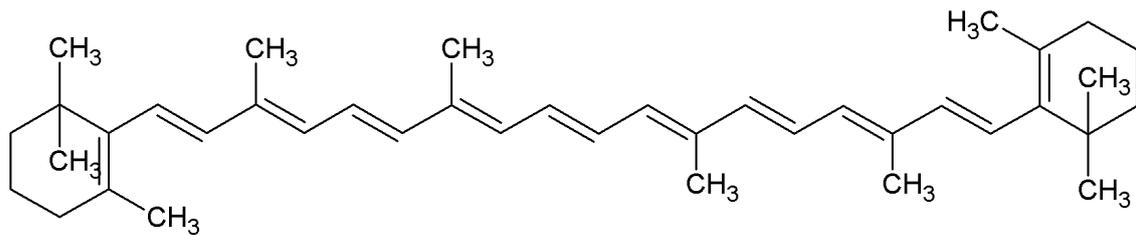


Figura 9 - Estrutura do beta-caroteno

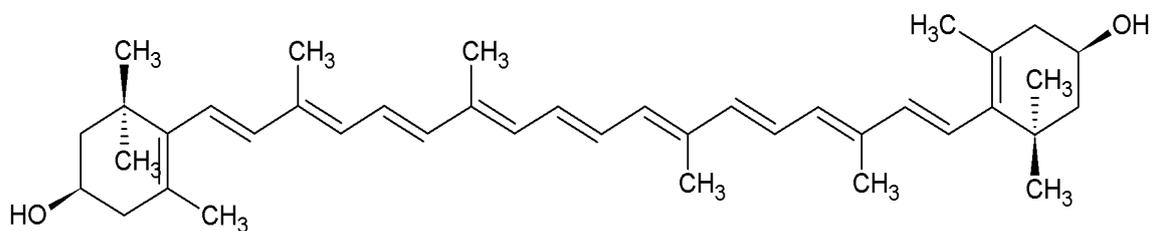


Figura 10 - Estrutura zeaxantina

Além de serem responsáveis pela coloração de frutas e vegetais os carotenoides também desempenham atividade pró-vitamina A e atividade antioxidante (VERONEZI; JORGE, 2011).

3.2 PLANTAS DANINHAS E O USO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COMO HERBICIDAS NATURAIS

São consideradas plantas daninhas aquelas espécies indesejáveis que interferem de forma negativa aos interesses do homem, além disso, são extremamente agressivas pois, são capazes de produzir uma grande quantidade de sementes, são pouco exigentes quanto as condições fisiológicas, possuem a capacidade de germinar e emergir de grandes profundidades, possuem grande facilidade de dispersão para grandes distâncias e apresentam rápido desenvolvimento e crescimento. Essas características contribuem para a grande competição que existe entre as plantas daninhas e outras plantas que são do

interesse humano (CONSTANTIN; OLIVEIRA, 2001; SILVA; SILVA, 2007; SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008).

As plantas daninhas podem liberar no ambiente os metabólitos secundários, que são capazes de influenciar nos processos metabólicos normais de outras plantas, incluindo respiração, divisão celular, crescimento, desenvolvimento, produtividade e atividade enzimática (CARMO; LIMA; TAKAKI, 2007; LI et al., 2011; DASTAN et al., 2014). Segundo Borella e Pastorini (2009), quando essa influência é negativa, as etapas mais afetadas são a germinação das sementes e o crescimento das plantas.

Essa competição gerada pelas plantas daninhas causa redução significativa na produção agrícola, aumenta os custos de produção, dificulta a operação de colheita e interfere na qualidade do produto (CONSTANTIN; OLIVEIRA, 2001; LIMA et al., 2011).

Sendo assim, o controle de plantas daninhas é imprescindível para garantir altos rendimentos em qualquer exploração agrícola, com isso, o uso de herbicidas vem se tornando cada vez mais necessário (RIOS et al., 2010).

Contudo, o uso indiscriminado de herbicidas tradicionais vem ao longo dos anos tornando as espécies daninhas cada vez mais resistentes, a tais compostos (AGOSTINETTO, 2009), além disso, eles são extremamente prejudiciais ao meio ambiente e altamente tóxicos (DASTAN et al., 2014). Isso contribui para a busca de maneiras mais eficientes no combate a plantas daninhas, como o uso de substâncias naturais provenientes de metabólitos secundários de plantas (RIBEIRO; LIMA, 2011).

Os compostos do metabolismo secundário são atrativos para as pesquisas de novos herbicidas, devido, a grande variabilidade de estruturas químicas existentes, além de serem, teoricamente, mais seguros ao ambiente (TUR; BORRELA; PASTORINI, 2010), visto que, herbicidas naturais apresentam ação mais específica (BORELLA; PASTORINI, 2009). Um exemplo de substituição de herbicidas sintéticos por naturais são os alcaloides flindersina e N-metil-flindersina, que apresentam ação semelhante ao herbicida comercial DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) (BURGER et al., 2012).

Dastan et al. (2014) estudando sobre a fitotoxicidade e citotoxicidade de sesquiterpenos de *Ferula pseudalliacea*, observaram que esses compostos têm a capacidade de provocar a morte celular em todas as fases de crescimento e

desenvolvimento da planta. Sugerindo que os sesquiterpenos estudados podem ser utilizados como herbicidas naturais.

A descoberta de fitotoxinas produzidas pelas plantas, através de estudos alelopáticos, pode ser útil na fabricação desses herbicidas (BORELLA; PASTORINI, 2009), uma vez que, os produtos naturais têm se mostrado uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (KIMURA et al., 2002).

3.3 FITOQUÍMICA

As plantas brasileiras destacam-se como a principal fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, sendo também de grande importância para as indústrias de alimentos, cosméticos e herbicidas. Assim, o isolamento e a determinação estrutural de metabólitos secundários são de grande interesse para o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais e contribuem para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (FILHO, 2010).

A fitoquímica é responsável pela caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; FILHO, 2010). Uma análise fitoquímica consiste no recolhimento e classificação botânica da espécie em estudo, na extração, na separação e na purificação de constituintes químicos, na determinação estrutural de compostos isolados e nos ensaios biológicos e farmacológicos (BESSA; TERRONES, SANTOS, 2007).

Testes fitoquímicos têm sido utilizados em muitos trabalhos (IHA et al., 2008; ESTEVAM et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; MULLER et al., 2013) com o objetivo de elucidar e registrar os constituintes resultantes do metabolismo secundário de plantas.

Gomes et al. (2011), realizaram testes fitoquímicos com extratos de capim santo (*Poaceae*) e identificaram a presença de taninos, alcaloides e flavonoides como, flavonas e flavonóis. Barbosa (2007), realizando estudos fitoquímicos

preliminares das folhas de espécies de *Poaceae*, relatou a presença de flavonoides, saponinas, cumarinas e traços de heterosídeos cardioativos.

3.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A investigação fitoquímica e farmacológica dedicada a desvendar os metabólitos secundários de espécies quimicamente desconhecidas faz com que as técnicas de elucidação estrutural de compostos orgânicos se tornem cada vez mais importantes (STURM; SEGER, 2012).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é de grande importância para a elucidação estrutural de produtos naturais provenientes do metabolismo secundário (STURM; SEGER, 2012). Essa técnica mede a absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência entre 4 e 750 MHz, fornecendo um “mapa” do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. É bom lembrar que, diferente da absorção no ultravioleta visível e no infravermelho, neste tipo de espectroscopia os núcleos de átomos e não os elétrons estão envolvidos no processo de absorção de energia (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; VOGEL, 2008; MCMURRY, 2010).

Outras técnicas que ajudam a identificar e a elucidar estruturas de substâncias orgânicas são a espectroscopia de absorção na região do infravermelho e a espectrometria de massas. Juntas essas três técnicas frequentemente possibilitam a determinação das estruturas de moléculas muito complexas (VESSECCHI et al., 2008; MCMURRY, 2010).

Espectrometria de massas é uma técnica que fornece massa atômica e molecular, além de informações estruturais das moléculas estudadas. Para isso, a amostra é ionizada por meio de uma fonte de íons, em seguida os íons são separados de acordo com suas razões m/z e por fim, passam por um detector que os transforma em um sinal elétrico amplificado que então é convertido em um espectro para ser analisado, como mostra a figura 11 (VOGEL, 2008).

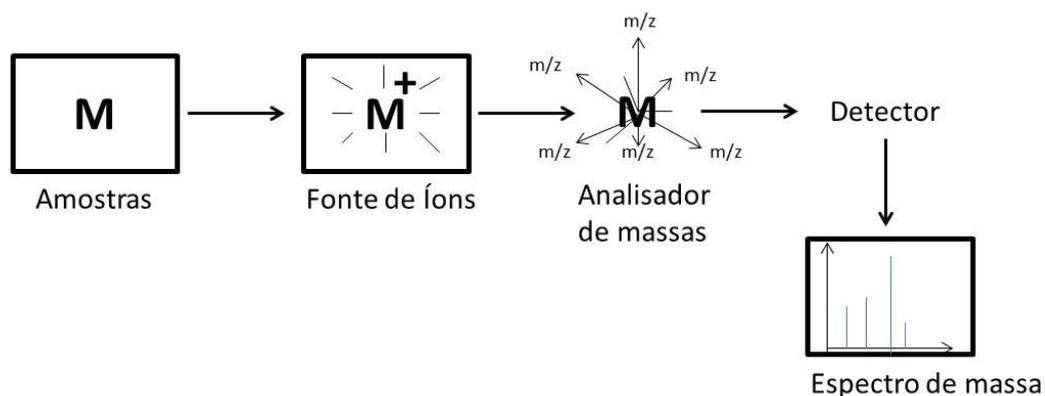


Figura 11 - Diagrama de um espectrômetro de massas
 Fonte: Adaptado de Vogel (2008).

Essa técnica é utilizada para a análise de compostos orgânicos em diversas áreas da ciência, principalmente química, biologia e farmácia, pois auxilia na identificação da constituição química de uma substância. Em alguns casos ela fornece a fórmula molecular, permite também a identificação de certos grupos funcionais e muitas vezes a determinação de parte da estrutura (VESSECCI et al., 2008).

Outra técnica muito importante que auxilia na elucidação estrutural de compostos orgânicos é a espectroscopia na região no infravermelho. Essa técnica se destaca por determinar a composição química das substâncias de forma rápida, usando pouca quantidade de amostra e por não ser destrutiva. A radiação infravermelha corresponde à região situada entre o visível e o micro-ondas, sendo que, para os químicos orgânicos a região mais utilizada está entre 4000 a 400 cm^{-1} (MCMURRY, 2010; MORAIS et al., 2013).

Quando uma molécula orgânica absorve radiação infravermelha na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} , esta se transforma em energia de vibração molecular, como cada frequência absorvida pela molécula corresponde a um movimento molecular específico, podemos conhecer os tipos de movimentos que uma molécula possui pela medida de seu espectro na região do infravermelho (MCMURRY, 2010). Vale destacar que, somente são observadas no infravermelho convencional as vibrações que causam alteração rítmica do momento de dipolo da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

3.5 *Eragrostis plana* Nees

Eragrostis plana Nees (Figura 12) é uma *Poaceae* sul-africana, perene, estival e exótica, vulgarmente conhecido como Capim Annoni-2, Capim-Chorão e Capim-Teff (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008a). Foi introduzida acidentalmente no Brasil como contaminante de sementes importadas, na década de 1950 (GOULART et al., 2012).

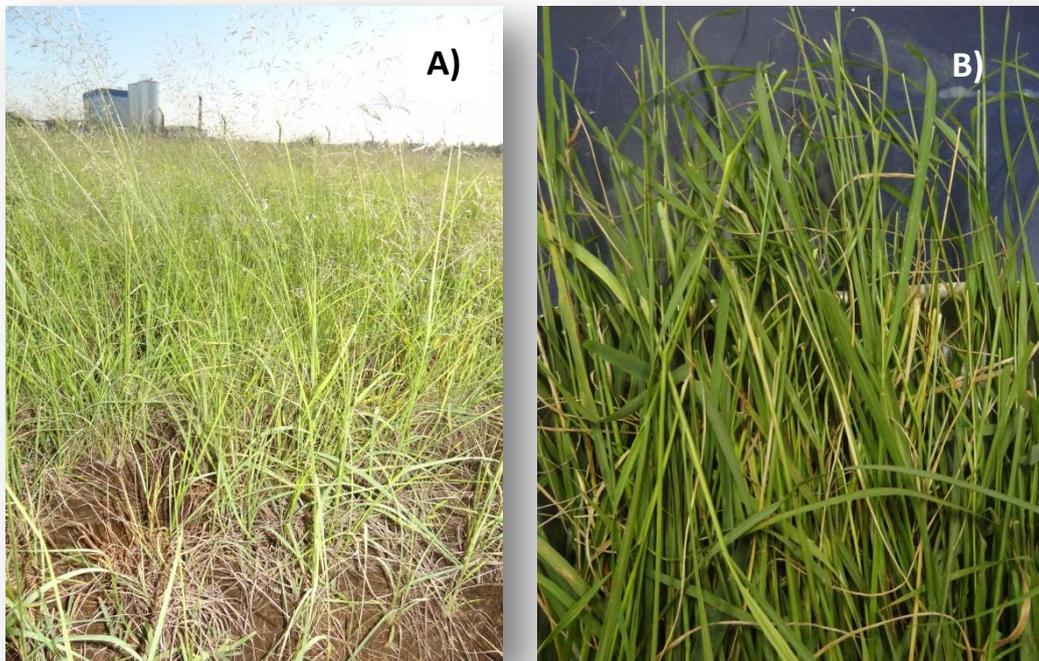


Figura 12 - *Eragrostis plana* Nees A) estação experimental da UTFPR – câmpus de Pato Branco; B) folhas coletadas.

A família *Poaceae* é amplamente distribuída por todo o mundo e contribui para a grande variedade de espécies vegetais já encontradas. Possui cerca de 750 gêneros e 10000 espécies (GONZÁLES et al., 2011), sendo que, no Brasil, Filgueiras et al. (2010) registraram 1438 classificadas em 218 gêneros.

Essa família apresenta uma notável importância econômica e biológica, principalmente quando se fala de domínio de ecossistemas vegetais e alimentação tanto para animais quanto para o homem, quando na forma de cereais. O habitat

mais comum dos representantes da família *Poaceae* são as formações campestres (WELKER; WAGNER, 2007).

A família *Poaceae* inclui uma infinidade de espécies forrageiras que apresentam um enorme poder de disseminação e de colonização, isso se deve ao fato dessas espécies serem perenes e de produzirem grande quantidade de sementes, mesmo quando as condições são desfavoráveis (SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008).

Sendo assim, sugere-se que ela é bastante representativa em termos de espécies de plantas daninhas em vários ambientes (SILVA; COELHO; MEDEIROS, 2008). Isto pode ser confirmado no trabalho de Souza e Maiomoni-Rodella (2003), que identificaram uma alta interferência de plantas daninhas em agrossistemas, sendo que as espécies da família *Poaceae* foram as que mais se destacaram.

Eragrostis é um gênero com cerca de 350 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios, sendo o Brasil o país da América do Sul com o maior número de espécies do gênero *Eragrostis*. São encontradas na maioria dos habitats, contudo a maior predominância ocorre em lugares abertos e solos secos (BOECHAT; LONGHI-WAGNER, 2000).

Esse gênero, em geral, é conhecido pelo seu alto valor nutritivo, sendo usado como forragem para a alimentação de gado. As espécies *Eragrostis nigra*, *Eragrostis tef* e *Eragrostis curvula*, são as que mais se destacam como forragem. Porém algumas espécies de *Eragrostis*, como a *viscosa* ou *plana* Nees, não são nutritivas e os animais se recusam a ingeri-las. Na medicina popular da África a *E.viscosa* é usada com propriedades repelentes às cobras (SEBASTIÃO et al., 2010).

Devido a capacidade de competir com plantas daninhas que tomavam as pastagem do Rio Grande do Sul (RS) em 1970, as sementes de *Eragrostis plana* Nees foram comercializadas e multiplicadas pelo Grupo Rural Annoni. Contudo, logo se verificou o caráter agressivo dessa espécie, como invasora, bem como a baixa qualidade como pasto (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Sua comercialização foi proibida, bem como seu transporte e importação de sementes e mudas, pela Portaria nº 205, de 13/03/79, do Ministério da Agricultura (KISSMANN, 1991). Porém ela já havia se tornado a invasora mais agressiva e de mais difícil controle na Região Sul do Brasil (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Capim Annoni-2 é considerada uma invasora, pois apresenta rejeição pelos animais, rápido crescimento, longa fase reprodutiva, presença de alelopatia e banco de sementes persistente no solo (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008a).

Por serem muito pequenas (0,14 X 0,06 X 0,04 cm) (FERREIRA; MEDEIROS; FAVRETO, 2008b), as sementes do Capim Annoni-2 são propagadas com muita facilidade pelos cursos de vento e água, bem como, aderidas ao corpo de animais ou suas fezes. O homem é o meio mais importante de propagação, pois ele as dispersa como contaminante de lotes de sementes ou diretamente ligados a veículos e/ou máquinas (RUSCONI, 2007).

A alelopatia é outra característica muito evidente do Capim Annoni-2, acredita-se que esse fenômeno prejudica a germinação de sementes de diversas espécies nativas e exóticas garantindo o domínio sobre as demais plantas (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES 2008a).

Dalbosco (2013) estudando o potencial alelopático dos extratos brutos de Capim Annoni-2, obtidos com folhas coletadas no verão e no inverno por meio da extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo e acetato de etila), verificou que o extrato de éter de petróleo verão em uma concentração de 400 ppm apresentou os melhores resultados de inibição da germinação das sementes de *I. grandifolia*. Já com relação a inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo dessa mesma espécie, o extrato que apresentou o menor crescimento foi o de acetato de etila verão, também em uma concentração de 400 ppm.

A presença de potencial alelopático no Capim Annoni-2 foi confirmada também no trabalho de Silva (2014), que estudando o efeito alelopático de extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, provenientes da raiz, verificou que o extrato de éter de petróleo, obtido no verão foi o que mais retardou a cinética no processo de germinação.

O potencial alelopático do *E. plana* Nees está contribuindo para sua expansão sobre os campos nativos no Rio Grande do Sul, estima-se que a área invadida corresponda a dois milhões de hectares (MEDEIROS; FOCHT, 2007), o que acarreta em expressivos prejuízos ambientais, econômicos e sociais ao estado. Barbosa et al. (2013) sugerem, a partir de modelos bioclimáticos, a hipótese de que um nicho bioclimático muda durante a invasão de *E. plana*, sendo esta mudança

uma consequência de vários processos, incluindo a ausência de inimigos e concorrentes de sua área nativa.

O Capim Annoni-2 é o responsável pela redução da biodiversidade florística e a redução da qualidade nutricional das pastagens, o que resulta em menor ganho de peso do gado criado em pastagens infestadas com esta planta daninha (GOULART et al., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de Capim Annoni-2 foram secas em estufa de ar circulante MARCONI MA033/3I/NET a 40 °C e moídas em liquidificador. As massas dos extratos e frações foram medidas em balança analítica SHIMADZU UX620H. Os extratos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol foram concentrados em evaporador rotativo QUIMIS Q344M2. Para a Cromatografia em Coluna (CC) utilizou-se sílica gel 60 0,063 – 0,2mm/70-230 mesh ASTM. As análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizaram placas de sílica-gel DC – Fertigfolien ALUGRAN xtra SIL G/UV com 0,2 mm de espessura, e na Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizou-se sílica gel 60 Carvalhes UV – 245. As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, por inserção das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo e revelador anisaldeído. Os extratos obtidos foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) em espectrômetro PerkinElmer e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo Varian LC-920-R6. Os espectros de infravermelho foram elaborados utilizando-se o programa Origin 8.5.

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Eragrostis plana* Nees foram coletadas no **verão** e no **inverno**, em 2013 e 2014, respectivamente, na Área Experimental da UTFPR - *Câmpus* Pato Branco. Sua exsicata, após identificação realizada pela Prof^a. Ilsi Iob Boldrini foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências – PPG Botânica, sob o número ICN nº 174417.

4.2 SECAGEM E MOAGEM

As folhas da espécie em estudo foram pré-secas à sombra em temperatura ambiente, seguido de secagem em estufa de ar circulante a 40 °C, e trituradas em liquidificador.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após seco, moído e pesado (175 g **inverno** e 175 g **verão**), o material vegetal foi submetido à extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (EP), acetato de etila (ACET) e metanol (MeOH), com renovação do solvente em intervalos de 48 horas, numa média de 3 trocas de solventes. Com filtração e recolhimentos periódicos dos filtrados. Os resíduos remanescentes foram desprezados. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C. Em seguida, foram armazenados na capela para completa evaporação do solvente. A figura 13 mostra a sequência para a obtenção do extrato bruto de éter de petróleo, que se repetiu para a obtenção dos extratos de acetato de etila e metanol.

Os extratos brutos obtidos da raiz de Capim Annoni-2 e que foram utilizados na análise e comparação com os extratos brutos obtidos das folhas, por meio de HPLC, já se encontravam prontos para análise, pois fizeram parte de um trabalho anterior (SILVA, 2014), e a sua obtenção foi realizada utilizando a mesma metodologia de obtenção dos extratos brutos das folhas.

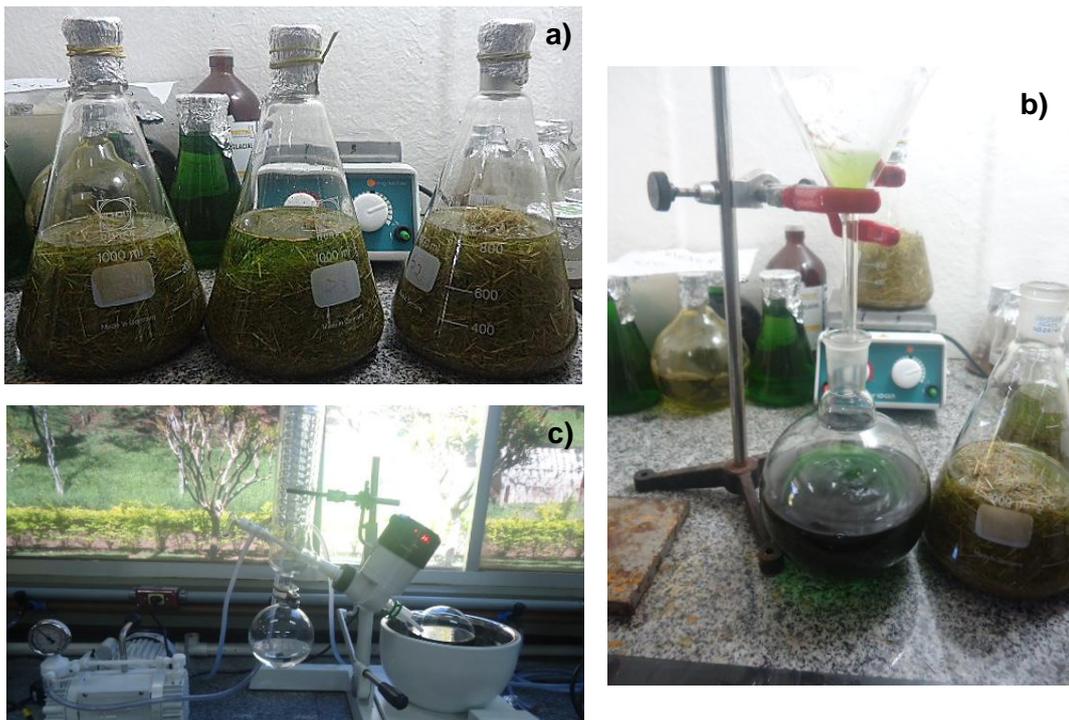


Figura 13 - a) Extração a frio das folhas de Capim Annoni-2 com éter de petróleo- b) Filtração do extrato bruto - c) Evaporação do solvente do extrato bruto de Capim Annoni-2 utilizando evaporador rotativo.

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS BRUTOS

4.4.1 Infravermelho

Os extratos brutos de **verão** e **inverno** foram analisados em duplicata por IV-TF na Central de Análises *câmpus* Pato Branco (PR). O equipamento foi operado com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras. O intervalo analisado foi de 400 a 4000 cm^{-1} , pois segundo Silverstein e Webster (2000) é a região que apresenta maior utilidade na análise orgânica.

Para a análise, as amostras (extratos brutos) foram dissolvidas com diclorometano e aplicadas, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, em uma placa de KBr, em seguida a placa foi inserida em um suporte para subsequente análise por IV-TF

4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Outra técnica utilizada para comparação entre os extratos brutos de Capim Annoni-2 foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, utilizando-se coluna C18, foram injetadas alíquotas de 10 µl, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e modo de eluição gradiente com água e metanol. O gradiente de eluição utilizado foi (A = água e B = metanol): iniciou-se com 95% A até 1min, em seguida diminuiu-se o valor de A para 93% até 7 min, 80% A até 15min, 50% A até 30 min, 10% A até 50 min, 10% A até 55 min e, por fim, o valor de A é aumentado para 95% A até 60 min e para 95% A até 70 min. A análise foi realizada em comprimento de onda de 280 nm. As amostras foram preparadas em concentrações de 0,5%, 1% e 4% (m/v), de acordo com cada tipo de extrato, o solvente utilizado foi o acetato de etila ultra puro, em seguida, foram transferidas para *vials* para subsequente análise por CLAE.

Por meio dessa análise foi possível comparar os extratos brutos: de éter de petróleo folha **verão** X **inverno**; acetato de etila folha **verão** X **inverno**; metanol folha **verão** X **inverno**; éter de petróleo **inverno** raiz X folha; acetato de etila **inverno** raiz X folha; etanol **inverno** raiz X metanol **inverno** folha; folhas – **inverno** - éter de petróleo X acetato de etila X metanol; folhas – **verão** – éter de petróleo X acetato de etila X metanol

4.4.3 Tratamento Estatístico

Os resultados obtidos pelas análises de IV-TF foram tratados estatisticamente por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando o software Pirouette versão 4.0 (Infometrix, Seattle, Washington, USA). Onde foi possível a comparação entre os seis extratos brutos (folha **verão** éter de petróleo (FVE), folha **inverno** éter de petróleo (FIE), folha **verão** acetato de etila (FVA), folha **inverno** acetato de etila (FIA), folha **verão** metanol (FVM) e folha **inverno** metanol (FIM)). Verificou-se as possíveis diferenças entre os extratos obtidos, comparando-

os por diferença de polaridade dos solventes utilizados (éter de petróleo, acetato de etila e metanol), bem como de sazonalidade, época de coleta – **verão** e **inverno**.

O pré-processamento dos dados utilizado foi o auto escalonamento, onde cada variável é centrada na média e dividida pelo seu desvio padrão. A análise foi realizada utilizando intervalos de dados sugeridos pelo programa.

4.5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA VERÃO E INVERNO

Como relatado anteriormente foram obtidos extratos de Capim Annoni-2 a partir de material coletado no **verão** e no **inverno**. Optou-se por iniciar o estudo proposto, pelo fracionamento e purificação do extrato de acetato de etila, com base nos resultados satisfatórios obtidos por meio dos testes alelopáticos utilizando esse extrato (DALBOSCO, 2013).

4.5.1 Cromatografia em Coluna

Os extratos brutos de acetato de etila foram submetidos a uma coluna cromatográfica, utilizando sílica-gel como fase estacionária. As frações assim obtidas foram analisadas por CCD, e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (*fr*). A cromatografia em coluna foi utilizada também para a purificação de algumas frações do extrato bruto, que apresentaram maior número de substâncias na análise por CCD.

4.5.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Na CCDP foram preparadas placas, de dimensões 20 cm X 20 cm e 5 cm X 20 cm, por espalhamento da suspensão sílica gel em água destilada (1:2), as placas em seguida foram secas a temperatura ambiente por 24 h e ativadas em estufa a 110 °C. Para separar a substância da sílica, o material obtido de cada placa foi deixado em solução de diclorometano/metanol (1:1) por 50 minutos. Em seguida as suspensões foram filtradas e o solvente evaporado

4.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram identificadas através de métodos espectrométricos e espectroscópicos: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono (RMN de ^{13}C), bidimensionais (HSQC e HMBC) e Espectrometria de Massas (EM).

Para análise por RMN o núcleo de hidrogênio foi observado a 600 MHz e o núcleo de carbono a 150 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) contendo TMS, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e referenciados em relação ao TMS (0,00 ppm). As constantes de acoplamentos (J) foram registradas em Hertz (Hz).

Nas análises por CG/EM cada amostra foi diluída em hexano ultra puro e caracterizada utilizando as seguintes condições de análise: coluna capilar de sílica fundida (Rtx-5MS) composta por 5% de difenil + 95% de dimetil polisiloxano e medindo 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi hélio com vazão de 1,02 mL min^{-1} , em modo *split* 1:20, estando o injetor à 250 °C. Foi injetado 1 μL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60°C (0') até 250 °C, com aquecimento de 3 °C. min^{-1} . O intervalo de detecção de massas utilizado foi de 40-350 m/z , a temperatura na linha de transferência foi de 300 °C, a temperatura na fonte de íons foi de 300 °C e o sistema de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos de Capim Annoni-2 foram comparados por meio das técnicas de Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O rendimento de cada extrato pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Extrato seco (folhas) e rendimento dos extratos brutos de Capim Annoni-2

Extrato Bruto	Massa seca (g)	Rendimento (%)
Éter de Petróleo Verão	3,39	1,94
Acetato de Etila Verão	0,583	0,33
Metanol Verão	3,78	2,16
Éter de Petróleo Inverno	1,94	1,10
Acetato de Etila Inverno	2,49	1,42
Metanol Inverno	6,98	3,98

Observa-se que os maiores rendimentos ocorrem nos extratos de metanol, folha, **verão** e **inverno**, pois, segundo Oliveira (2012), com esse solvente é extraído grande parte dos açúcares e produtos glicosilados presentes nas folhas. Silva et al. (2010) estudando extratos de folhas de *Cymbopogon citratus* Stapf (*Poaceae*) obtidos com os solventes éter de petróleo, acetato de etila e metanol, observou que o extrato metanólico apresentou maior rendimento na extração.

5.1.1 Infravermelho

Os extratos brutos foram analisados em infravermelho (Figuras 13, 14 e 15). Para a discussão dos espectros utilizou-se como referência Silverstein e Webster (2000), Formagio et al. (2011), McMurry (2010) e Morais et al. (2013).

Neste trabalho, os espectros de infravermelho foram divididos em quatro regiões, seguindo o modelo proposto por McMurry (2010). A região **1** compreende a faixa de 4000 a 2500 cm^{-1} e corresponde a absorções provocadas por estiramentos de ligações simples N-H, C-H, e O-H, a região **2**, de 2500 a 2000 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de ligação tripla de nitrilas e alquinos, a região **3** compreende a faixa de 2000 a 1500 cm^{-1} e corresponde as absorções das ligações duplas de todos os C=O, C=C e C=N, enquanto que a região **4** fica abaixo de 1500 cm^{-1} e é conhecida como a região de impressão digital, ela corresponde a um grande número de absorções devido a uma variedade de vibrações de ligações simples C-C, C-O, C-N e C-X (X representa um halogênio).

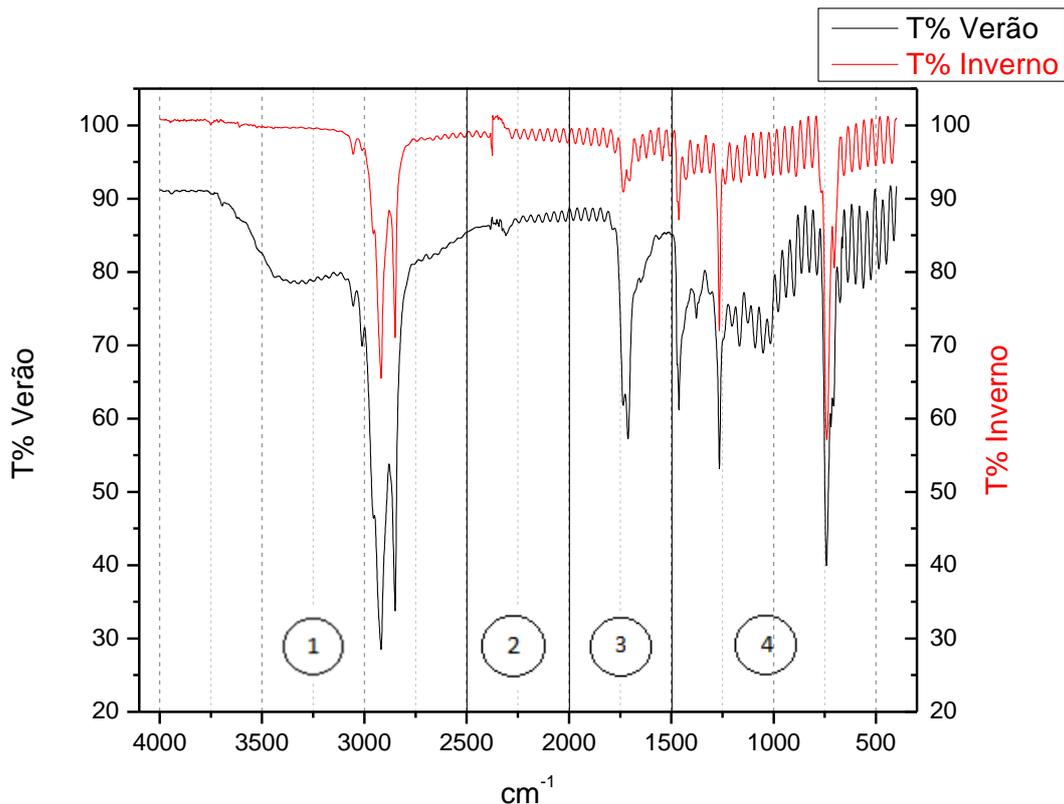


Figura 14 - Espectro de infravermelho do extrato de éter de petróleo folha verão (em preto) X inverno (em vermelho), a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010)

Observa-se com base na comparação dos espectros de éter de petróleo folha **verão** X **inverno** (Figura 14), que ambos apresentam picos de absorção em regiões bastante similares, com exceção da região **1** entre 3750 e 3250 cm^{-1} , onde se observa um pico de deformação axial de O-H, apenas no extrato de verão. Observa-se também, diferença na região **4**, mais especificamente entre 1420 e 1330 cm^{-1} , correspondente a deformação angular no plano de O-H. Essa observação favorece a confirmação da presença de metabólitos hidroxilados no extrato de **verão**, diferenciando-o do extrato de **inverno**.

A partir dessa observação é possível esperar que a composição dos extratos, em termos de metabólitos secundários apresente-se diferenciada. Sabe-se que a planta quando submetida a algum tipo de estresse, altera a produção de seus componentes, quer em termos de quantidade ou de variedade (COUTINHO et al., 2009; PAVARINI et al., 2012; BEZERRA et al., 2013). Segundo Bresciani (2003) alguns metabólitos secundários podem ser produzidos em uma estação do ano

devido as condições externas como temperatura e umidade, e consumidos em outra, para seu crescimento, reprodução e defesa. Macedo (2013) em seus estudos com *Davilla rugosa* Poir sobre a influência da sazonalidade no teor de alguns metabólitos secundários, observou que o teor de umidade nas folhas dessa espécie é maior no verão do que no inverno, assim como, é no verão que uma maior quantidade de flavonoides e taninos são encontrados na folha.

Constatou-se, em ambos os espectros absorções na região **1** em 3010 cm^{-1} correspondente a C-H aromático e entre 2750 a 3000 cm^{-1} sugerindo deformação axial C-H de grupos metila e/ou metileno. Observa-se ainda, absorção na região **2** em 2260 cm^{-1} característica de estiramento de ligação tripla de alquinos, na região **3** verifica-se pico em 1746 cm^{-1} correspondente a grupos carbonila (C=O), além disso, na região **4**, constatou-se absorções em 1460 cm^{-1} referente a deformação angular CH_2 e CH_3 , absorção em 1250 cm^{-1} referente a deformação axial de C-O de álcoois ou fenóis e, por fim, em 750 cm^{-1} pico de deformação angular fora do plano de C-H.

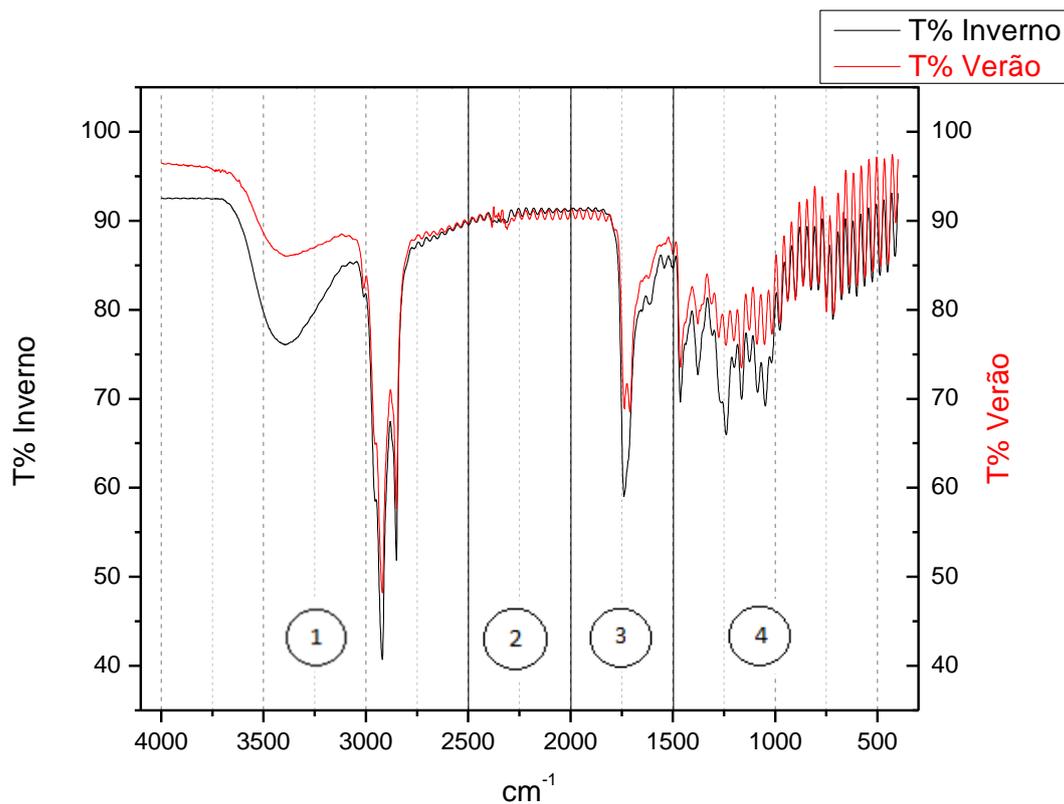


Figura 15 - Espectro de infravermelho do extrato de acetato de etila folha verão (em vermelho) X inverno (em preto), a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010)

Observa-se com base na comparação dos espectros de acetato de etila folha **verão** X **inverno** (Figura 15), que ambos apresentam bandas de absorção em regiões bastante similares. Constatou-se absorções na região 1 entre 3750 a 3250 cm^{-1} atribuída à deformação axial de O-H de álcoois ou fenóis, em 3010 cm^{-1} correspondente a C-H aromático, entre 2750 a 3000 cm^{-1} sugerindo deformação axial C-H de grupos metila e/ou metileno. Observa-se ainda, absorção na região 2 em 2260 cm^{-1} característica de estiramento de ligação tripla de alquinos. Na região 3 constatou-se picos em 1746 cm^{-1} correspondente a grupos carbonila (C=O), e por fim, na região 4 observa-se absorção em 1460 cm^{-1} referente a deformação angular CH_2 e CH_3 , absorção entre 1420 e 1330 cm^{-1} correspondente a deformação angular no plano de O-H, confirmando a presença de metabólitos hidroxilados nos extratos de acetato de etila **verão** e **inverno**. Observa-se uma pequena diferença na região 4, pela presença de bandas de absorção apenas no espectro de **inverno** em 1250

cm^{-1} referente a C-O de álcoois ou fenóis e em 1040 cm^{-1} atribuída a deformação axial simétrica C-O-C.

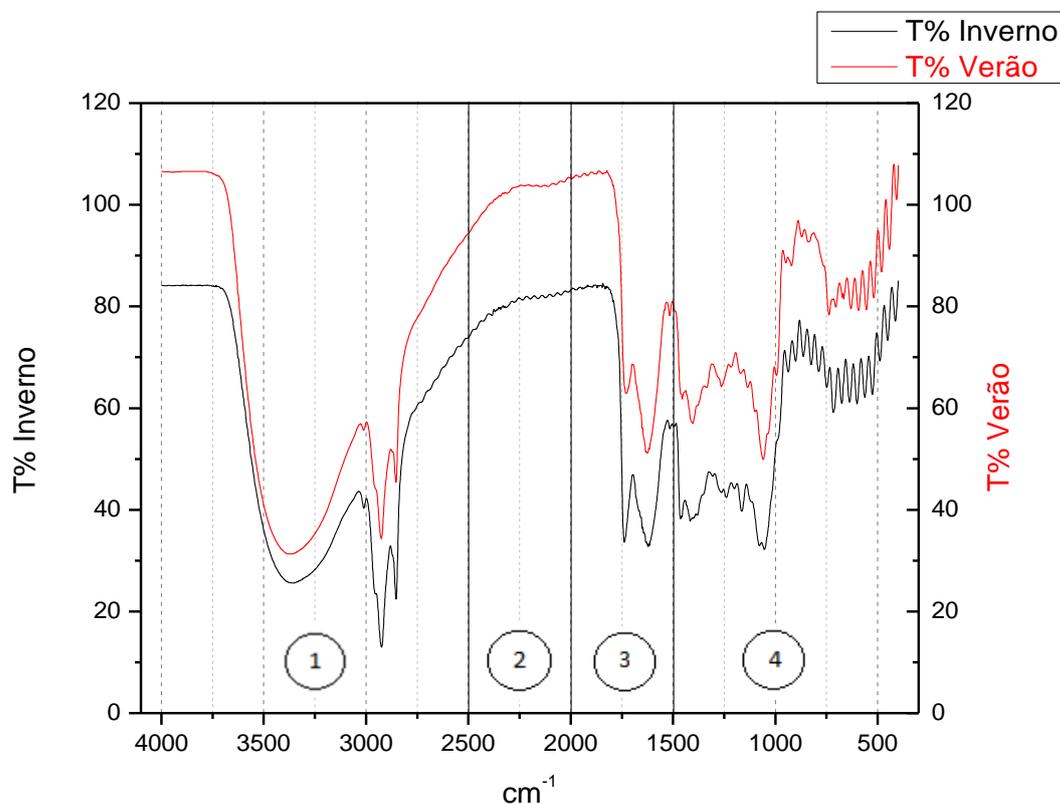


Figura 16 - Espectro de infravermelho do extrato de metanol folha verão (em vermelho) X inverno (em preto) a numeração na figura representa a divisão das regiões do espectro segundo McMurry (2010).

Com base na observação dos espectros do extrato de metanol folha **verão** e **inverno** (Figura 16), constatou-se que ambos apresentam bandas de absorção em regiões bem similares, com exceção da região 4, em aproximadamente 1150 cm^{-1} onde se observa uma banda de absorção apenas no extrato de metanol folha **inverno**. E ainda na região 4, entre 750 e 1000 cm^{-1} observam-se sinais apenas no extrato de metanol folhas **verão**.

Pode-se observar absorções em ambos os espectros na região 1, entre 3500 a 3250 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H de álcoois ou fenóis, em 3010 cm^{-1} correspondente a C-H aromático, entre 2750 a 3000 cm^{-1} sugerindo deformação axial C-H de grupos metila e/ou metileno. Observa-se ainda, na região 3, entre 1660 a 1610 cm^{-1} banda de deformação axial da ligação C=C de éteres

vinílicos, essa banda caracteriza-se por ser mais intensa que nos alquenos, além disso, aparece frequentemente como um dublete devido a existência de isômeros rotacionais. É importante destacar que essa absorção na forma de dublete, na região **3**, quando comparados os espectros de infravermelho dos extratos, só foi visualizada no extrato de metanol. Observa-se também, na região **4**, deformação angular CH_2 e CH_3 em 1460 cm^{-1} , absorção entre 1420 a 1330 cm^{-1} correspondente a deformação angular no plano de O-H, confirmando a presença de metabólitos hidroxilados nos extratos de metanol folhas **verão** e **inverno** e e deformação axial simétrica C-O-C em 1040 cm^{-1} .

Por meio dos espectros mostrados nas figuras 14, 15 e 16 pode-se observar diferenças entre os extratos de folhas de éter de petróleo, acetato de etila e metanol sugerindo grande riqueza de compostos químicos nas folhas de Capim Annoni-2. Resultados semelhantes aos mostrados acima foram relatados nos estudos de Dalbosco (2013), que realizou análises de infravermelho dos extratos de éter de petróleo e acetato de etila das folhas de Capim Annoni-2 coletadas no **verão** e no **inverno**.

5.1.2 Análise dos Componentes Principais

Os dados foram processados no software Pirouette, onde foi aplicada a técnica da Análise dos Componentes Principais (PCA). Essa técnica consiste em reduzir um conjunto de dados originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas, preservando a maior quantidade de informações possíveis (CORREIA; FERREIRA, 2007; SOEIRO et al., 2010; ROSÁRIO; KIPPER; FERRÃO, 2012).

Para a análise estatística utilizou-se apenas os conjuntos de variáveis mais significativos sugeridos pelo programa Pirouette, nesta análise é possível selecionar as variáveis que não estão interferindo significativamente para as formações dos agrupamentos naturais, observados pela PCA, sendo que as mesmas foram de 2969 cm^{-1} a 2828 cm^{-1} e 1781 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , a figura 17 mostra a exclusão dessas variáveis na região em amarelo.

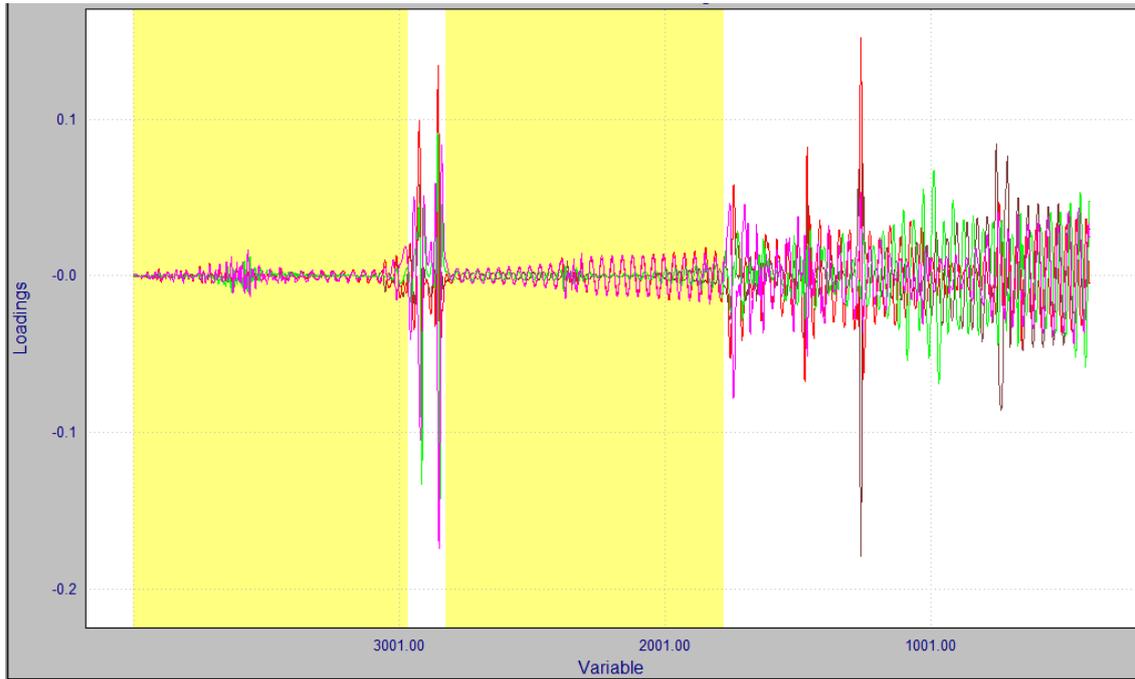


Figura 17 - Exclusão das variáveis utilizando o programa Pirouette, as áreas em amarelo representam as regiões excluídas

O gráfico de scores foi plotado por PC1 versus PC2 como mostra a Figura 18.

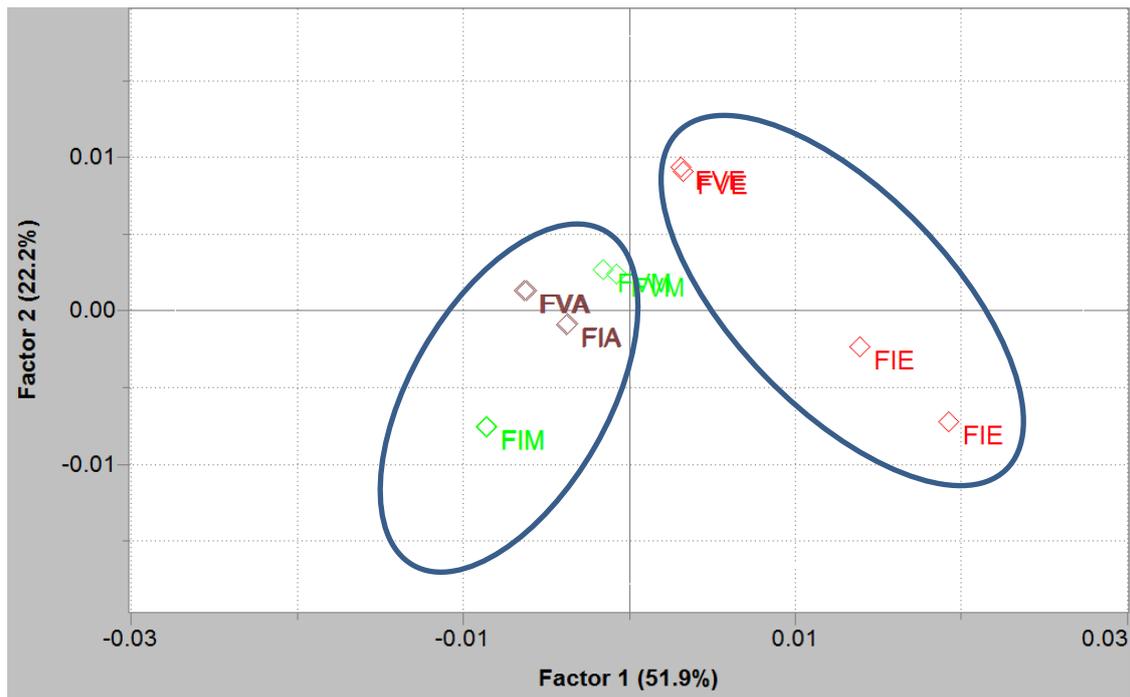


Figura 18 - Gráfico de scores obtido por PCA das duplicatas dos extratos folha verão metanol (FVM), folha inverno metanol (FIM), folha verão acetato de etila (FVA) folha inverno acetato de etila (FIA) folha verão éter de petróleo (FVE) e folha inverno éter de petróleo (FIE), as regiões circuladas representam a separação segundo a PC1

A análise da PCA permitiu verificar que a PC1 representa 51,9% das informações originais do conjunto de dados enquanto que a PC2 representa 22,2%, sendo deste modo a análise segundo a PC1 mais significativa.

De acordo com a PC1 (51,9%) pode-se observar que houve separação em função do grau de polaridade do solvente, os extratos obtidos com o solvente apolar (éter de petróleo) encontram-se no segundo e no quarto quadrante, enquanto que os extratos obtidos com solventes mais polares (acetato de etila e metanol) encontram-se no primeiro e no terceiro quadrante.

A PC2 (22,2%) por sua vez apresentou uma nítida separação entre as estações do ano (**verão** e **inverno**), os extratos obtidos com folhas coletadas no **verão** se encontram no primeiro e segundo quadrante, enquanto que os extratos com folhas coletadas no **inverno** encontram-se no terceiro e quarto quadrante.

Essa diferença nos extratos de acordo com a estação foi observada também nos espectros de infravermelho, onde, por exemplo, o extrato de éter de petróleo **verão** (FVE) e **inverno** (FIE) se mostraram diferentes devido ao aparecimento de

uma banda de deformação axial de O-H na região **1**, mais especificamente entre 3500 e 3250 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda de deformação angular no plano de O-H na região **4**, entre 1420 e 1330 cm^{-1} , no extrato de **verão**, como mostra a figura 13. Já no extrato de metanol **verão** (FVM) e **inverno** (FIM) a diferença apareceu na região 4, em aproximadamente 1150 cm^{-1} onde se observa absorção nessa região, apenas no extrato de metanol **inverno**. E ainda na região 4, entre 750 e 1000 cm^{-1} observam-se sinais de absorção apenas no extrato de metanol **verão**.

Os extratos de acetato de etila **verão** (FVA) e **inverno** (FIA) por sua vez, apresentam-se muito similares, a pequena diferença entre eles não é considerada estatisticamente significativa como mostra a análise estatística segundo a PC1.

Pode-se afirmar que o grau de polaridade do solvente escolhido para a extração resulta em uma separação mais significativa dos extratos, já que isso foi observado na PC1 que representa 51,9% das informações. Ainda segundo a PC1 pode-se observar que as amostras com maiores diferenças significativas são as de folha **inverno** metanol (FIM) e folha **inverno** éter de petróleo (FIE), o que já era esperado devido a grande diferença de polaridade entre esses solventes. Isso foi observado também no trabalho de Silva (2014) que justifica essa diferença pelo fato do éter de petróleo extrair substâncias mais apolares enquanto que o metanol extrai substâncias mais polares.

Os resultados para a análise por agrupamento hierárquico HCA (gráfico não incluído) foram os mesmos que da PCA.

5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.1.3.1 Éter de petróleo - Folhas - Verão X Inverno

Comparando-se os extratos de éter de petróleo **verão** e **inverno** observa-se que a maior concentração dos sinais encontra-se na região entre 35 a 65 min (Figura 19), região mais apolar, como era de se esperar devido ao caráter apolar do solvente (éter de petróleo) utilizado para a extração.

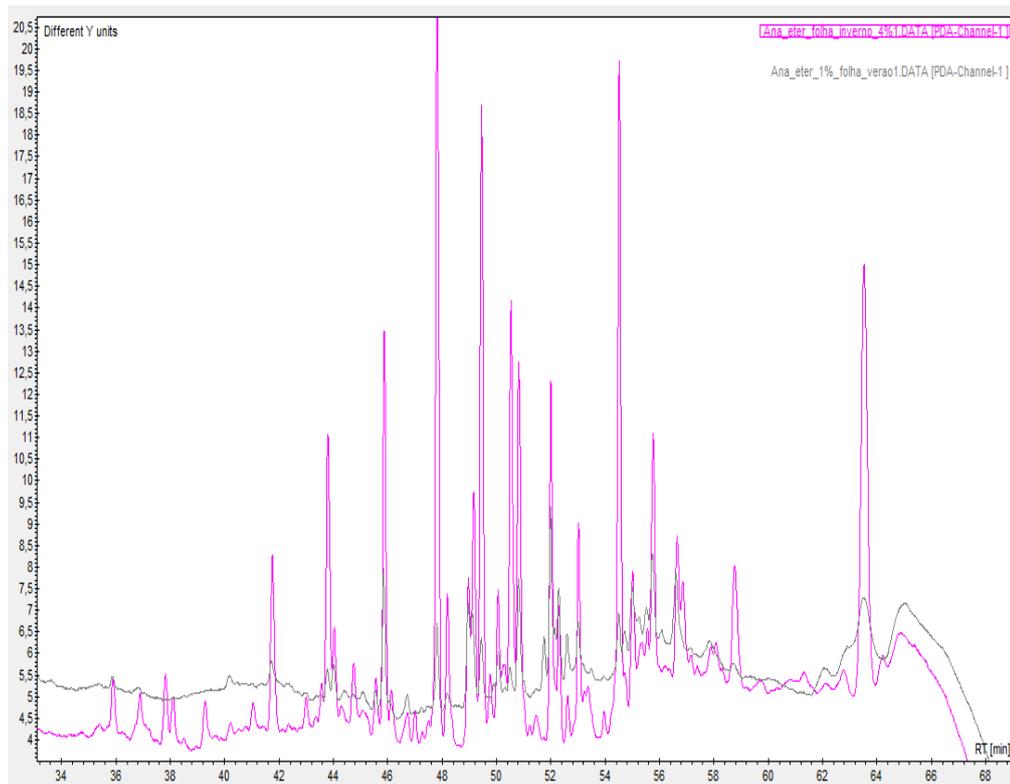


Figura 19 – Cromatograma ampliado dos extratos de éter de petróleo verão (linha preta) e inverno (linha rosa) representando a área de maior concentração dos sinais

Observa-se também que apesar de apresentarem alguns sinais semelhantes, a maioria dos picos possuem tempos de retenção (TR) diferentes, caracterizando diferença entre os extratos. Isso foi observado também nas análises estatística e de infravermelho que destacaram diferenças entre os extratos de éter de petróleo verão e inverno.

Pode-se observar também que mesmo estando mais diluído, o extrato de **verão** (1%), apresentou alguns sinais com intensidade maior que o extrato de **inverno** (4%), como mostra a figura 20, indicando que a planta produz substâncias de acordo com as suas necessidades. Essas diferenças vem corroborar com resultados de testes alelopáticos realizados anteriormente (DALBOSCO, 2013), em que nos bioensaios de germinação utilizando *I. grandifolia*, os extratos de **verão** foram os que apresentaram melhores resultados para inibir a germinação, destacando-se o extrato de éter de petróleo, em uma concentração de 400 ppm.

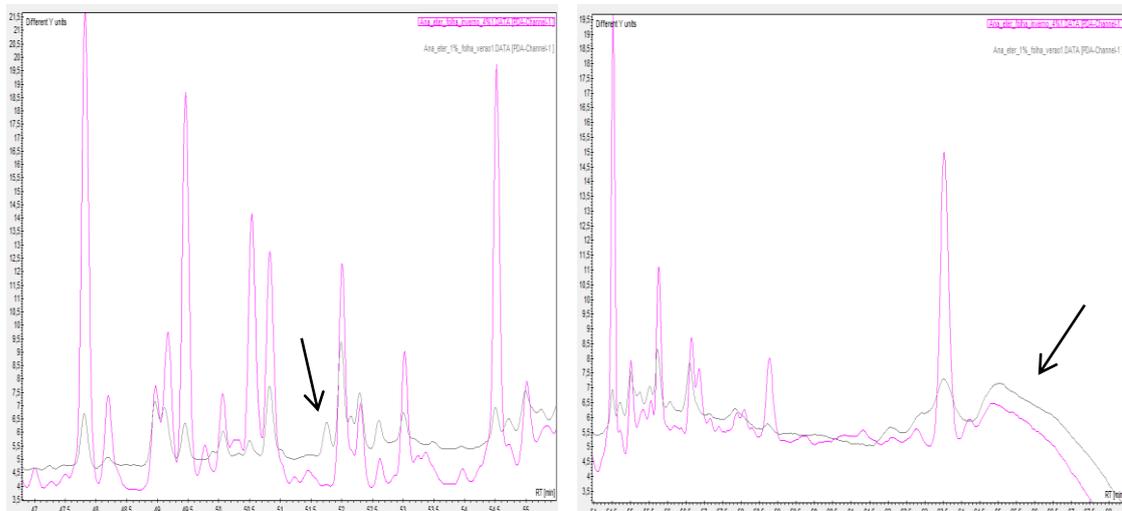


Figura 20 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais dos extratos de éter de petróleo verão (linha rosa) e inverno (linha preta), setas indicam os sinais do extrato mais diluído (verão) que são mais intensos que os sinais do extrato mais concentrado (inverno)

5.1.3.2 Acetato de Etila - Folhas - Verão X Inverno

Ao comparar-se os extratos de acetato de etila **verão** e **inverno** observam-se alguns sinais em TR diferentes.

Verifica-se que a maior concentração de sinais está na região entre 33 a 52 min, o que caracteriza a presença de compostos mais polares justificada pela polaridade do solvente (acetato de etila) utilizado na extração. Pode-se destacar também a presença de um sinal majoritário no extrato de **inverno** em aproximadamente 49 min, como mostra a figura 21.

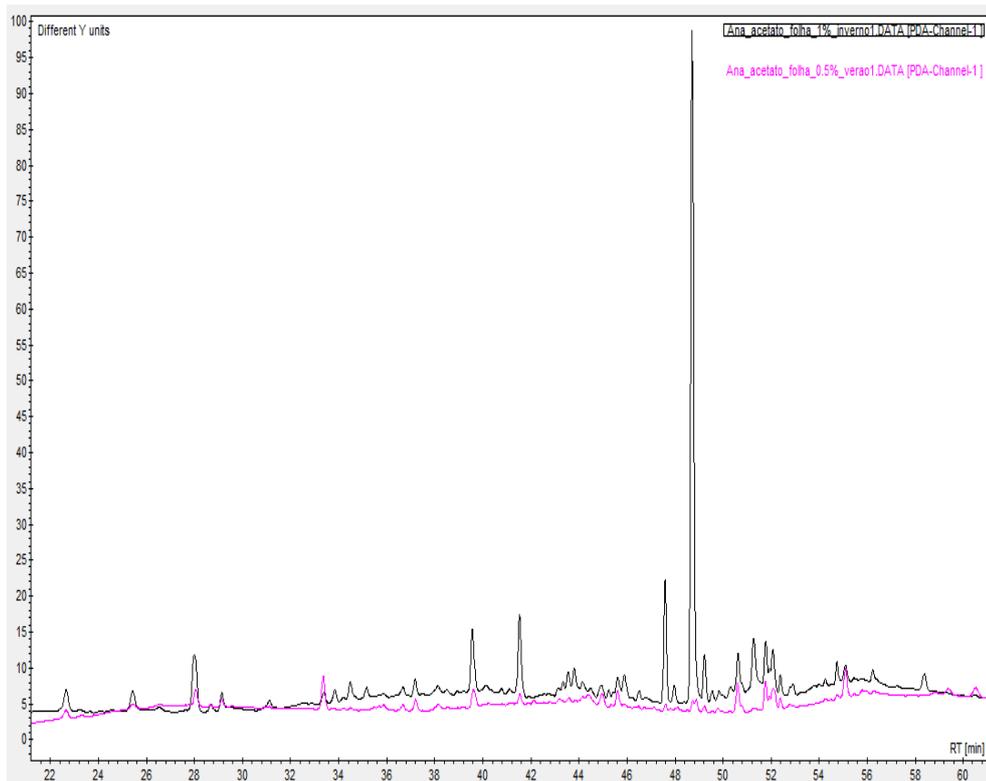


Figura 21 - Cromatograma ampliado dos extratos de acetato de etila verão (linha rosa) e inverno (linha preta) representando a área de maior concentração de sinais

Observa-se também que o extrato de **verão** (0,5%), mesmo estando mais diluído que o extrato de **inverno** (1%), apresentou alguns sinais com maior intensidade (Figura 22). Isso indica que, dependendo da estação do ano, a planta

pode produzir mais ou menos de uma determinada substância em função de suas necessidades.

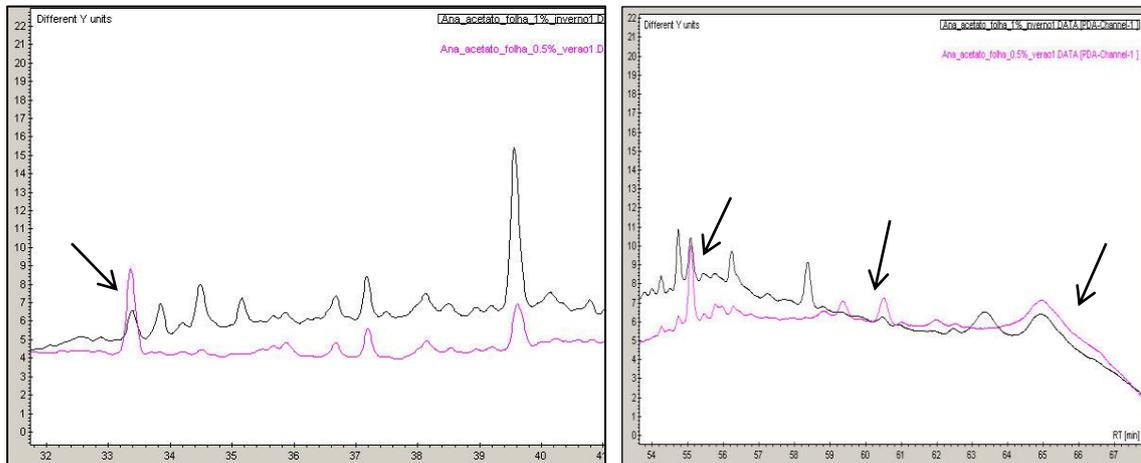


Figura 22 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais do extrato de acetato de etila verão (linha rosa) e inverno (linha preta), as setas indicam os sinais do extrato mais diluído (verão) que são mais intensos que os sinais do extrato mais concentrado (inverno).

Apesar de todas essas observações, pode-se destacar que o perfil do cromatograma, de uma maneira geral, mostra semelhança entre os extratos de acetato de etila/**verão** e acetato de etila/**inverno**, o que foi observado também na análise estatística e na análise de infravermelho. Ao reportarmos-nos aos resultados dos testes alelopáticos realizados por Dalbosco (2013), foi observado que, em termos de crescimento da radícula da planta *I. grandifolia*, o extrato de acetato de etila das folhas, de Capim Annoni-2, **verão**, numa concentração de 400 ppm foi o que apresentou crescimento reduzido. O mesmo foi observado em relação ao crescimento do hipocótilo, o extrato de acetato de etila/**verão** a 400 ppm foi o que apresentou maior potencial de inibição do crescimento do hipocótilo da *I. grandifolia*.

5.1.3.3 Metanol – Folha - Verão X Inverno

Observa-se com base na comparação dos extratos de metanol **verão** e **inverno** que ambos apresentam sinais que se concentram na região entre 20 a 40 min (Figura 23), região polar, o que já era esperado devido a alta polaridade do solvente utilizado para a extração

Pode-se observar que os extratos apresentam muitos sinais semelhantes, algumas poucas diferenças são observadas com relação ao tempo de retenção dos sinais, contudo muitas diferenças são observadas com relação a intensidade dos mesmos. Essa diferença foi observada também nas análises de infravermelho e na análise estatística.

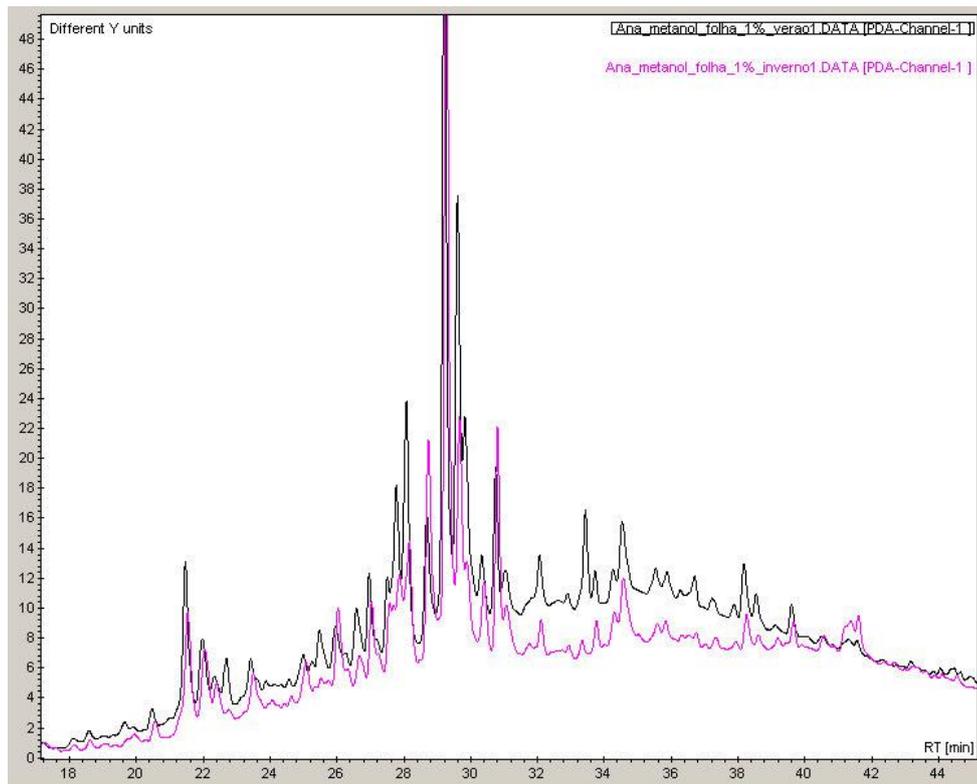


Figura 23 - Cromatograma ampliado dos extratos de metanol verão (linha preta) e inverno (linha rosa) representando a área de maior concentração dos sinais

Outra característica interessante é que algumas substâncias se apresentam em maior ou menor intensidade conforme a estação do ano, **verão** ou **inverno**, como mostra a figura 24.

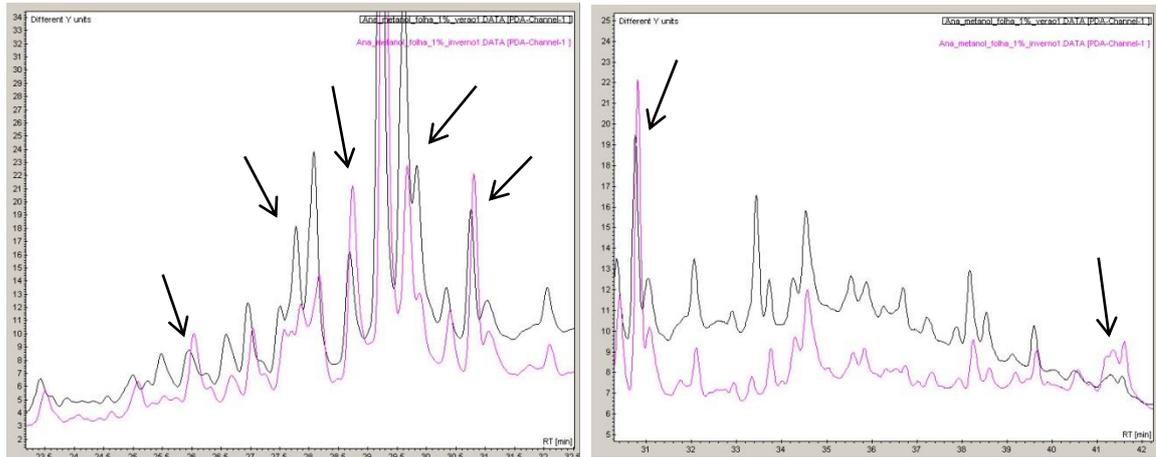


Figura 24 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre cromatogramas do extrato de acetato de etila verão (linha preta) e inverno (linha rosa), as setas indicam alguns sinais que se destacam por estarem em maior intensidade quando comparados os dois extratos.

5.1.3.4 Folhas – Inverno – Éter de Petróleo X Acetato de Etila X Metanol

Observa-se quando se compara os extratos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, de folhas coletadas no **inverno**, que eles apresentam muitas diferenças entre si, isso pode ser observado também na análise estatística e na análise de infravermelho e pode ser justificada pela grande diferença de polaridade entre esses três solventes.

Pode-se perceber que o extrato de metanol apresenta sinais em regiões com menores TR, já o extrato de éter de petróleo possui a maioria dos sinais nas regiões com os maiores TR, enquanto que o extrato de acetato de etila possui sinais com TR intermediários, como mostra a figura 25.

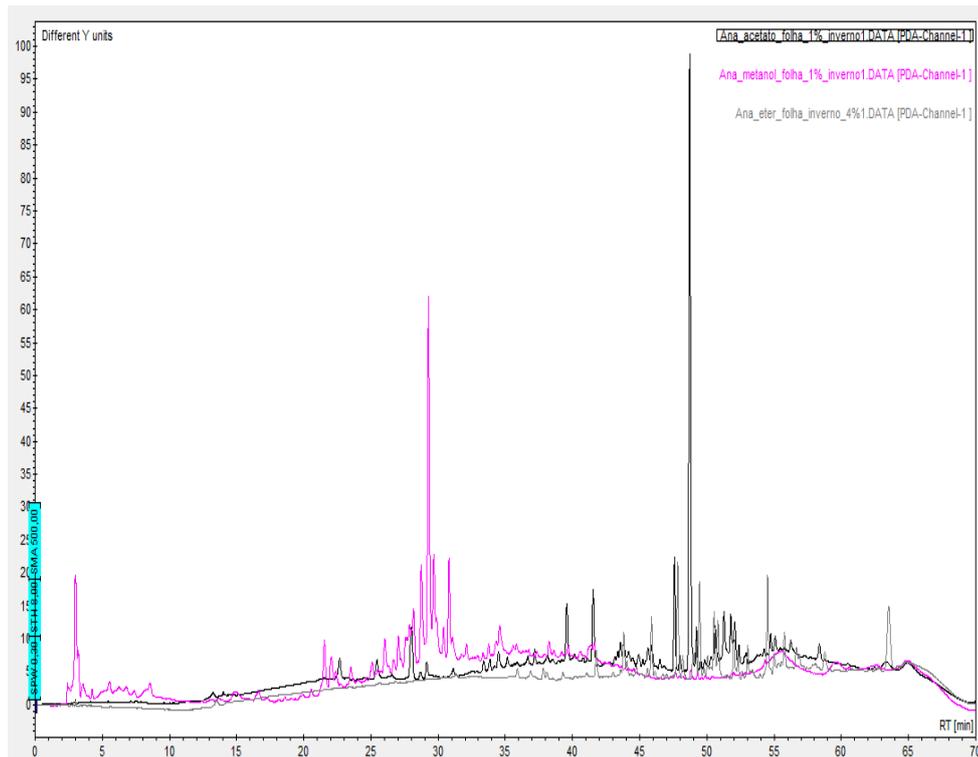


Figura 25 - Comparação entre os extratos de éter de petróleo inverno folha (linha cinza), acetato de etila inverno folha (linha preta), metanol inverno folha (linha rosa)

5.1.3.5 Folhas – Verão – Éter de Petróleo X Acetato de Etila X Metanol

Observa-se quando se compara os extratos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, de folhas coletadas no **verão**, que eles apresentam muitas diferenças entre si, isso pode ser observado também na análise estatística e na análise de infravermelho e pode ser justificado pela grande diferença de polaridade entre esses três solventes.

Pode-se perceber que o extrato de metanol apresenta sinais em regiões com menores TR, já o extrato de éter de petróleo possui a maioria dos sinais nas regiões com os maiores TR, enquanto que o extrato de acetato de etila possui sinais com TR intermediários, como mostra a figura 26.

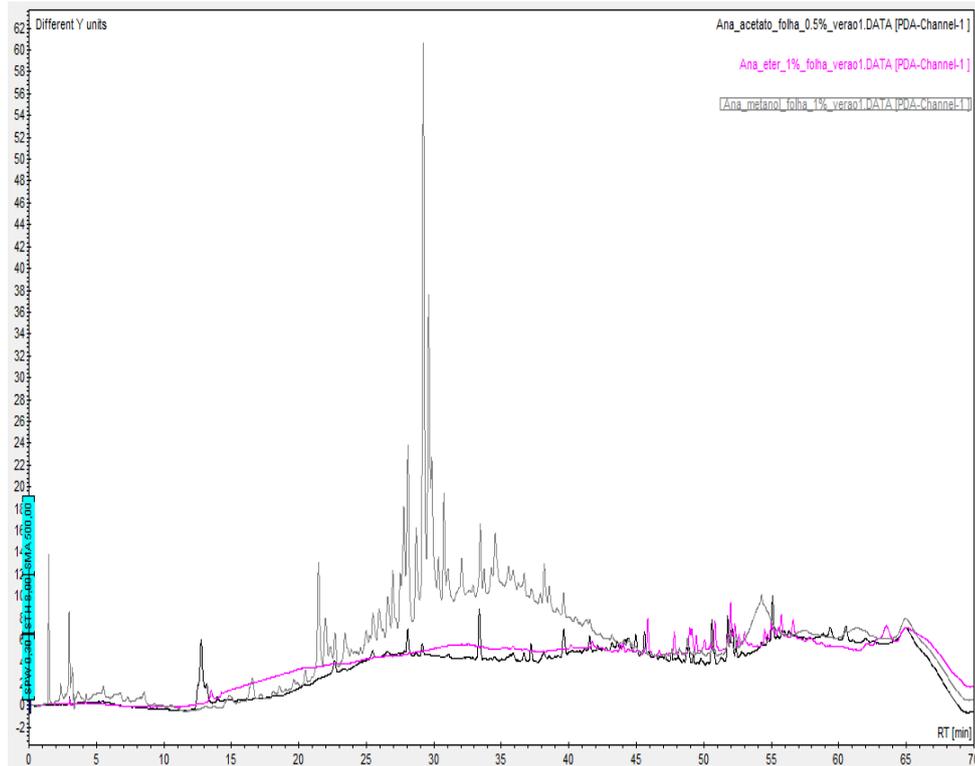


Figura 26 - Comparação entre os extratos de éter de petróleo verão folha (linha cinza), acetato de etila verão folha (linha preta), metanol verão folha (linha rosa)

Ainda salientado os resultados dos testes alelopáticos realizados em trabalho anterior (DALBOSCO, 2013), voltamos a atenção para o extrato de éter de petróleo/**verão** (figura 27), que foi destaque em termos de inibição de germinação das sementes de *I. grandifolia*, e para o acetato de etila/**verão** (figura 28) que nesses mesmos testes, provocou a redução do crescimento da radícula e do hipocótilo da mesma planta, *I. grandifolia*. Além disso provocou necroses, deformidades e até morte da semente previamente germinada.

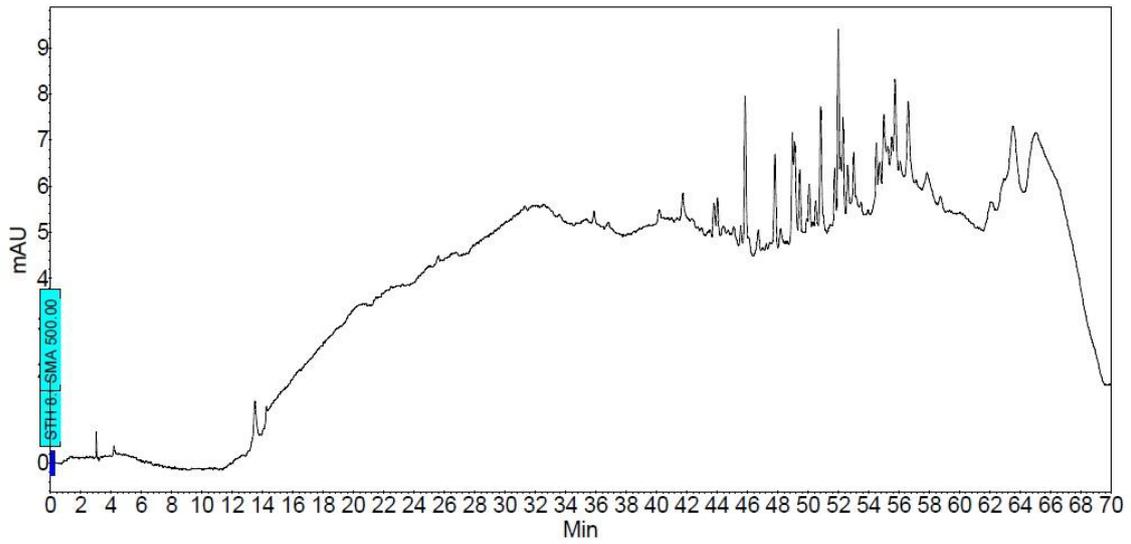


Figura 27 - Cromatograma do extrato de folha éter de petróleo verão

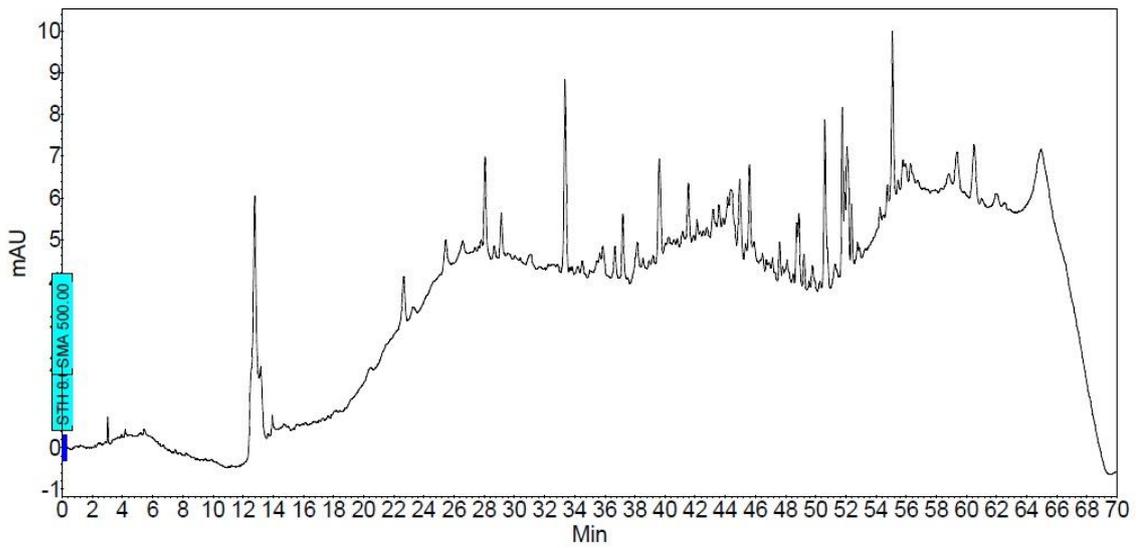


Figura 28 – Cromatograma do extrato de folha acetato de etila verão

5.1.3.6 Éter de Petróleo - Inverno - Folha X Raiz

Comparando-se os extratos de éter de petróleo da folha e da raiz, coletadas no **inverno**, observa-se que a maior concentração dos sinais encontra-se na região entre 35 a 60 min, região mais apolar, como era de se esperar devido ao caráter apolar do solvente (éter de petróleo) utilizado para a extração, como mostra a figura 29.

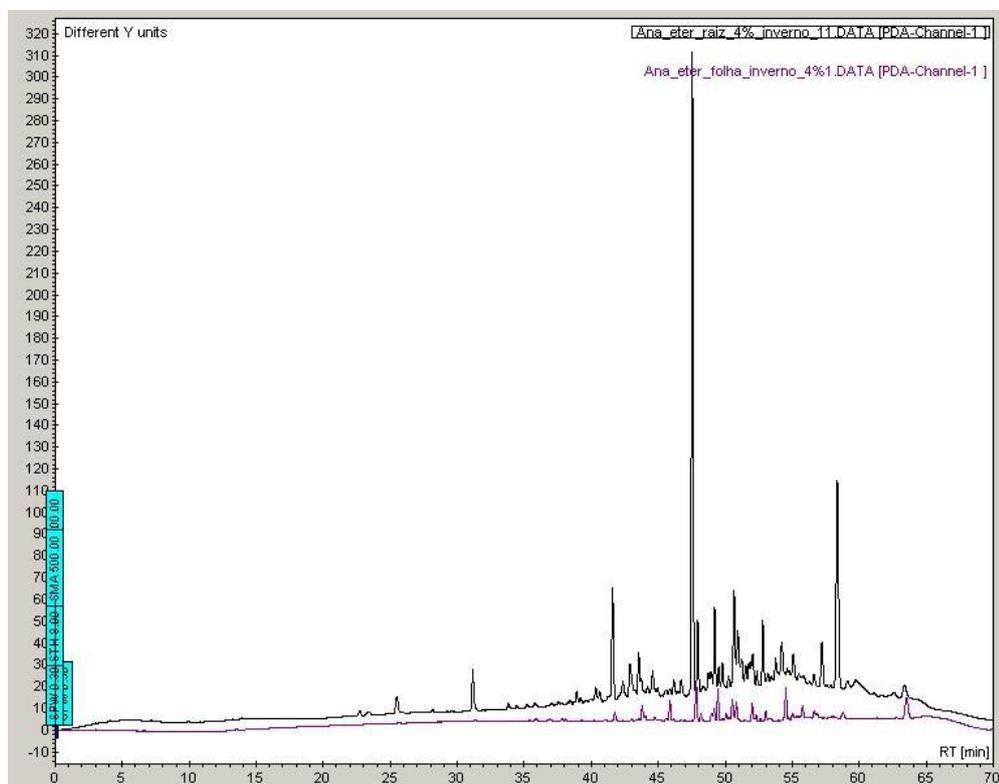


Figura 29 - Comparação entre os extratos éter de petróleo raiz (linha preta) e éter de petróleo inverno (linha rosa)

Pode-se perceber que existe uma grande diferença entre esses dois extratos, não só em termos de concentração como de composição. Sendo que, a raiz apresenta maior diversidade de compostos que a folha, além de possuir um sinal majoritário em aproximadamente 47,4 min que não é visualizado no extrato da folha (Figura 30).

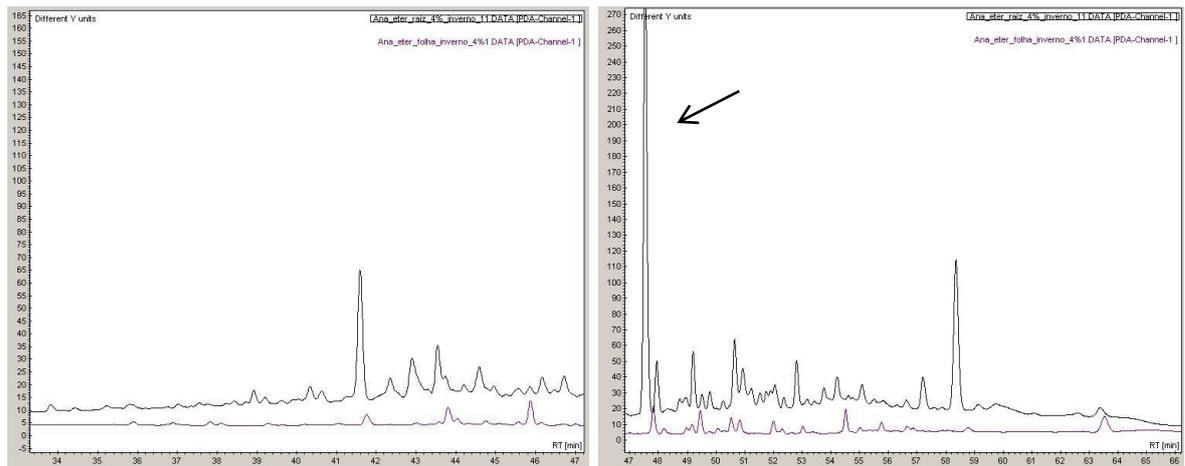


Figura 30 - Áreas ampliadas dos extratos de éter de petróleo raiz (linha preta) e éter de petróleo folha (linha rosa), a seta indica o pico majoritário no extrato da raiz

Essa grande diversidade de compostos, assim como, a presença de um componente majoritário no extrato de éter de petróleo raiz, apesar de ter sido analisado por CLAE somente o extrato de **inverno**, pode ser um indicativo para os resultados interessantes obtidos no trabalho de Silva (2014), que estudando o potencial alelopático de extratos brutos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol provenientes da raiz de *E. plana* Nees, verificou que o extrato de éter de petróleo, obtido no **verão**, foi um dos que mais retardou a cinética no processo de germinação.

Enquanto que, no trabalho de Dalbosco (2013), sobre o estudo do potencial alelopático dos extratos de éter de petróleo e acetato de etila provenientes das folhas de *E. plana* Nees coletadas no **verão** e no **inverno**, mostraram que o extrato de éter de petróleo obtido da folha, coletada no **verão** foi muito mais eficiente do que aquela coletada no **inverno**, em se tratando de inibição de germinação, de redução de crescimento de hipocótilo e de radícula. Sendo assim, o melhor desempenho do extrato de éter de petróleo **verão** pode ser explicado devido ao fato do extrato de éter de petróleo **inverno** ter pouca quantidade de compostos.

Ao compararem-se os resultados dos testes alelopáticos (inibição de germinação e redução de crescimento do hipocótilo e da radícula) foi observado que os extratos obtidos da raiz apresentaram resultados melhores que extratos obtidos das folhas. Pode-se afirmar então, que o melhor desempenho do extrato da raiz nos testes alelopáticos realizados se deve a uma maior diversidade de compostos,

quando comparado com o extrato da folha desse mesmo solvente, sendo de grande importância a identificação do sinal majoritário no mesmo.

5.1.3.7 Acetato de Etila – Inverno – Folha X Raiz

Comparando os extratos de acetato de etila folha e raiz, coletadas no **inverno**, observa-se que ambos apresentam uma grande variedade de compostos, assim como, percebe-se que existe uma grande diferença entre esses extratos, como mostra a figura 31.

Segundo Favaretto (2014) os compostos nitrogenados são observados em maior quantidade nas raízes de Capim Annoni-2, enquanto que nas folhas observa-se uma maior concentração de compostos polares e taninos, o que justifica a diferença observada nos espectros.

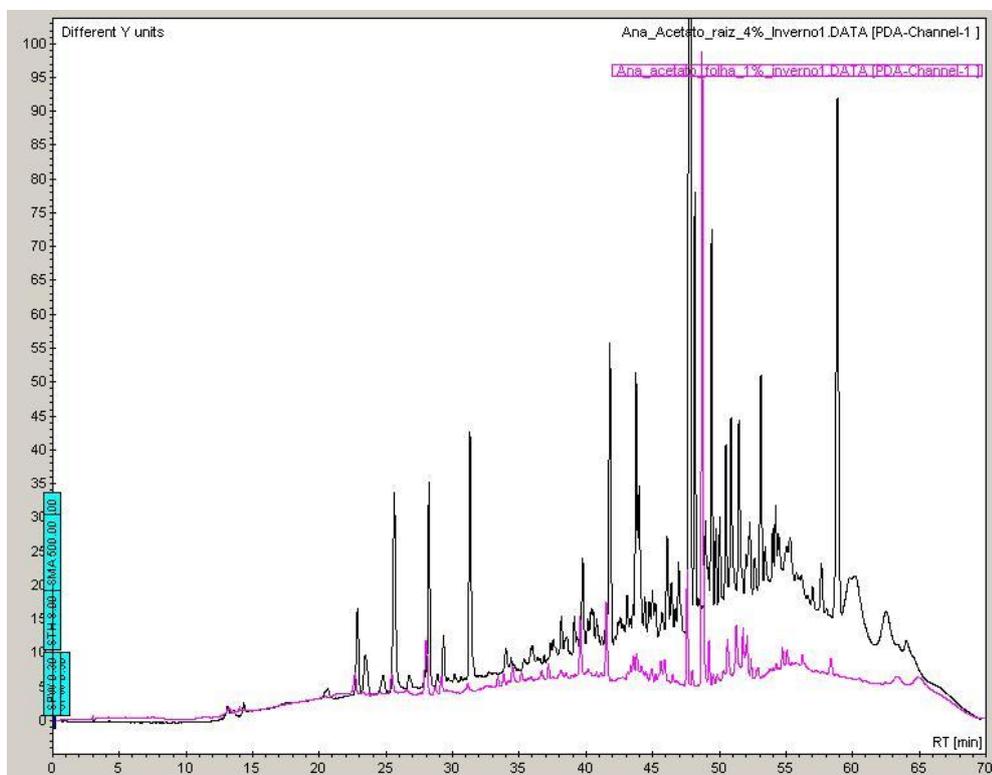


Figura 31 - Cromatograma dos extratos de acetato de etila raiz (linha preta) e acetato de etila folha (linha rosa)

É importante destacar também a presença de um sinal majoritário observado no extrato da folha de Capim Annoni-2, em aproximadamente 48,7 min esse mesmo sinal não é observado no extrato da raiz, como mostra a figura 32.

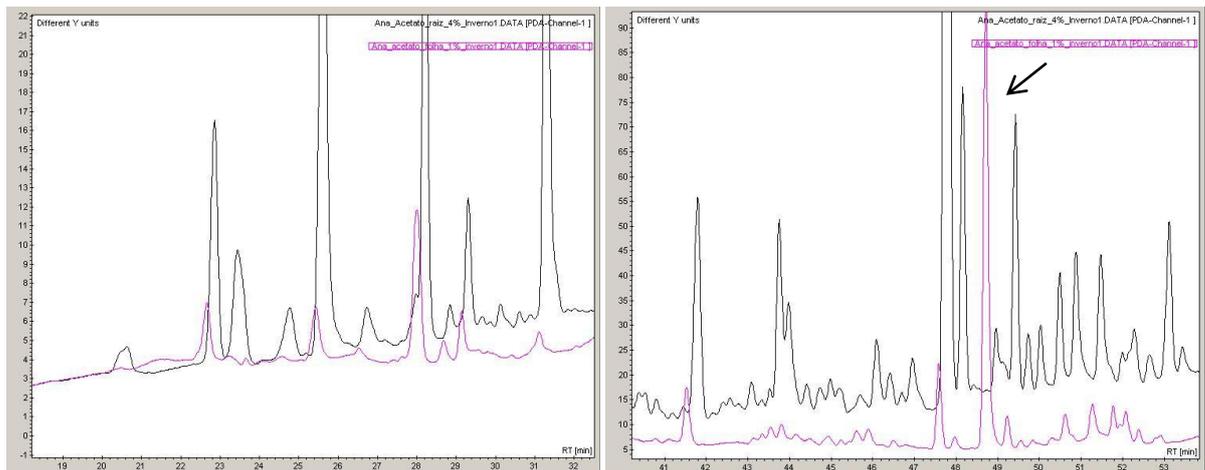


Figura 32 - Áreas ampliadas dos extratos de acetato de etila raiz (linha preta) e acetato de etila folha (linha rosa), a seta indica o pico majoritário no extrato da folha

5.1.3.8 Metanol – Folha Inverno X Etanol – Raiz Inverno

Com relação aos extratos de metanol folha e etanol raiz pode-se observar uma grande diferença entre eles, o extrato de metanol folha apresentou a maioria dos sinais na região entre 20 e 33 min, já o extrato de etanol raiz apresentou a maioria dos sinais entre 42 a 54 min aproximadamente, como mostra a figura 33.

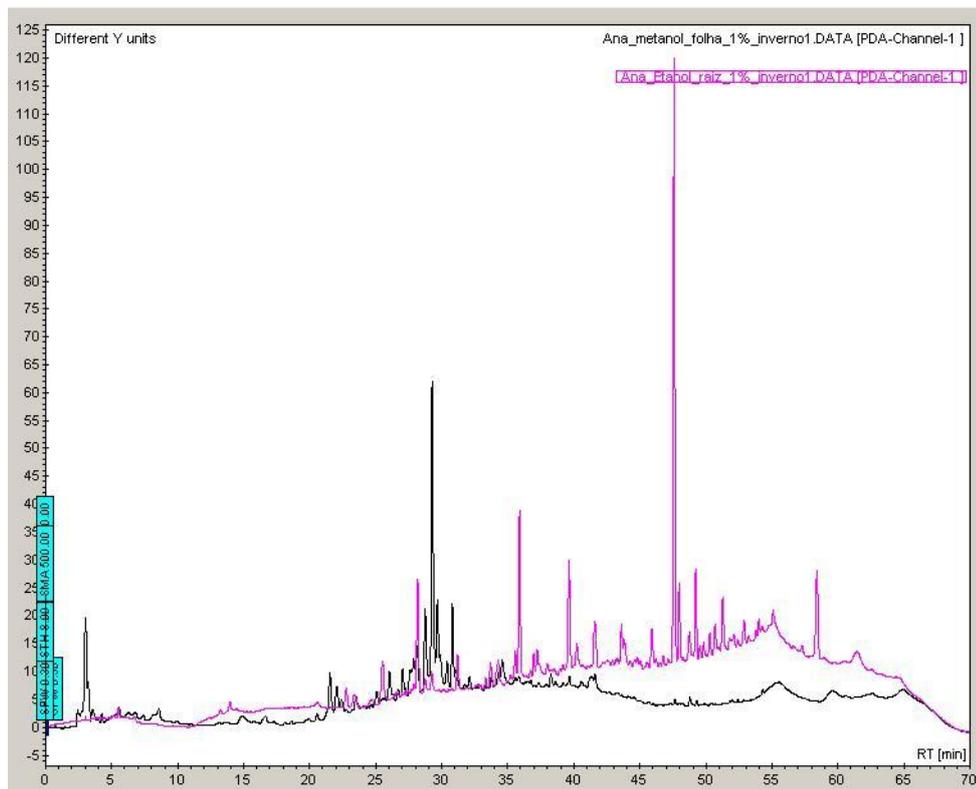


Figura 33 - Espectro dos extratos de etanol raiz (linha rosa) e metanol folha (linha preta)

Observa-se também que o extrato de etanol raiz apresentou uma quantidade maior de substâncias extraídas, além de um sinal majoritário em aproximadamente 47 min, esse sinal também pode ser observado no extrato de metanol folha, mas com intensidade menor.

Outra característica importante é que algumas substâncias que se encontram em ambos os extratos apresentam-se em maior ou menor intensidade dependendo do extrato, o que indica que algumas substâncias podem estar presentes em maior concentração na raiz e outras em maior concentração nas folhas, como mostra a figura 34.

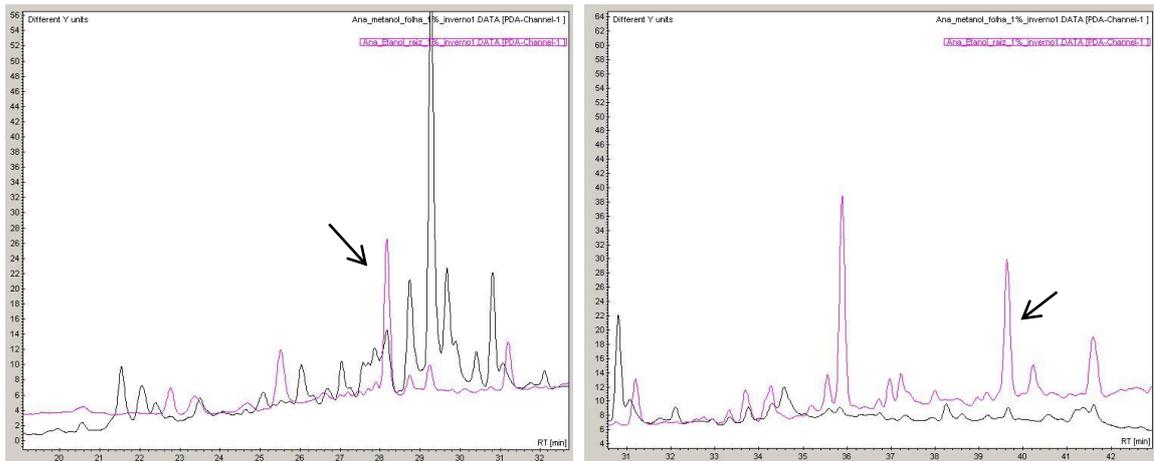


Figura 34 - Áreas ampliadas que representam as maiores diferenças entre os sinais do extrato de metanol folha (linha preta) e etanol raiz (linha rosa), as setas indicam alguns sinais que se destacam por estarem em maior intensidade quando comparados os dois extratos.

5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

Optou-se por iniciar o fracionamento e purificação do extrato de acetato de etila **verão** em função dos melhores resultados alelopáticos obtidos com esse extrato em trabalho anterior (DALBOSCO, 2013).

5.2.1 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila Verão

A coluna cromatográfica foi realizada utilizando-se 1 grama do extrato bruto de acetato de etila verão. Como fase estacionária utilizou-se sílica e como fase móvel utilizou-se os seguintes sistemas de solvente: hexano (100%); hex/acet (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1 e 3:7); acetato (100%); acet/DCM (8:2; 1:1 e 3:7); diclorometano (100%); DCM/metanol (9:1; 8:2; 7:3; 6:4 e 1:1) e metanol (100%), resultando em 83 frações.

Por meio da análise em CCD foi possível agregar as frações resultantes da coluna cromatográfica, de acordo com seus fatores de retenção, resultando em 22 frações referentes ao extrato de acetato de etila **verão** como mostra a tabela abaixo.

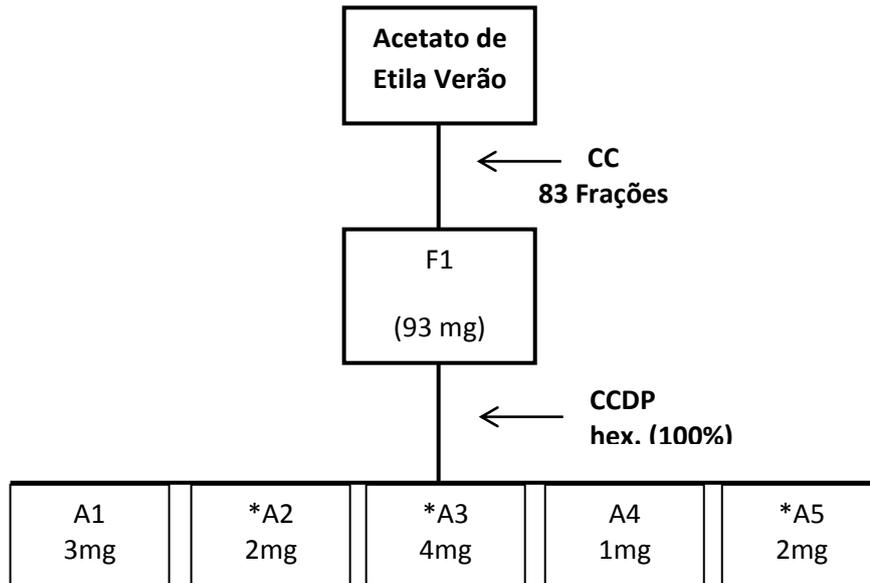
Tabela 2 - Frações obtidas a partir de coluna cromatográfica do extrato de Acetato de Etila verão (1 g)

Frações agrupadas	Fração	Massa (mg)	Frações agrupadas	Fração	Massa (mg)
F 1-9	F1	93	F 36	F12	1
F 10-11	F2	188	F 37-43	F13	10
F 12	F3	33	F 44	F14	1
F 13-15	F4	126	F 45-47	F15	2
F 16	F5	12	F 48-53	F16	7
F 17-20	F6	24	F 55	F17	3
F 21-23	F7	23	F 56-59	F18	1
F 24-26	F8	10	F 60-67	F19	1
F 27	F9	1	F 68-69	F20	114
F 28-33	F10	32	F 70-74	F21	14
F 34-35	F11	7	F 75-83	F22	46

O total de massa obtido na coluna foi 749 mg, resultando em 74,9% de eficiência.

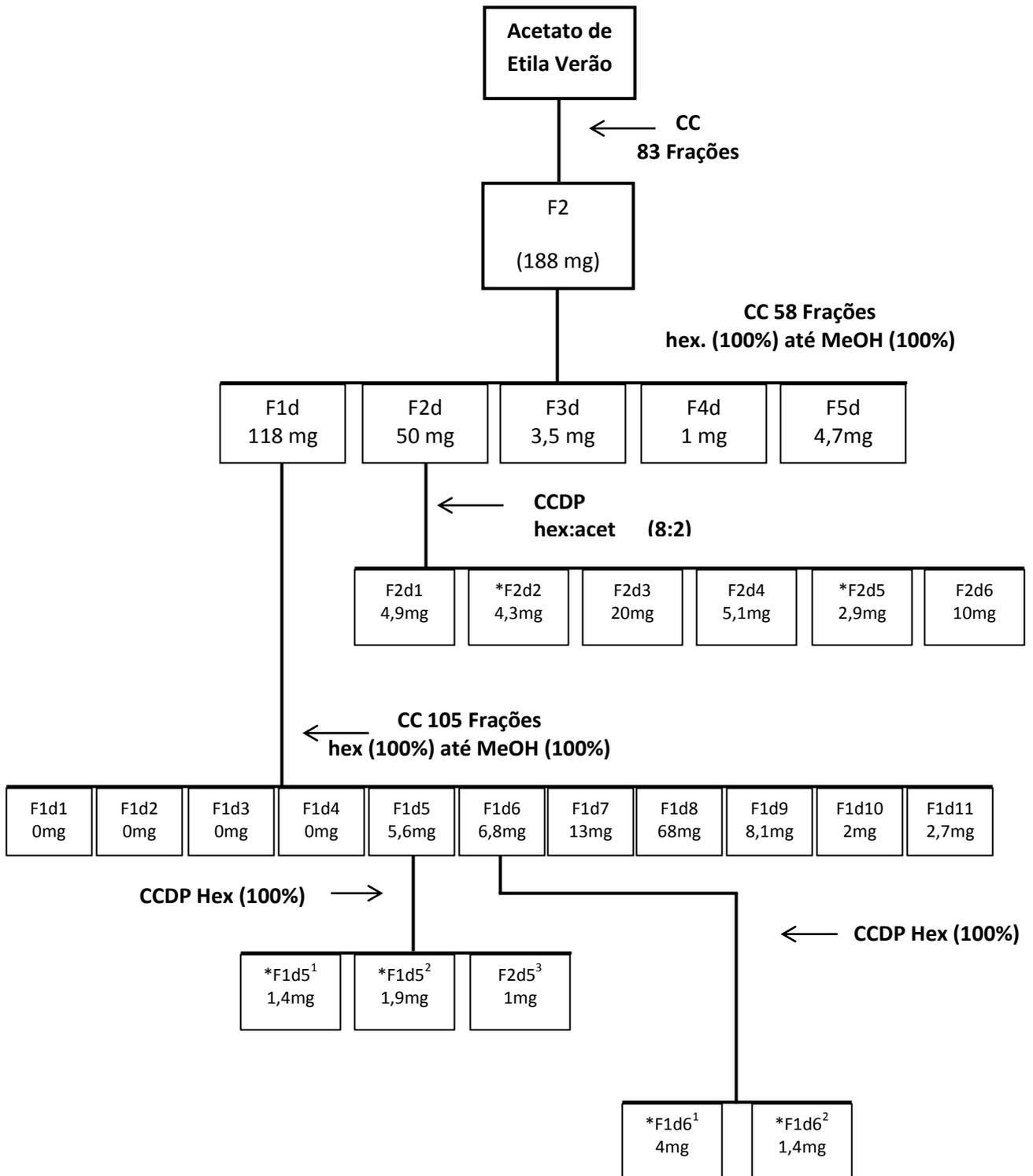
As frações em destaque na tabela 2 correspondem as frações que apresentaram melhores separações nas análises por CCD e que possuíam quantidade de massa suficiente para dar continuidade aos estudos fitoquímicos. Essas frações foram submetidas a novas purificações por técnicas de cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Os fluxogramas a seguir são referentes as frações isoladas do extrato de acetato de etila **verão**.

Inicialmente está sendo apresentado o estudo da fração F1 (Fluxograma 1).



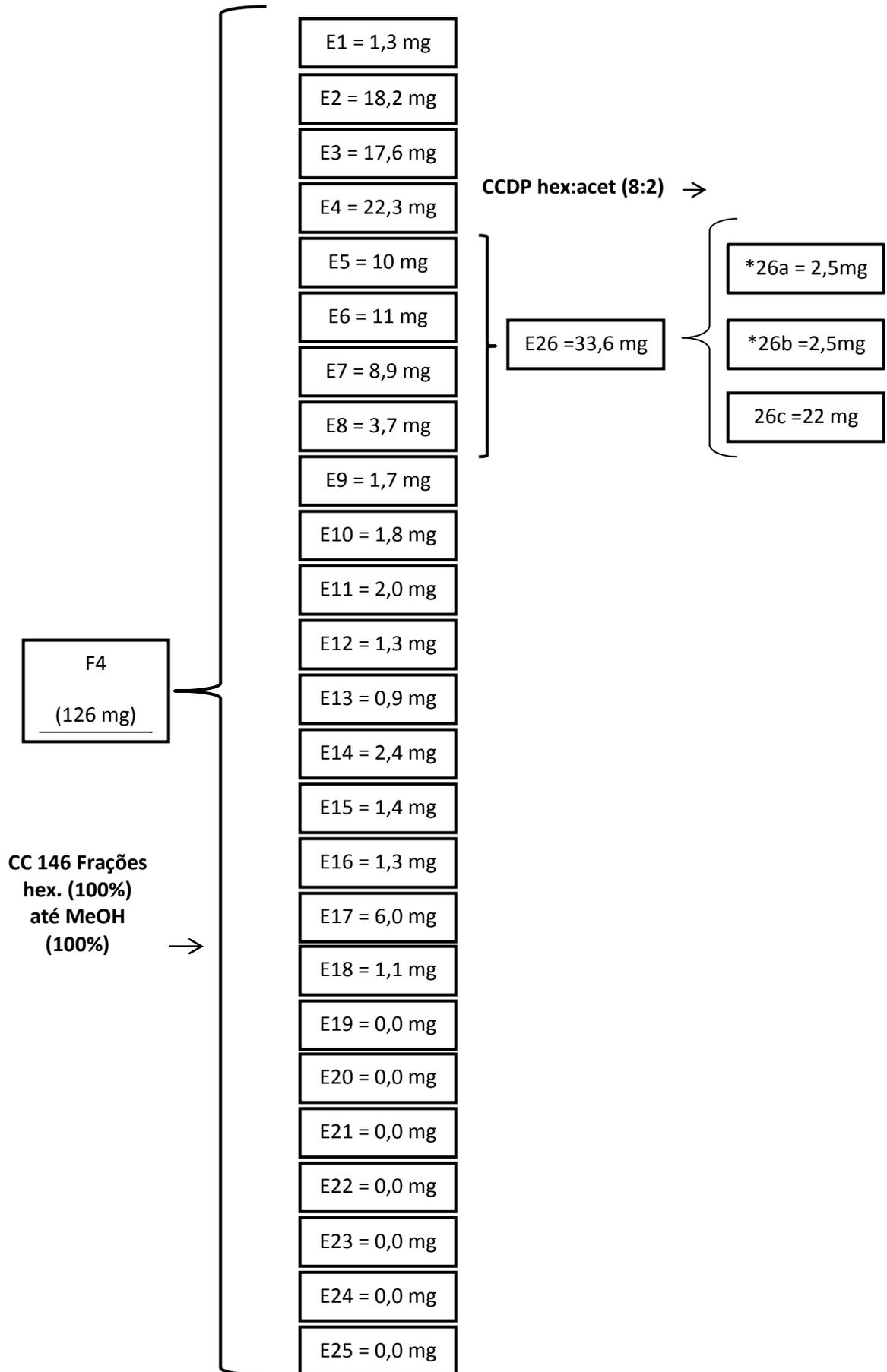
Fluxograma 1 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F1. *Substâncias analisadas por RMN ¹H

Na sequência está sendo apresentado o fracionamento e purificação da fração F2 (Fluxograma 2).



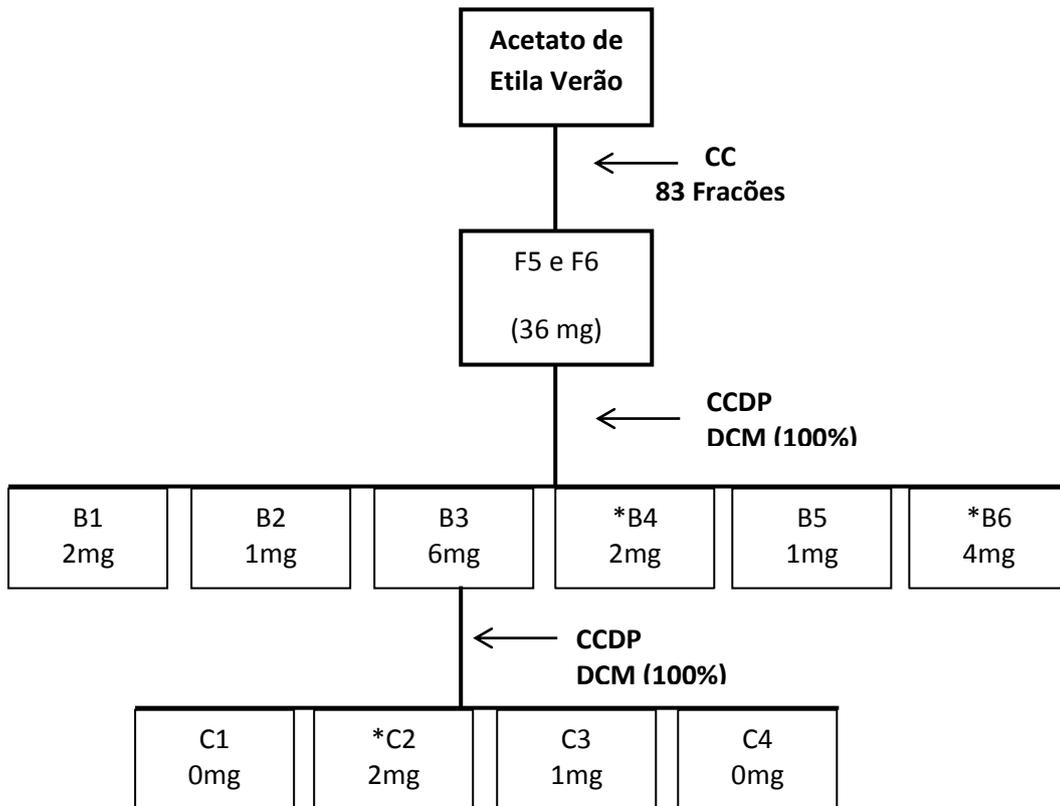
Fluxograma 2 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F2. *Substâncias analisadas por RMN ¹H

O fluxograma 3 representa a purificação da fração F4.



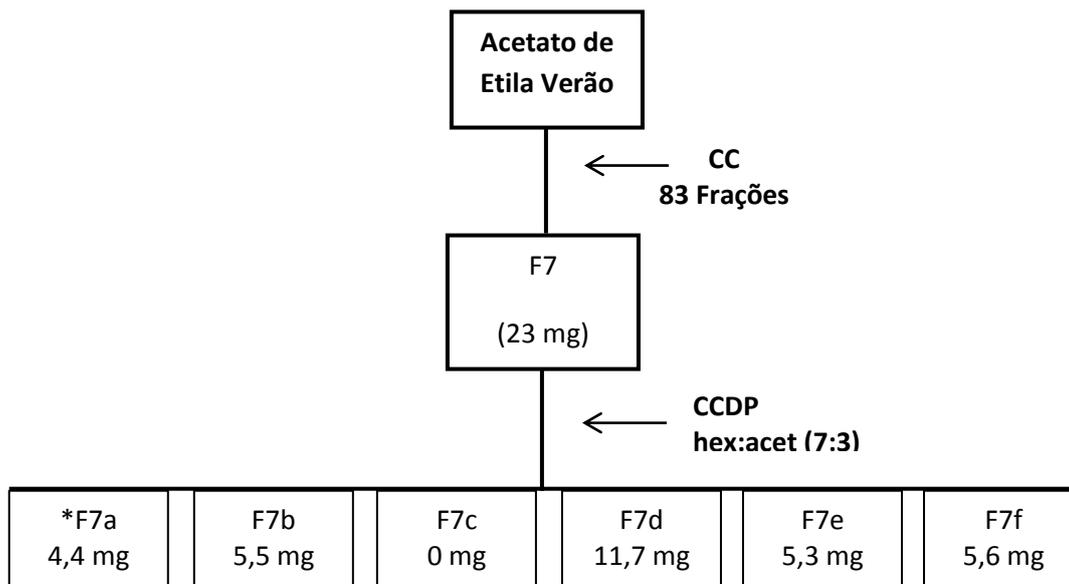
Fluxograma 3 - Substâncias obtidas a partir da purificação da fração F4. *Substâncias analisadas por RMN ¹H

Está sendo mostrado, no fluxograma 4, a purificação das frações F5 e F6.



Fluxograma 4 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações F5 e F6.
*Substâncias analisadas por RMN ¹H

A seguir está sendo apresentado o fluxograma 5 correspondente a purificação da fração F7.



Fluxograma 5 - Substâncias obtidas a partir da purificação da Fração F7.
*Substância analisada por RMN ^1H

As substâncias isoladas, selecionadas de acordo com seu grau de pureza, bem como quantidade foram enviadas para a Universidade Federal do Paraná, para análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C , bem como bidimensionais HSQC e HMBC e espectrometria de massas.

5.2.2 Fracionamento do Extrato de Acetato de Etila Inverno

A coluna cromatográfica foi realizada utilizando-se 0,5 grama do extrato bruto. Como fase estacionária utilizou-se sílica e como fase móvel utilizou-se os seguintes sistemas de solvente: hexano (100%); hex/acet (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 4:6 e 2:8); acetato (100%); acet/metanol (9:1; 8:2; 7:3; 1:1; 4:6 e 2:8) e metanol (100%), resultando em 442 frações.

Por meio da análise em CCD foi possível agregar as frações resultantes da coluna cromatográfica, de acordo com seus fatores de retenção, resultando em 42 frações referentes a extração de **inverno** como mostra a tabela abaixo.

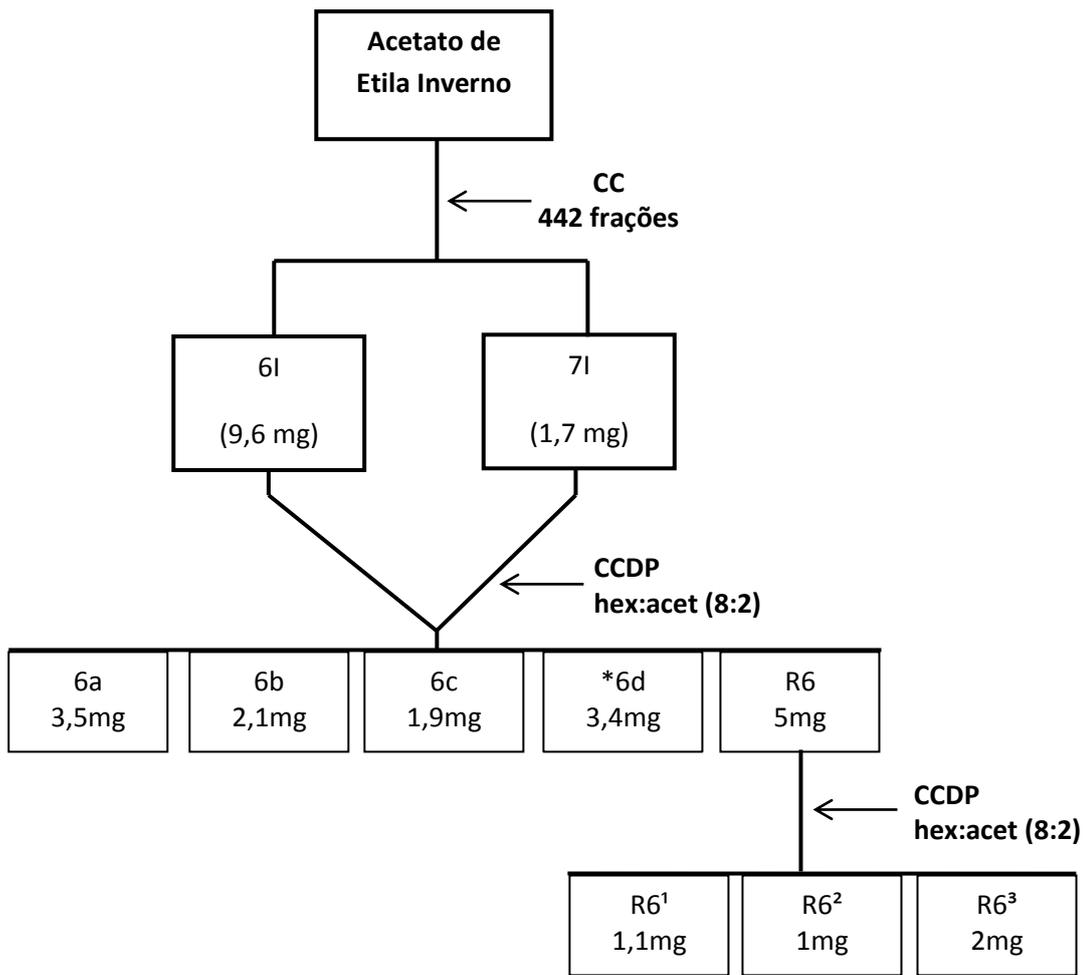
Tabela 3 - Frações obtidas a partir de coluna cromatográfica do extrato de Acetato de Etila Inverno (0,5 g)

Frações Agrupadas	Fração	Massa (mg)	Frações Agrupadas	Fração	Massa (mg)
F 1-10	1I	8	F 224-225	22I	0
F 11-25	2I	7,8	F 226-234	23I	1
			menos 228		
F 26-33	3I	29,8	F 228	24I	0
F 34-39	4I	8,4	F 235-237	25I	1,2
F 40-45	5I	11,8	F 238	26I	0
F 46-49	6I	9,6	F 239-240	27I	1
F 50	7I	1,7	F 241-242	28I	0
F 51-59	8I	18,4	F 243-245	29I	13
F 60-70	9I	15,4	F 246-253	30I	2,3
F 71-75	10I	5,2	F 254	31I	0
F 76-99	11I	19,8	F 255-262	32I	2
F 100-135	12I	13,7	F 263	33I	0
F 136-145	13I	2,5	F 264-271	34I	2
F 146-165	14I	4,9	F 272-293	35I	4,2
F 166-188	15I	10	F 294-309	36I	11
F 189-194	16I	2,4	F 310-318	37I	25,9
F 195-203	17I	1,5	F 319-322	38I	11
F 204-210	18I	1,5	F 323-333	39I	40
F 211-212	19I	1,1	F 334-345	40I	18,8
F 213-219	20I	1,8	F 346-369	41I	37
F 220-223	21I	1,4	F 370-442	42I	124

O total de massa obtido na coluna foi 470,1 mg, resultando em 94,2% de eficiência.

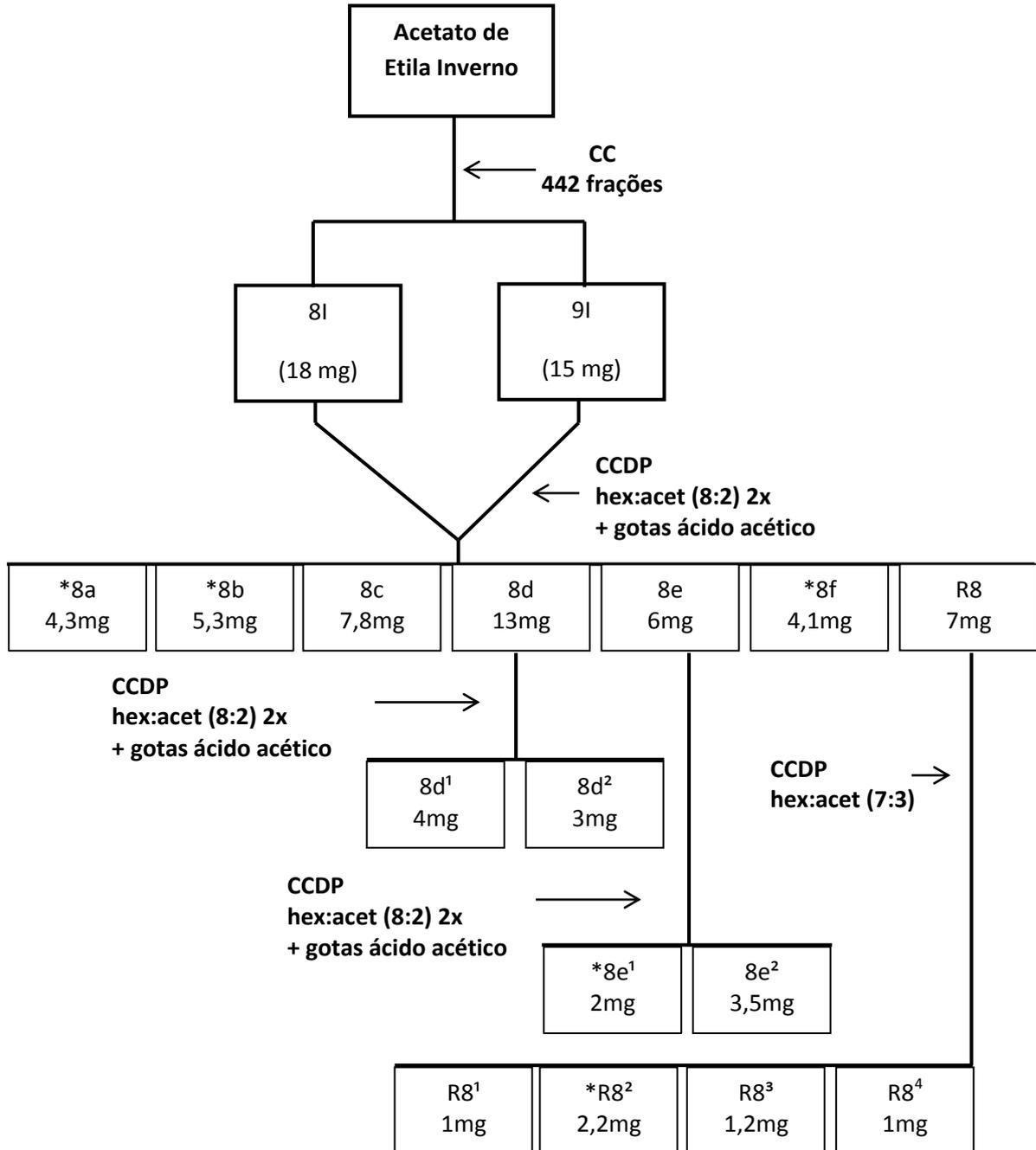
As frações destacadas na tabela 3 correspondem as frações já trabalhadas. Essas frações foram submetidas a novas purificações por técnicas de cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Os fluxogramas a seguir são referentes as frações isoladas do extrato de acetato de etila **inverno**.

Inicialmente está sendo apresentado o fluxograma correspondente a purificação das frações 6I e 7I (Fluxograma 6).



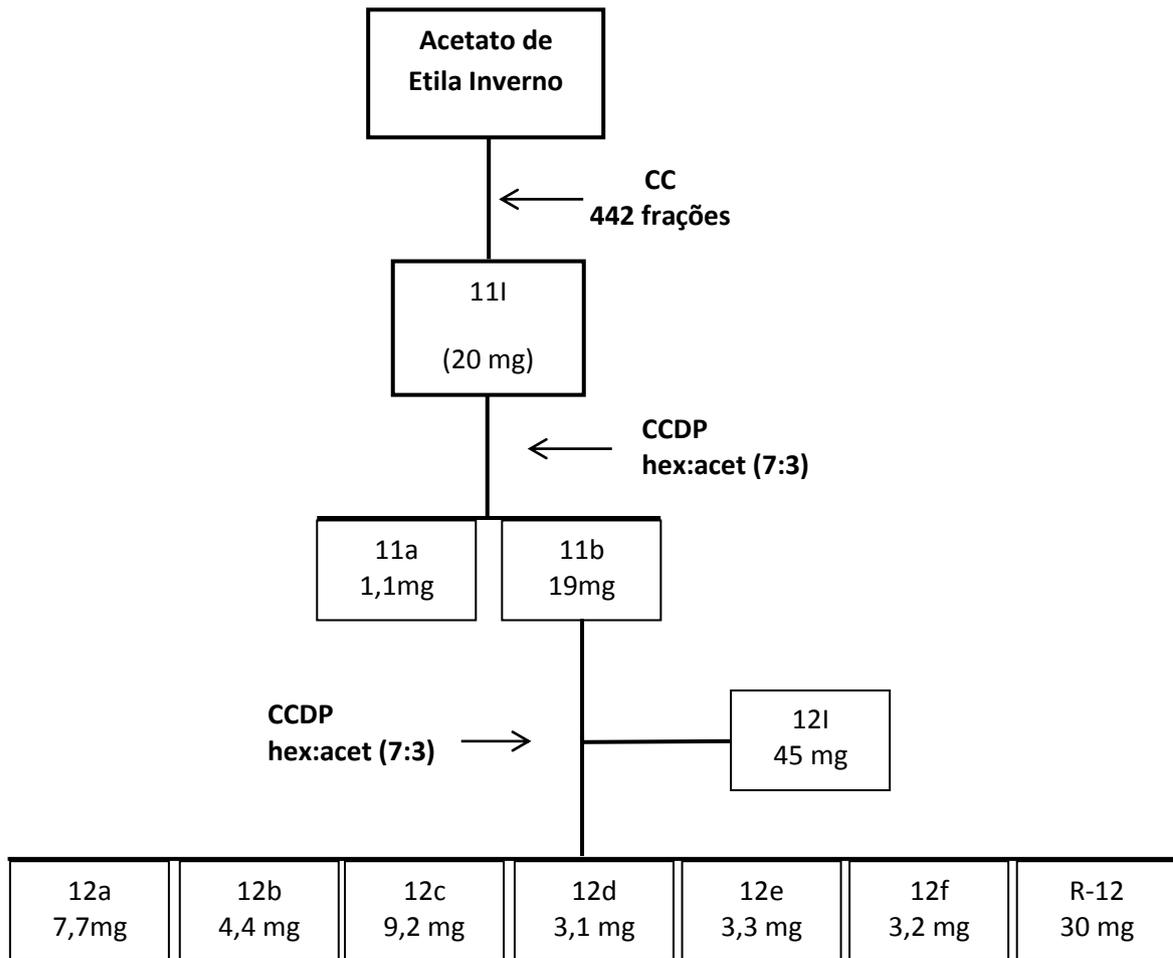
Fluxograma 6 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 6I e 7I.
 *Substância analisada por RMN ¹H

A seguir está sendo apresentado o fluxograma 7 que indica a purificação das frações 8I e 9I.



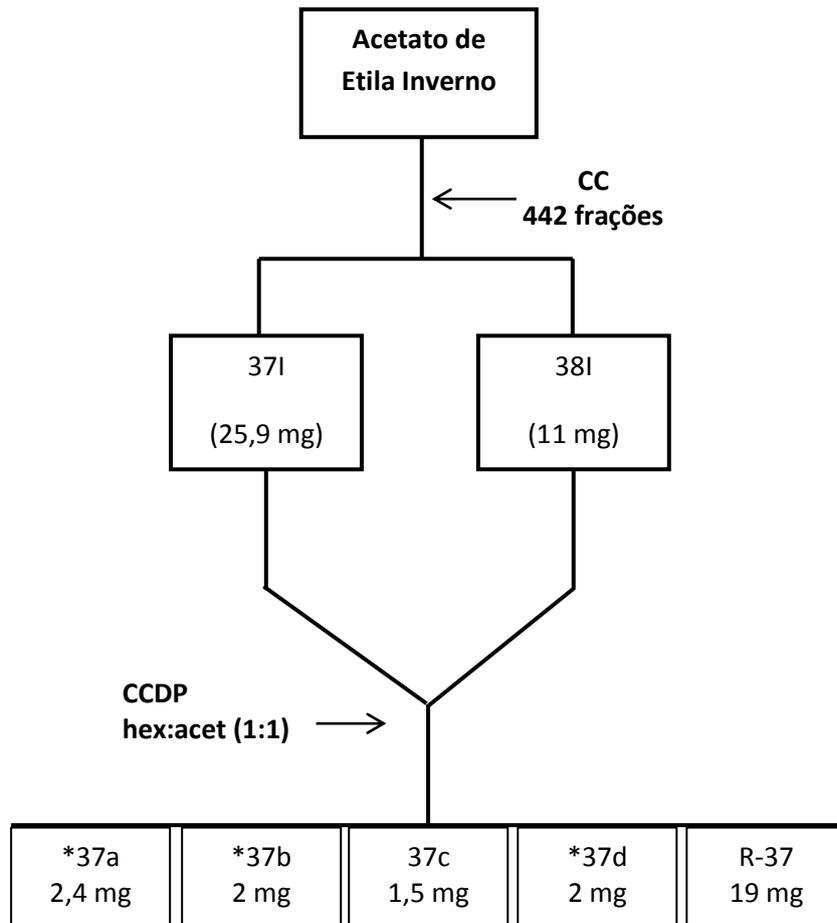
Fluxograma 7 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 8l e 9l. *Substâncias analisadas por RMN ¹H

No fluxograma 8, a purificação das frações 11l e 12l.



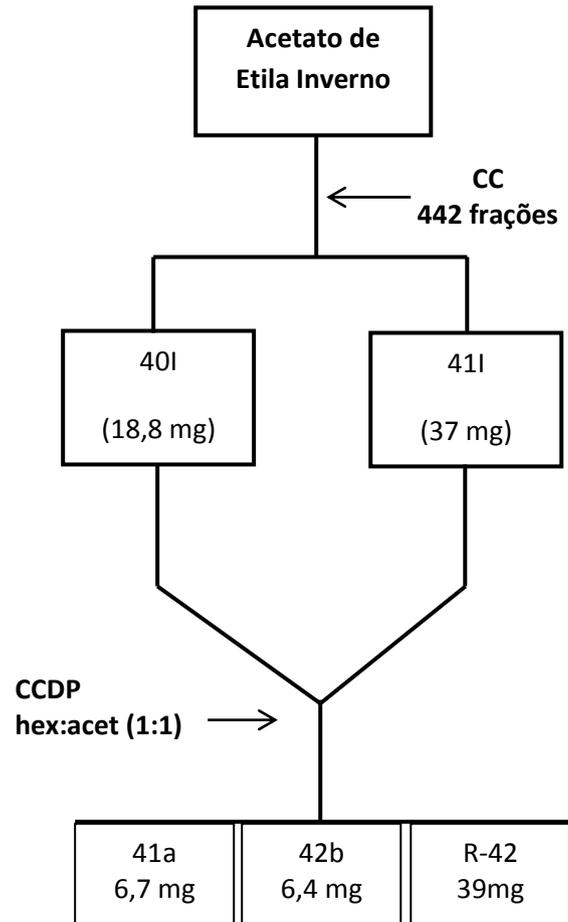
Fluxograma 8 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 11l e 12l.

A seguir, o fluxograma correspondente a purificação das frações 37l e 38l.



Fluxograma 9 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 37I e 38I. *Substâncias analisadas por RMN ¹H

No fluxograma 10, a purificação das frações 40I e 41I.



Fluxograma 10 - Substâncias obtidas a partir da purificação das Frações 40l e 41l

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA VERÃO

Dentre as substâncias isoladas do extrato de acetato de etila das folhas de Capim Annoni-2, coletadas no **verão**, foi possível a identificação de 2 substâncias: F7a e A-3. As demais selecionadas, do extrato de **verão**, já foram submetidas a RMN ^1H , e a análise desses espectros está em andamento. Na sequência são apresentadas as estruturas propostas para as substâncias identificadas.

5.3.1 Substância F7a

A amostra F7a foi identificada pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , análise heteronuclear ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ – HSQC e HMBC), análise de espectro de massas e comparação com a literatura.

A comparação com Carvalho, Oliveira e Werle (2000) permitiu confirmar uma unidade de glicerídeo em função de um multipletto em δ 5,25 (Hc), duplo dupletto em δ 4,29 (Ha) e um duplo dupletto em δ 4,14 (Hb) (Figuras 35 e 36), que se correlacionam no experimento de HSQC com os carbonos δ 69 (CH), δ 62,1 (CH₂), δ 62,1 (CH₂), respectivamente.

Os sinais de multipletto em δ 2,30 (H-2), multipletto em δ 1,62 (H-3'), multipletto em δ 1,25 (H-4' e H-5') e multipletto em δ 0,95 (H-6') pertencem a hidrogênios ligados, respectivamente, aos carbonos, δ 34,0 (CH₂), δ 37,1 (CH₂), δ 29 (CH₂) e δ 22,3 (CH₃) e confirmam a presença de cadeia alifática.

Observa-se também duas duplas ligações em triplete δ 4,33 (H-3) e multipletto δ 7,71 (H-5) que se correlacionam com os carbonos em δ 64 e δ 128 respectivamente.

Também foram feitos os experimentos de correlação a longa distância $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) (Figura 37) para elucidar completamente a estrutura da molécula.

A tabela 4 mostra os dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC do composto F7a.

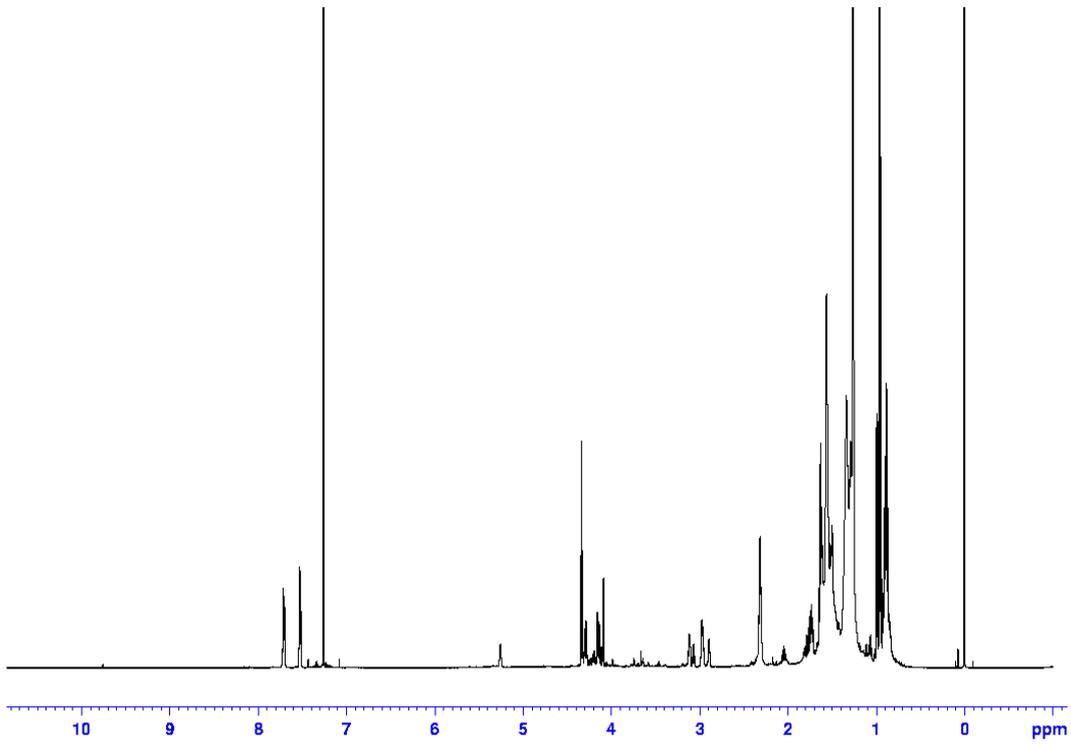


Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto F7a

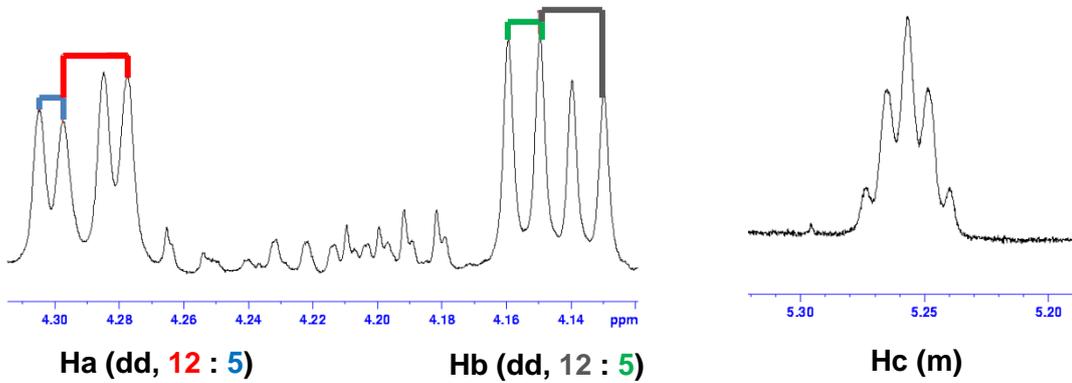


Figura 36 - Expansões relevantes do espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto F7a, ilustrando as constantes de acoplamento

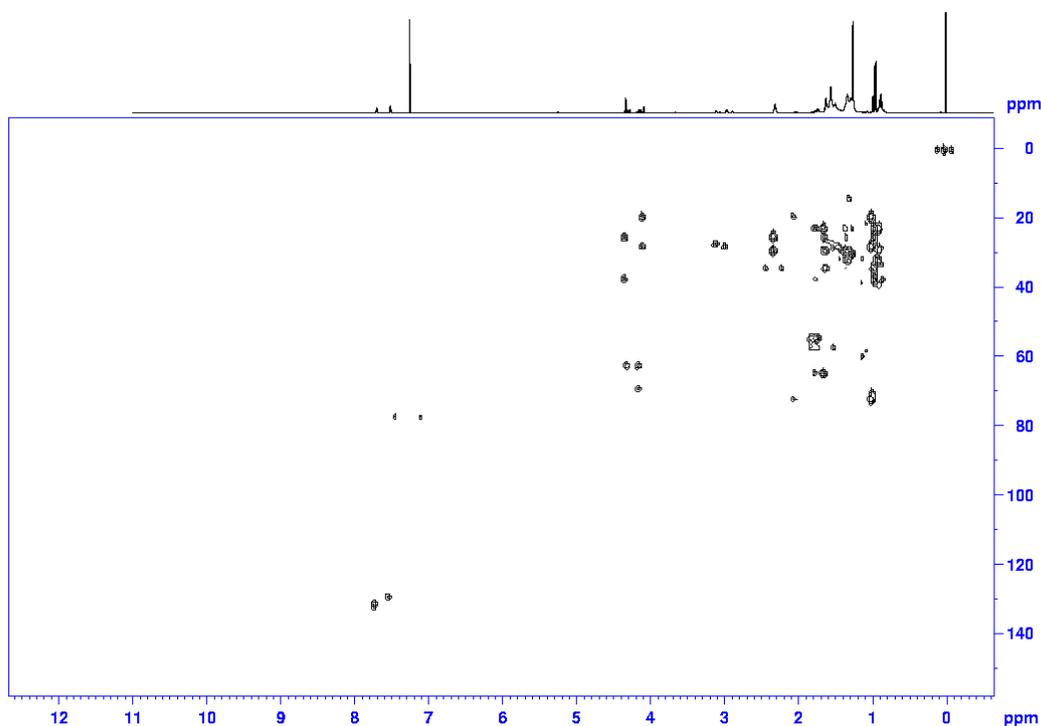


Figura 37 - Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do composto F7a

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para o composto F7a

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	173	-	Ha, Hb e 2
2	34	2,30 m	3
3	64	4,33 t (6.9 Hz)	4
4	130	7,51 m	5
5	128	7,71 m	6
6	70,5	4,08 dd (6.7, 1.01 Hz)	5
1'	173	-	Ha, Hb e 2'
2'	34	2,30 m	3'
3'	37,1	1,62 m	4'
4'	29	1,25 m	5'
5'	29	1,25 m	6'
6'	22,3	0,95 m	5'
OCH_2	62,1	Ha 4,29 dd (12.0, 5.0 Hz); Hb 4,14 dd (12.0, 5.0 Hz)	1, 1' e OCH
OCH	69	Hc 5,25 m	Ha e Hb
OCH_2	62,1	Ha 4,29 dd (12.0, 5.0 Hz); Hb 4,14 dd (12.0, 5.0 Hz)	1, 1' e OCH

A figura 38 apresenta a estrutura proposta para o composto F7a, identificado como um triacilglicerol inédito na literatura.

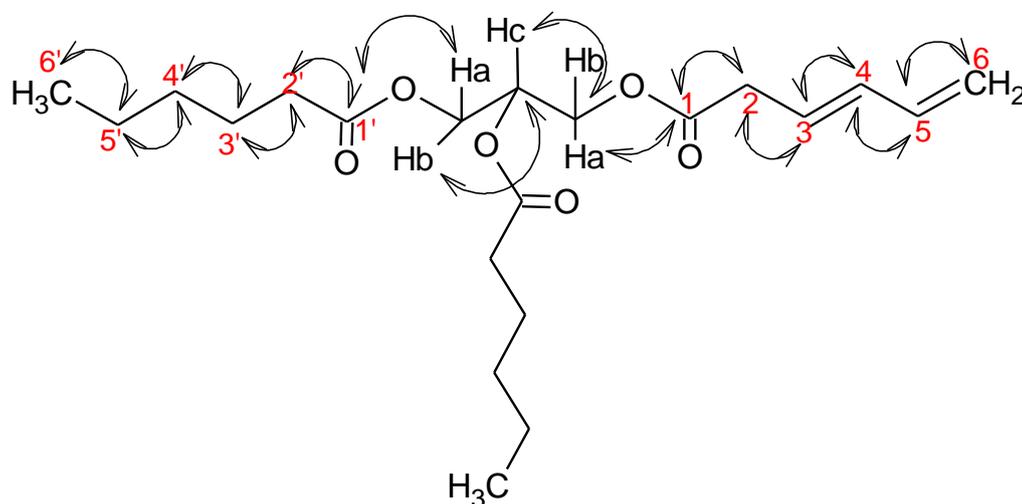


Figura 38 - Estrutura do composto F7a, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de HMBC

O espectro de massas mostrou sinais intensos em m/z 267,169, 325 e 326. Seguindo a proposta de fragmentação de Carvalho, Oliveira e Werle (2000) foi possível prever as fragmentações de massas para a estrutura elucidada como mostra a figura 39.

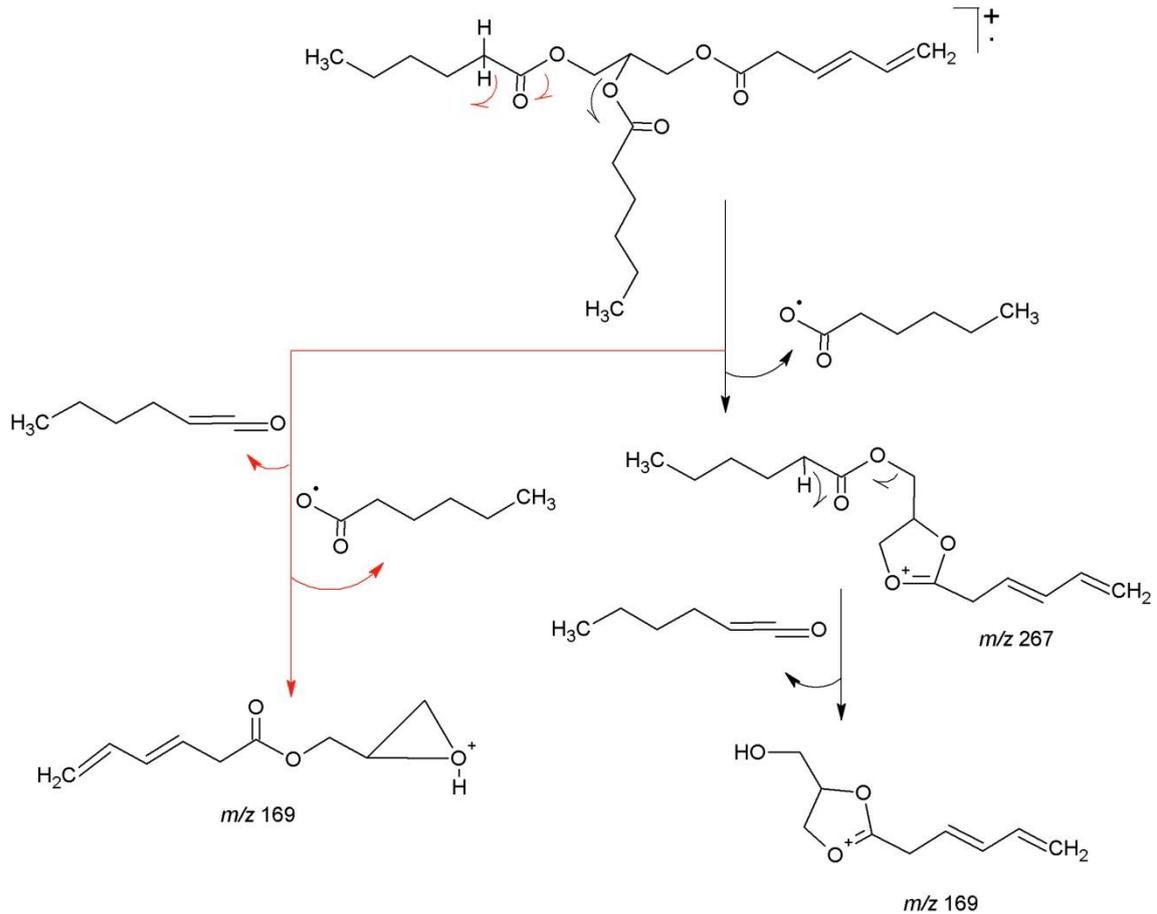


Figura 39 - Esquema das propostas de fragmentação de massas para o composto F7a

Para justificar o pico base ($m/z=326$) utilizou-se o rearranjo de McLafferty, como mostra a figura 40. O rearranjo de McLafferty é muito útil na identificação de estruturas, pois leva frequentemente a picos intensos característicos. Ele acontece em moléculas que possuem um heteroátomo em uma posição apropriada (oxigênio, por exemplo) em um sistema π (ligação dupla) e um átomo de hidrogênio que possa ser abstraído na posição γ em relação a carbonila (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

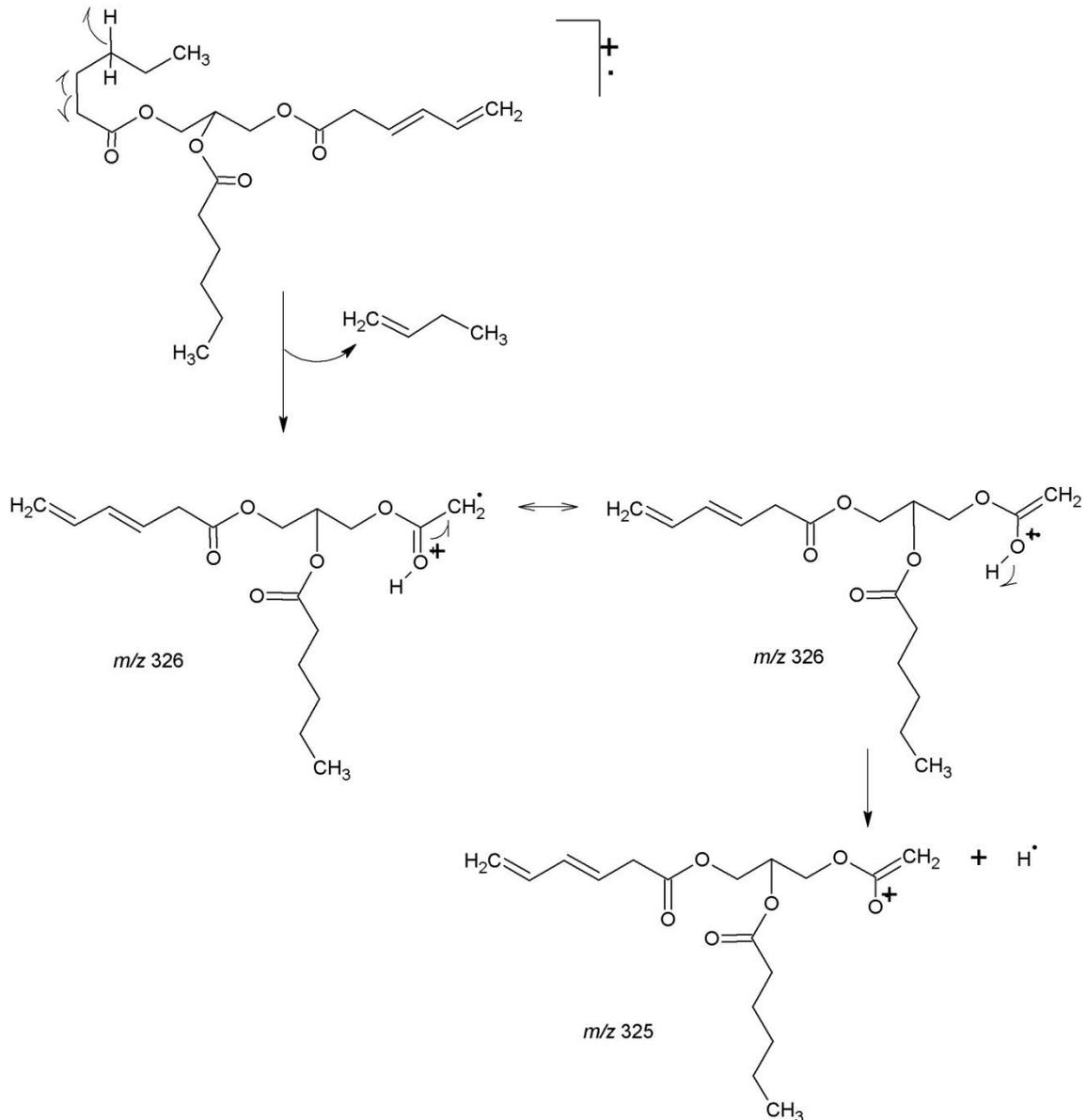


Figura 40 - Proposta de fragmentação para o sinal mais intenso do espectro de massas utilizando rearranjo de McLafferty

5.3.2 Substância A-3

A amostra A-3 foi identificada pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , análise heteronuclear ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ – HSQC e HMBC), análise de espectro de massas e comparação com a literatura.

Segundo Lu et al. (2008) é possível confirmar a presença de um esqueleto dehidrodeguelina, devido aos sinais no RMN ^1H (Figura 41 e 42) em singleto δ 7,43

(H-1), singlete δ 7,08 (H-4), multiplete δ 5,25 (H-6), duplete δ 6,85 (H-10) e duplete em δ 7,95 (H-11) que se correlacionam no experimento de HSQC com os carbonos δ 111 (CH), δ 103,5 (CH), δ 68,8 (CH₂), δ 115,3 (CH) e δ 128,9 (CH), respectivamente.

O sinal em singlete δ 3,88 é atribuído a dois grupos OMe em C-2 e C-3. E os sinais em singlete δ 1,60 e singlete δ 1,25 correspondem a dois grupos metila em C-7' e C-8'. O sinal em duplete δ 5,34 indica a presença de uma hidroxila em C-5'.

As correlações de H-1 e H-4 com C-1a, C-2, C-3 e C-4a, de H-10 com C-8, C-9 e C-11a e de H-11 com C-7a e C-12, obtidas pelo experimento HMBC (Figura 43), podem confirmar a presença de um esqueleto de rotenóide. A tabela 5 mostra os dados de RMN de ¹H, ¹³C e HMBC do composto A-3.

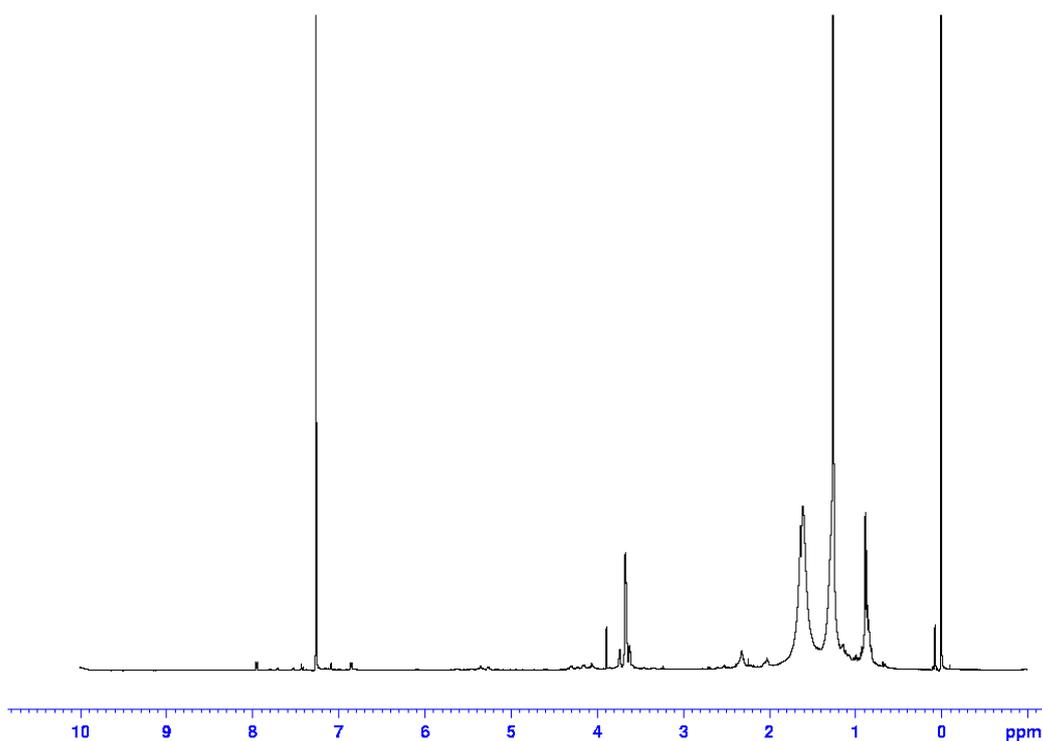


Figura 41 - Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do composto A-3

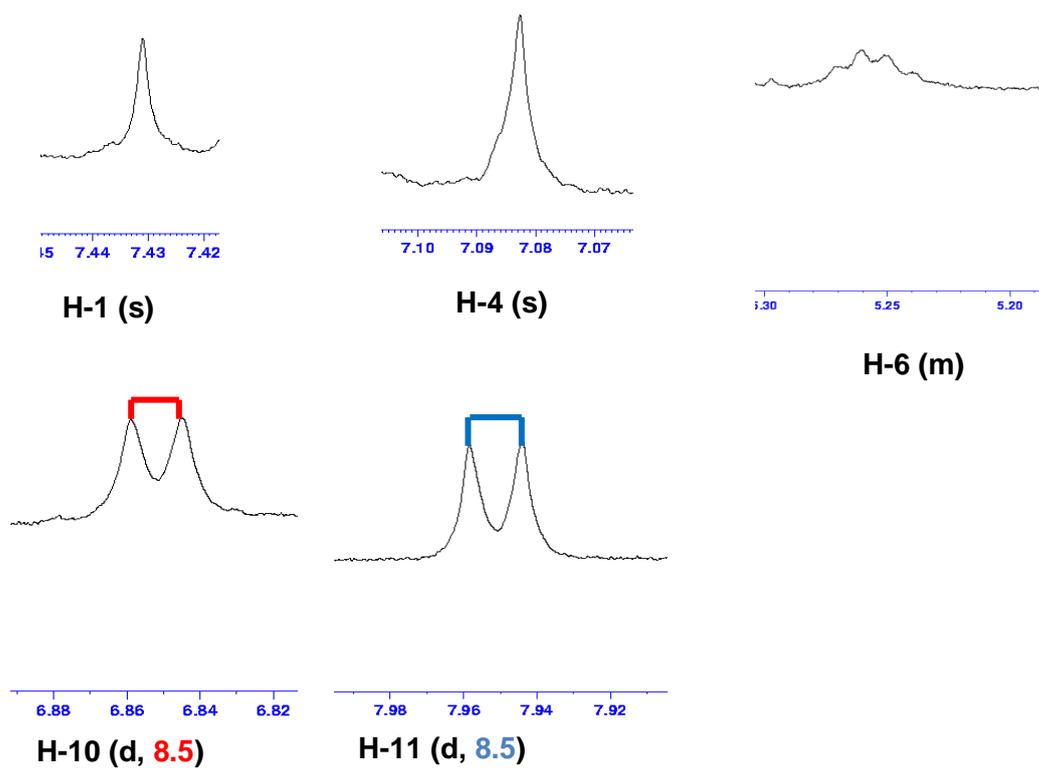


Figura 42 - Expansões relevantes do espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do composto A-3, ilustrando as constantes de acoplamento

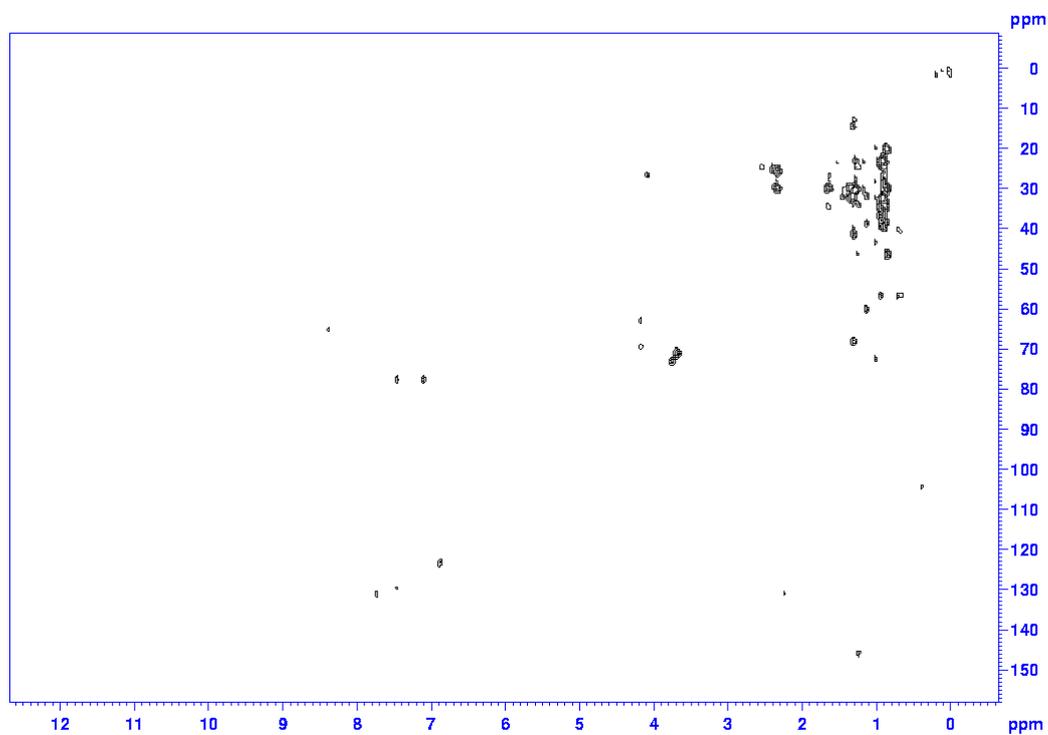


Figura 43 - Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do composto A-3

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para o composto A-3

Posição	$\bar{\delta}_{^{13}\text{C}}$	$\bar{\delta}_{^1\text{H}}$ (J)	HMBC (^1H - ^{13}C)	$\bar{\delta}_{^{13}\text{C}}$ *	$\bar{\delta}_{^1\text{H}}$ (J)*
1	111,0	7,43 s	1a, 2, 3 e 4a	110,5	8,34 s
1a	110,3			110,2	
2	144,4			143,4	
3	148,5			149	
4	103,5	7,08 s	1a, 2, 3 e 4a	101,1	6,69 s
4a	147,5			146,3	
6	68,8	5,25 m	6a e 12a	64,2	5,10 – 5,24 m
6a	157,4			157,1	
7a	155,6			155,1	
8	111,0			111,8	
9	156,2			156,8	
10	115,3	6,85 d (J=8.5)	8, 9 e 11	115,8	6,94 d (J=8,9)
11	128,9	7,95 d (J=8.5)	7a e 12	125,5	7,96 d (J=8,9)
11a	115,3			117,4	
12	172,3			173,1	
12a	110,3			110,5	
4'	62,6	4,29 dd (J=5 e 13)	5' e 7'	63,8	4,81 dd (J=4,2 e 4,4)
5'	70,7	3,65 m	6' e 7'	72,5	3,66 dd (J=4,3 e 4,2)
6'	77,5			78,9	
7'	24,1	1,60 s		24,1	1,40 s
8'	24,2	1,25 s	5' e 6'	23,1	1,35 s
2-3-OMe	52,1	3,88 s		55,6	3,77 s
4'-OH		-			5,78 d (J=5,1)
5'-OH		5,34 d (J=5)	4', 5' e 6' ^b		5,46 d (J=4,9)

^b Correlação fraca. *Lu et al. (2008)

A figura 44 apresenta a estrutura proposta para o composto A-3, identificado como um rotenóide, estrutura semelhante foi apresentada no trabalho de Lu et al. (2008), diferenciando-se um pouco da estrutura proposta aqui, pela presença de uma hidroxila na posição C-4', que é observada apenas no trabalho de Lu et al. (2008). É importante destacar que a classe dos rotenóides já foi relatada em plantas que apresentam ação sob diferentes pragas (MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; KALUMEA et al., 2012; BOSIRE, et al., 2014), sendo assim, a presença desse

rotenóide isolado do extrato de acetato de etila **verão** pode justificar o potencial alelopático observado no Capim Annoni-2 (DALBOSCO, 2013).

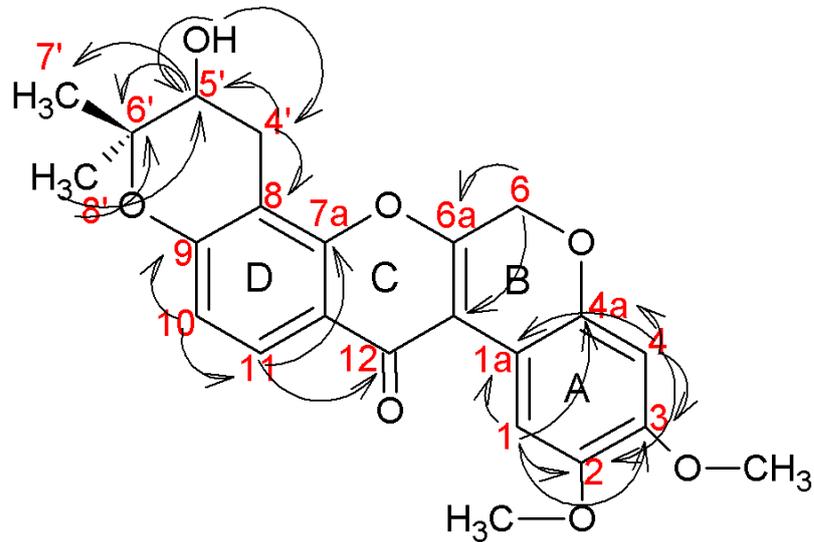


Figura 44 - Estrutura do composto A-3, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de HMBC

No espectro de massas do composto A-3, foi possível observar sinais intensos em m/z 193, 221 e 207. A figura 45 mostra as propostas de fragmentação de massas para esse composto.

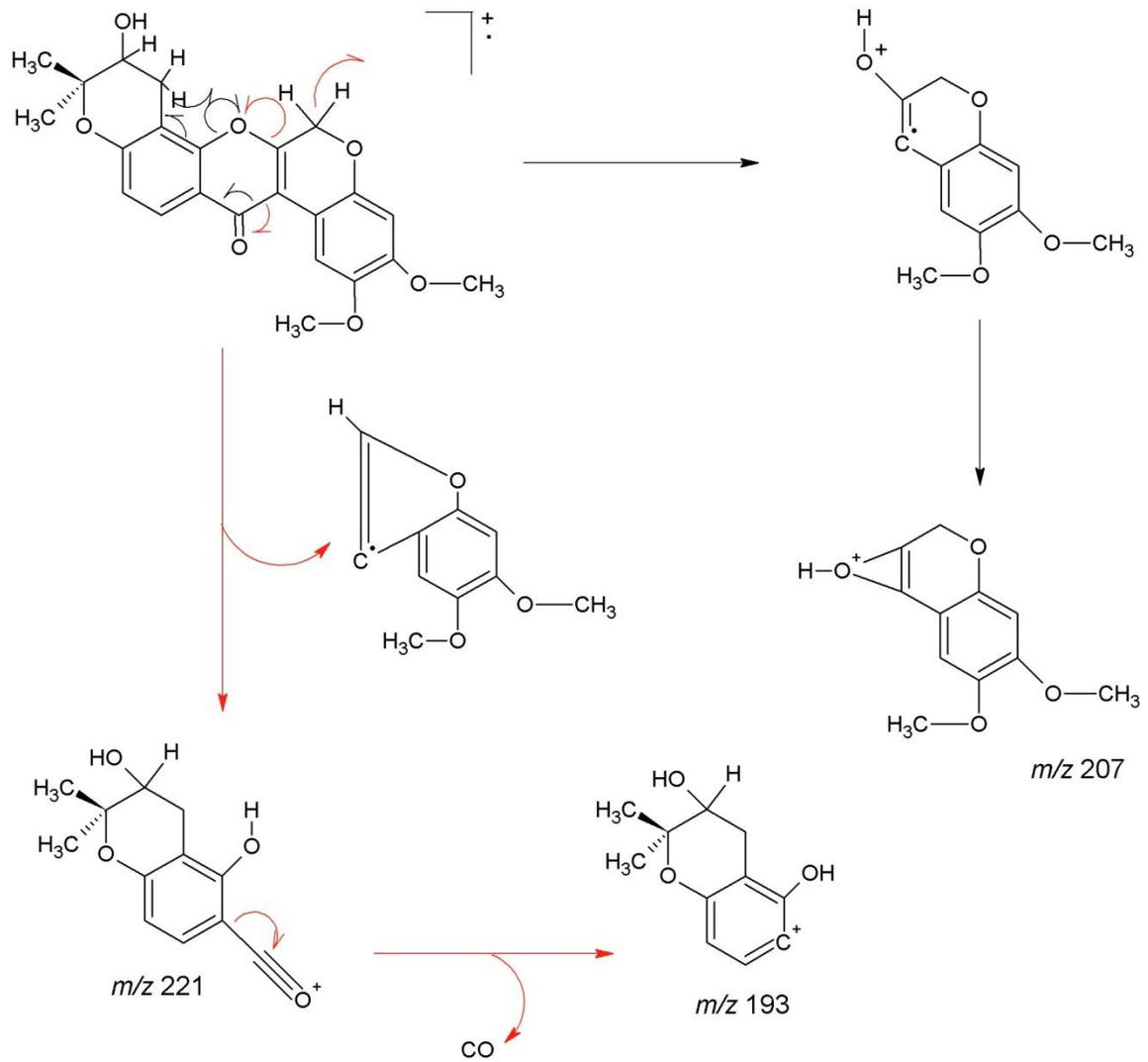


Figura 45 - Esquema das propostas de fragmentação de massas para o composto A-3

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, nas análises de infravermelho, análise dos componentes principais e cromatografia líquida de alta eficiência, percebe-se, que existe diferença entre os extratos de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, o que sugere riqueza, variedade, em termos de classes de compostos químicos presentes em cada um desses extratos.

A comparação dos extratos brutos por CLAE nos dá um indicativo de que a planta pode produzir maior ou menor concentração de uma determinada substância, dependendo da estação do ano, de acordo com suas necessidades. Observa-se também que os extratos de éter de petróleo/**verão** e acetato de etila/**verão**, das folhas, se diferenciam dos extratos de éter de petróleo/**inverno** e acetato de etila/**inverno**, respectivamente, por apresentarem alguns sinais mais intensos, o que pode justificar os melhores resultados alelopáticos, obtidos com esses extratos de **verão**, no trabalho de Dalbosco (2013).

É importante destacar também, que quando se compara os extratos de folhas e raízes de Capim Annoni-2 observa-se que ambos apresentam uma grande diversidade em termos de compostos químicos, assim como, fica clara a diferença entre esses extratos, sendo de grande importância, para trabalhos futuros, a identificação dos metabólitos correspondentes aos sinais majoritários observados nos extratos da raiz e da folha dessa espécie, quando analisados por CLAE.

Apesar de não ter sido possível a identificação de todos os metabólitos isolados, em função do tempo disponível, inicialmente foi observado a presença de duas classes de compostos químicos nas folhas de Capim Annoni-2, coletadas no **verão**, representadas por um triacilglicerol e um rotenoide. A presença de rotenoide é de grande importância, pois essa mesma classe já foi confirmada em outras espécies que apresentam ação herbicida, o que pode justificar o potencial alelopático do *E. plana* Nees, sendo de grande interesse a realização de testes alelopáticos com essa substância pura.

A elucidação das substâncias, isoladas dos extratos de acetato de etila **verão** e **inverno**, ainda está em andamento e espera-se que com a identificação de outros metabólitos isolados seja possível delinear um perfil químico das folhas do Capim Annoni-2, cujos extratos já apresentaram propriedades alelopáticas

interessantes, além de viabilizar futuros testes alelopáticos com alguns desses metabólitos puros.

REFERÊNCIAS

AGATI, Giovanni; AZZARELLO, Elisa; POLLASTRI, Susanna; TATTINI, Massimiliano. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67– 76, 2012.

AGOSTINETTO, Dirceu; VARGAS, Leandro. **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil**. Passo Fundo – RS: Gráfica Berthier, 2009.

ARAÚJO, Júlio M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**, 4. ed. Minas Geras: UFV, 2008.

ASHIHARA, Hiroshi; SANO, Hiroshi; CROZIER, Alan. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, p. 841–856, 2008.

BARBOSA, Lília Cristina de Souza. Morfoanatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae:Panicoideae). **Rev. Biol. Neotrop.**, v. 4, n. 1, p. 80-81, 2007.

BARBOSA, Fabiana G.; PILLAR, Valério D.; PALMER, Anthony R.; MELO, Adriano S. Predicting the current distribution and potential spread of the exotic grass *Eragrostis plana* Nees in South America and identifying a bioclimatic niche shift during invasion. **Austral Ecology**, v. 38, p. 260–267, 2013.

BATTESTIN, Vania; MATSUDA, Luis K.; MACEDO, Gabriela A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15, n.1, 2004.

BESSA, Tatiana; TERRONES, Manuel G. H.; SANTOS, Douglas Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus Echinatus*. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2007.

BEZERRA, Aline S.; NORBERG, José L.; LIMA, Fernanda O.; ROSA, Marcelo B.; CARVALHO, Leandro M. Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.9, p.1546-1552, 2013.

BOECHAT, Sonja De C.; LONGHI-WAGNER, Hilda M.. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Eragrostis* (Poaceae, Chloridoideae). **Revista brasileira Botânica**, São Paulo, v.23, n.2, p.177-194, 2000.

BORELLA, Junior; PASTORINI, Lindamir H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Revista Biotemas**, v.22 n.3, 2009.

BOSIRE, Carren M.; DEYOU, Tsegaye; KABARU, Jacques M.; KIMATA, Dennis M.; YENESEWB, Abiy. Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 17, p. 531–535, 2014.

BRESCIANI, Louisiane Faccio Verani. **Análise Qualitativa E Quantitativa De Metabólitos Secundários E Propriedades Farmacológicas De Quatro Espécies De Plantas Medicinais Da Flora Catarinense**. 2003. 169f. Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química (doutor em Química Orgânica) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003.

BURGER, Marcela C. de M.; OLIVEIRA, Gracielle S. de; MENEZES, Antônio C. S.; VIEIRA, Paulo C.; SILVA, Maria F. das G. F. da; VEIGA, Thiago A. M. Ácido Myrsinoico A e Derivado: Inibidores da Fotossíntese *In Vitro*. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1395-1400, 2012.

CANUTO, Kirley M.; SILVEIRA, Edilberto R.; BEZERRA, Antonio M. E. Estudo Fitoquímico de Espécimens Cultivados De Cumaru (*Amburana cearensis* A. C. SMITH). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.

CARMO, Flávia M. da S.; LIMA, Eduardo E. de e B.; TAKAKI, Massanori. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta bot. bras.** v. 21, n.3, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, Mário de; OLIVEIRA, Márcia C. C.; WERLE, Alceni A. Chemical Constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). **J. Braz. Chem.** v. 11, n. 3. p. 232-236, 2000.

CONSTANTIN, Jamil; OLIVEIRA, Robem S. de. **Plantas Daninhas e seu Manejo**. Guaíba – RS: Livraria e editora Agropecuária Ltda, 2001.

CORREIA, Paulo R. M.; FERREIRA, Márcia M. C. Reconhecimento De Padrões Por Métodos Não Supervisionados: Explorando Procedimentos Quimiométricos Para Tratamento De Dados Analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.481-487, 2007.

COUTINHO, Isabel D.; KATAOKA, Vanessa M. F.; HONDA, Neli K.; COELHO, Roberta G.; VIEIRA, Maria C.; CARDOSO, Cláudia A. L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 n.3, p.322-327, 2009.

DALBOSCO, Talita. **Avaliação Do Potencial Alelopático Dos Extratos Foliares Brutos Do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis Plana* Nees) E Estudo Do Óleo Essencial**. 2013. 104f. Dissertação Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

DASTAN, Dara; SALEHI, Peyman; GHANATI, Faezeh; GOHARI, Ahmad Reza; Hossein Maroofi; ALNAJAR, Naba. Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 43–48, 2014.

DEGENHARDT, Jorg; KOLLNER, Tobias G.; GERSHENZON, Jonathan. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621–1637, 2009.

DEWEY, Ralph E.; XIE, Jiahua. Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v. 94, p. 10–27, 2013.

ESTEVAM, Charles S.; CAVALCANTI, Amaro M.; CAMBUI, Érica Verena F.; NETO, Vítor Araújo; LEOPOLDO, Paulo T. G.; FERNANDES, Roberta P. M.; ARAUJO, Brancilene S. de; PORFÍRIO, Zenaldo; SANT'ANA, Antonio Euzébio G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entre casca de *Maytenus rigida* Mart. (*Celastraceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 299-303, 2009.

FAVARETTO, Adriana. **Aspectos Alelopáticos, Fitoquímicos E Anatômicos Do Capim-Annoni (*Eragrostis plana* Nees)**. 2014. 126 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF. Área de concentração em Produção Vegetal, Passo Fundo, 2014.

FERREIRA Nadilson R.; MEDEIROS Renato B. de; SOARES, Geraldo L. G. (2008a) Potencial alelopático do Capim-Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Semente**, Porto Alegre, v. 30, p. 43-50, 2008.

FERREIRA Nadilson R.; MEDEIROS Renato B. de; FAVRETO, Rodrigo (2008b). Banco de Sementes do Solo de Margem Viária Dominada por Capim Annoni-2 Sujeito a Controle com Distúrbios no Solo e Introdução de Gramíneas. **Revista Brasileira de Semente**, Porto Alegre, v. 30, p. 54-63, 2008.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VIANA, P.L.; ZANIN, A.; OLIVEIRA, R.C. de; CANTO-DOROW, T.S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J.F.M.; OLIVEIRA, R.P.; RODRIGUES, R.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.; WELKER, C.A.D.; FERREIRA, F.M.; CARVALHO, M.L.S.; SILVA, A.S.; REIS, P.A.; DÓREA, M.C.; SILVA, C.; MOTA, A.C. *Poaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB193>>. Acesso em: 09 Abr. 2014.

FILHO, Raimundo B. Contribuição da Fitoquímica Para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

FORMAGIO, Anelise S. N.; MASETTO, Tathiana E.; VIEIRA, Maria do C.; ZÁRATA, Néstor A. H.; COSTA, Willian F.; TREVISAN, Lucas N. F.; SARRAGIOTTO, Maria H. Potencial alelopático de *Tropaeolum majus* L. na germinação e crescimento inicial de plântulas de picão-preto. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2011.

GOMES, Renata V. R. De S.; VILELA, Vinícius L. R.; GOMES, Escarião Da N.; MAIA, Ana Josicleide; ATHAYDE, Ana Célia Rodrigues. Análise Fitoquímica de Extratos Botânicos Utilizados no Tratamento de Helmintoses Gastrointestinais de Pequenos Ruminantes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GONZÁLES, Paul; NAVARRO, Eduardo; TORRE, Maria I. La; CANO, Asunción. La Familia Poaceae del Distrito de Arahuyaya (Canta, Lima, Peru). **Rev. Peru. Biol.** v. 18, n. 2, p. 189-196, 2011.

GOULART, Ives C. G. dos R.; NUNES, Anderson L.; KUPAS Valmir; JUNIOR, Aldo M. Interações entre herbicidas e protetores para o controle de Capim-Annoni em pastagem natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.10, p.1722-1730, 2012.

HE, Wu; DOU, Huanjing; LI, Zhigang; WANG, Xiaogai; WANG, Lvjing; WANG, Ruiyong; CHANG, Junbiao. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 123 p. 176–186, 2014.

HAEGELE AD, Gillette C, O'NEILL C, WOLFE P, HEIMENDINGER J, SEDLACEK S, et al. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 9, p. 421-425, 2000.

HELDT, Hans W. **Plant Biochemistry**, 3. Ed. USA: Elsevier, 2005.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M.G., MORAIS, S.A.L., FERREIRA, S., SANTOS, D.Q., NASCIMENTO, E.A. e CHANG, R. Estudo Fitoquímico e Alelopático do Extrato de Caule de Sucupira-Branca (*Pterodon emarginatus*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 25, n. 4, 2007.

HO, Shuk C.; CHUNG, Joanne W. Y. The effects of caffeine abstinence on sleep: A pilot study. **Applied Nursing Research**, v. 26 p. 80–84, 2013.

IHA, Silvia M.; MIGLIATO, Ketylin F.; VELLOSA, José C. R.; SACRAMENTO, Luis Vitor S.; PIETRO, Rosemeire C. L. R.; ISAAC, Vera L. B.; BRUNETTI, Iguatemy L.; CORRÊA, Marcos A.; Salgado, Hérica R. N.. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, 2008.

KALUMEA, M.K.; LOSSONB, B.; ANGENOT, L.; TITS, M.; WAUTERS, J.N.; FRÉDÉRICHC, M.; SAEGERMAND, C. Rotenoid content and in vitro acaricidal activity of *Tephrosia vogelii* leaf extract on the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Veterinary Parasitology*. v. 190, p. 204–209, 2012.

KHANBABAEE, Karamali; REE, Teunis van. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, v. 18, p. 641–649, 2001.

KIM, Yun-Soo, SANO, Hiroshi. Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. **Phytochemistry**, v. 69, p.882–888, 2008.

KIMURA, Yasuo; SHIMADA, Atsumi; KUSANO, Miyako; YOSHII, Katsunobu; MORITA, Akiko; NISHIBE, Masahiko; FUJIOKA, Shozo; KAWANO, Tsuyoshi. Myxostiolide, Myxostiol, and Clavatoic Acid, Plant Growth Regulators from the Fungus *Myxotrichum stipitatum*. **J. Nat. Prod.**, p. 65, n. 621-623, 2002.

KISSMANN, Gottfried K. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A, 1991.

KOLECKAR, Vit; KUBIKOVA, Katerina; REHAKOVA, Zuzana; KUČA, Kamil; JUN, Daniel; JAHODAR, Ludek; OPLETAL, Lubomir. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 436-447, 2008.

KUPSKA, Magdalena; CHMIEL, Tomasz; JEDRKIEWICZ, Renata; Waldemar; WARDENCKI, Jacek Namiesnik. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. **Food Chemistry**, v. 152, p. 88–93, 2014.

LI, Jing; LIU, Xingang; DONG, Fengshou; XU, Jun; LI, Yuanbo; SHAN, Weili; ZHENG, Yongquan. Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on wheat. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39 p. 56–63, 2011.

LIMA, Cristina P. de; CUNICO, Miriam M.; TREVISAN, Roberta R.; PHILIPPSEN, Andressa F.; MIGUEL, Obdúlio G.; MIGUEL, Marilis D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta bot. bras.** v. 25 n. 2, 2011.

LIU, Meiling; LI, Xinrong; LIU, Yubing; CAO, Bo. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica*. **Plant. Physiology and Biochemistry**. v. 73 p. 161e167, 2013.

LU, Hai Y.; LIANG, Jing Y.; YU, Ping; QU, Wei.; ZHAO, Ling. Two new rotenoids from the root of *Derris elliptica*. **Chinese Chemical Letters**. v. 19, p. 1218–1220, 2008.

MACEDO, Jéssica M.; SOUZA, Luciana G. P.; VALENZUELA, Virginia del C. T.; OLIVEIRA, Alaíde B.; CASTILHO, Rachel O.; JÁCOME, Rose L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 34, n. 4, p. 585-590, 2013.

MARANGONI, Cristiane; MOURA, Neusa Fernandes de; GARCIA, Flávio Roberto Mello. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**. v.6, n.2, p. 95-112, 2012.

MCMURRY, John. **Química Orgânica**. 6º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

MEDEIROS, Renato B.; FOCHT, Telmo. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.13, n.1-2, p.105-114, 2007.

MORAIS, Aristenes R.; BIZERRA, Ayla M. C.; FERNANDES, Pâmela R. D.; SILVA, Renata. C. Caracterização De Espectroscopia De Infravermelho De Extratos Orgânicos De *Aspidosperma Pyrifolium* Mart. (Pereiro). In: IX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFRN - TECNÓLOGIA E INOVAÇÃO PARA O SEMIÁRIDO, 2013.

MORTON, Lincoln W.; CACCETTA, Rima Abu-Amsha; PUDDEY, Ian B.; CROFT, Kevin D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 152–159, 2000.

MULLER, N.G.; FASOLO, D.; PINTO, F.P; BERTÊ, R.; MULLER, F.C. Potencialidades fitoquímicas do melão (*Cucumis melo* L.) na região Noroeste do Rio Grande do Sul – Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, p.194-198, 2013.

NEBO, Liliane; VARELA, Rosa M.; MOLINILLO, José M.G.; SAMPAIO, Olívia M.; SEVERINO, Vanessa G.P.; CAZAL, Cristiane M.; FERNANDES, Maria Fátima das Graças; FERNANDES, João B.; MACÍAS, Francisco A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, 2014.

OLIVEIRA, Tânia T. de; SILVA, Rosimar R. da; DORNAS, Waleska C.; NAGEM, Tanus J. Flavonóides e Aterosclerose. **RBAC**, v. 42 n. 1, 2010.

OLIVEIRA, Luciana S. de; MUZITANO, Michelle F.; COUTINHO, Marcela A. S.; MELO, Giany O. de; COSTA, Sônia S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, 2011.

OLIVEIRA, Sarah C. C.; GUALTIERI, Sonia C. J.; DOMÍNGUEZ, Francisco A. M.; MOLINILLO, José M. G.; MONTOYA, Rosa V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta botânica brasílica**, v. 26 n. 3, 2012.

OOTANI, Marcio A.; AGUIAR, Raimundo W.; RAMOS, Antonio C. C.; BRITO, Deyvid R.; SILVA, Jessica B. da; CAJAZEIRA, João P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n.2, p. 162-174, 2013.

PAVARINI, Daniel P.; PAVARINI, Saulo P.; NIEHUES, Michael; LOPES, Norberto P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5– 16, 2012.

PEREIRA, Renata J.; CARDOSO, Maria das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**,. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

RIBEIRO, Jose P. N.; LIMA, Maria I. S. Potencial alelopático de *Crinum americanum* L. sob diferentes condições de extração. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, 2011.

RIOS, Sara de A.; PAES, Maria C. D.; KARAM, Décio; BORÉM, Aluizio; CARDOSO, Wilton S. Carotenoides em grãos de milho verde após a aplicação de herbicidas pós-emergentes. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.1, 2010.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo Fitoquímico de Senna Alata por duas Metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, 2009.

RODRIGUES, Klinger Antonio da Franca; DIAS, Clarice Noletto; FLORÊNCIO, Janiel Catunda; VILANOVA, Crisálida Machado; GONÇALVES, José de Ribamar Santos; MORAES, Denise Fernandes Coutinho. Prospecção Fitoquímica e Atividade Moluscicida De Folhas de *Momordica Charantia* L. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 2, 2010.

ROSÁRIO, Claudio R.; KIPPER, Liane M.; FERRÃO, Marco F. Modelo para Aplicação de Análise Multivariada Através de Técnicas Estatísticas PCA e HCA Sobre Questionário de Avaliação da Satisfação de Clientes: Estudo de Caso em Uma Empresa Metalúrgica de Embalagens Metálicas. **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 1, p. 30-39, 2012.

RUSCONI, Bruno. **Almanaque BSE 2007**. Um Problema a Conocer: Capim Annoni em Uruguay.

SCRIVANTI, Lidia R.; ANTON, Ana M.; ZYGADLO, Julio A. Essential oil composition of *Bothriochloa* Kuntze (Poaceae) from South America and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 206–213, 2009.

SEBASTIÃO, N 'Soki N., CORDEIRO, Inês J. S., SANTOS, Aldenir F., GASPAR, Jorge F., MARTINS, Célia, RUEFF, José, DIAKANAMWA, Carlos, SANT'ANA, Antônio E. G., MENDONÇA, Dina I. M. D. 8,15-Epoxyabdane and norabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*. **Phytochemistry** v. 71, 2010.

SEKOWSKI, Szymon; IONOV, Maksim; KASZUBA, Mateusz; MAVLYANOV, Saidmukhtar; BRYCZEWSKA, Maria; ZAMARAEVA, Maria. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2014.

SILVA, Antonio A. da; SILVA, José F. da. **Tópicos em Manejo de Plantas Daninhas**. Viçosa – MG: Editora UFV, 2007.

SILVA, Ana Maria A. da; COELHO, Ivan D.; MEDEIROS, Paulo R. de. Levantamento florístico das plantas daninhas em um parque público de Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 21 n. 4, 2008.

SILVA, Maria A. L. da; MARQUES, Graziella S. SANTOS, Thiago M. F. dos; XAVIER, Haroudo S.; HIGINO, Jane S.; MELO Arquimedes F. M. de. Avaliação da Composição Química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. v. 32, n. 1, p. 67-72, 2010.

SILVA, Mayara Gobetti Fernandes da. **Avaliação Do Potencial Alelopático De Raízes De Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) E Estudo Fitoquímico**. 2014. 99 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pata Branco, 2014.

SILVERSTEIN. Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6º ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMÕES, Claudia M. O.; SCHENKEL, Eloir P., MELLO, João C. P. de, MENTZ, Lilian A., PETROVICK, Pedro R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º Ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SOEIRO, Bruno T.; BOEN, Thaís R.; PEREIRA-FILHO, Edenir R.; LIMA-PALLONE, Juliana A. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30 n. 3, p. 618-624, 2010.

SOUZA, L. S.; Velini, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, 2003.

STURM, Sonja; SEGERA, Christoph. Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: Curious option or powerful and complementary routine tool?. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 50– 61, 2012.

SUHARTONO, Eko; VIANIB, Ella; RAHMADHANB, Mustaqim A.; GULTOMB, Imam S.; RAKHMANB, Muhammad F.; INDRAWARDHANAC, Danny. Total flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 235 – 239, 2012.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Plant Physiology**, 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006.

TARHOVSKY, Yury S.; KIM, Yuri A.; YAGOLNIK, Elena A.; MUZAFAROV, Eugeny N. Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 1235–1246, 2014.

TUR, Celia M.; BORELLA, Junior; PASTORINI, Lindamir H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 2, 2010.

VAISHNAV, Preeti; DEMAIN, Arnold L.. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223 – 229, 2010.

VERONEZI, Carolina M.; JORGE, Neuza. Carotenoides Em Abóboras. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 29, n. 1, 2011.

VESSECCHI, Ricardo; GALEMBECK, Sérgio E.; LOPES, Norberto P.; NASCIMENTO, Paulo G. B. D.; CROTTI, Antônio E. M. Aplicação da Química

Quântica Computacional no Estudo de Processos Químicos Envolvidos em Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

VIDAL, Ribas. **Interação Negativa entre Plantas: Inicialismo, Alelopatia e Competição**. Porto Alegre: Evangraf, 2010.

VOGEL, Arthur I. **Análise Química Quantitativa**. 6^o ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

WELKER, C.A.D, LONGHI-WAGNER, H.M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.4, 2007.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

WONDRACEK, Daniele C.; VIEIRA, Roberto F.; SILVA, Dijalma B. da; COSTA, Tânia da S. A.; SANO, Sueli M.; FALEIRO, Fábio G. Influência Da Saponificação Na Determinação De Carotenoides Em Maracujás Do Cerrado. **Química Nova**, v. 35, n. 1, 2012.

YANG, Chang-Qing; WU, Xiu-Ming; RUAN, Ju-Xin; HU, Wen-Li; MAO, Yin-Bo; CHEN, Xiao-Ya; WANG, Ling-Jian. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Phytochemistry**. v. 96, p. 46–56, 2013.

ZENNI, Rafael D.; ZILLER, Sílvia R. An overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasil. Bot.** v.34, n.3, p.431-446, 2011.