

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE FERNANDA DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO DA PARTE AÉREA DE *Eragrostis plana* Nees E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA



CURITIBA

2021

ELAINE FERNANDA DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO DA PARTE AÉREA DE *Eragrostis plana* Nees E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beatriz Helena L. de N. Sales Maia

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237e Santos, Elaine Fernanda dos  
Estudo químico da parte aérea de *Eragrostis plana* Nees e avaliação da atividade antimicrobiana [recurso eletrônico] / Elaine Fernanda dos Santos. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

Orientadora: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia.

1. Terpenos. 2. Diterpenos. 3. Gramínea. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha. III. Título.

CDD: 547.71

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

## TERMO DE APROVAÇÃO

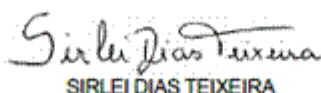
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de ELAINE FERNANDA DOS SANTOS intitulada: ESTUDO QUÍMICO DA PARTE AÉREA DE *Eragrostis plana* Nees E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

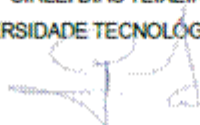
CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2021.



BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA  
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SIRLEI DIAS TEIXEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)



FRANCISCO DE ASSIS MARQUES  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha Mãe que sempre me apoiou.

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha mãe, Olga Kubiaki Santos, e ao meu irmão e cunhada, José Felipe dos Santos e Joviane Ap. de Castro, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e por sempre estarem presentes.

Ao meu padrinho Osvaldo Galle (in memoriam) por todo o apoio e incentivo.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pelo apoio, paciência, amizade e pelos ensinamentos transmitidos.

À Dr<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas, e Agrícolas (UNICAMP) pela realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Frederico Luís Felipe Soares pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores Dr. Francisco de Assis Marques e Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello pelas contribuições no relatório de qualificação.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar esse trabalho, professores Dr. Francisco de Assis Marques, Dr<sup>a</sup>. Sirlei Dias Teixeira, Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello e Dr<sup>a</sup> Ieda Maria Begnini.

Aos meus amigos do LAPNEQ pela amizade, paciência e compartilhamento de conhecimentos, em especial a Ana Paula Palaro Klein Hendges, Aurea P. Ferriani, Carmem Jost, Carlos Eduardo M. Piomontez, Gabriela Silveira, Gabriel Marcus Souza Diniz de Medeiros Pereira, João Mario Morais Minetto, Inaiara Casapula, Rafael Sari e Rebeca Gabriel de Camargo.

A todos os meus amigos de vida e aos amigos e colegas que conquistei durante esse trabalho, em especial a Anne Raquel Sotilles e Viviane Rodrigues Chagas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR pela infraestrutura e oportunidade.

E a todos, que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

## RESUMO

O capimannoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) é uma espécie vegetal da família Poaceae classificada como planta daninha e, portanto, apresenta atividade alelopática, como observado em estudos anteriores. Neste estudo foram obtidos extratos da parte aérea com solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (EP), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), e o extrato em éter de petróleo na estação verão foi fracionado resultando na identificação de quatro diterpenos da classe dos ciclofitanos (**1 - 4**), cuja ocorrência no gênero *Eragrostis* não foi ainda descrita. As estruturas dos compostos foram propostas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , experimentos de HSQC, HMBC e COSY. Comparação dos extratos utilizando três métodos de análise: ressonância magnética nuclear, infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência, mostraram diferenças em relação ao solvente extrator e sazonalidade observada nas análises quimiométricas (PCA). Todos os extratos brutos da parte aérea foram submetidos à atividade antimicrobiana. O extrato em EP - verão e em MeOH - inverno apresentaram atividade significativa contra os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstrando a atividade bactericida de *E. plana*.

Palavras-chave: *Eragrostis plana*, Terpenos, Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The Annoni-2 grass (*Eragrostis plana* Nees) belongs to Poaceae family, which is known to be a weed, then it shows allelopathic activity as observed in other studies. In this study, extracts of the aerial part were obtained using solvents of different polarities: petroleum ether (EP), ethyl acetate (AcOEt) and methanol (MeOH). Purification of petroleum ether extract of summer furnished four diterpenes of the cyclophytananes class, which its occurrence in the genus *Eragrostis* has never been described. The isolated compounds were tentatively identified by spectroscopic methods: NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , experiments of HSQC, HMBC and COSY. The extracts were compared using three methods of analysis: Nuclear magnetic resonance, Infra-red and high performance liquid chromatography and differences between seasonality and solvents of extraction were observed by chemometric methods (PCA). The antimicrobial activity of the crude extracts of the aerial part was evaluated. The extracts EP - summer and MeOH - winter exhibited significant activity against the microorganisms *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* thus highlighting the bactericidal activity of the extracts.

Keywords: *Eragrostis plana*, Terpenes, Antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRINCIPAIS GRUPOS ORGÂNICOS COM POTENCIAL ALELOPÁTICO...	21
FIGURA 2 - VIA METABÓLICA SECUNDÁRIA PARA TERPENOIDES E ARILPROPANOIDES.....	22
FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DE TERPENOIDES.....	23
FIGURA 4 - TOUCEIRA DE <i>E. plana</i> Nees COLETADO NA FAZENDA PACHECO NO MUNICÍPIO DE ABELARDO LUZ-SC.....	24
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE TRIACILGLICEROL (5A) E ROTENOIDE (5B).....	26
FIGURA 6 – ESTRUTURAS DE NEOCASSA-1,12(13),15-TRIEÑO-3,14-DIONA (A); 19-NORNEOCASSA-1,12(13),15-TRIEÑO-3,14-DIONA (B) E 14-HIDROXINEOCASSA-1,12(17),15-TRIEÑO-3-ONA (C).....	27
FIGURA 7 – ESTRURAS DE NEOCASSA-12(13),15-DIEN14-ONA (7A), NEOCASSA-12(17),15-DIEN-3-ONA (7B), 14-HIDROXINEOCASSA-12(17),15-DIONA (7C), 3-HIDROXINEOCASSA-12(17),15-DIONA (7D) E NEOCASSA-12(13),DIENO-3,14-DIONA (7E).....	27
FIGURA 8 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DO EXTRATO EM ÉTER DE PETRÓLEO (A); COLUNA A VÁCUO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA (B).....	32
FIGURA 9 - FRAÇÃO F24, ORIUNDA DO EXTRATO EM ÉTER DE PETRÓLEO, AMOSTRA SOLUBILIZADA EM REPOUSO (a); F24 APÓS A CENTRIFUGAÇÃO (b); F24 APÓS CENTRIFUGAÇÃO A - 4 °C (c).....	36
FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup> H DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>E. plana</i> COLETADAS NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO. UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER DE PETRÓLEO (EP), ACETATO DE ETILA (AE) E METANOL (M) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	41
FIGURA 11 - ESTRUTURAS DE PIMARANO (11A); 8 $\alpha$ ,15-EPÓXI-16-NORLABDAN-13-ONA (11B) E NEOCASSA-1,12(13)15-TRIEÑO-3,14-DIONA (11C).....	41
FIGURA 12 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DOS EXTRATOS EM ACETATO DE ETILA DAS ESTAÇÕES INVERNO (I), OUTONO (O), PRIMAVERA (P) E VERÃO (V)...	43
FIGURA 13 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DOS EXTRATOS EM ÉTER DE PETRÓLEO NAS ESTAÇÕES INVERNO (I), OUTONO (O), PRIMAVERA (P) E VERÃO (V).....	43
FIGURA 14 - SCORES OBTIDO POR PCA DOS DADOS DE IV DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA COLETADAS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETRÓLEO.....	45
FIGURA 15 - GRÁFICO DE LOADINGS – PC1 E PC2.....	46

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETROLEO.....	47
FIGURA 17 - SCORES OBTIDO POR PCA DOS DADOS DE CLAE DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA COLETADAS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETROLEO.....	48
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL.....	49
FIGURA 19 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> – PC1 E PC2.....	50
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DA F45-6 (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	52
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup> H DA FRAÇÃO F24 APÓS A ÚLTIMA CENTRIFUGAÇÃO A - 4°C (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	53
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1.....	54
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1.....	55
FIGURA 24 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), PARA A SUBSTÂNCIA 1.....	57
FIGURA 25 - ESTRUTURA DE 10,15-CICLOFITANO.....	57
FIGURA 26 – ESTRURAS DE CASSIPOUROL (1), ACETATO DE CASSIPOURIL (2) E HEXADECANOATO DE CASSIPOURIL (3).....	58
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2.....	59
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2.....	60
FIGURA 29 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), PARA A SUBSTÂNCIA 2.....	61
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3.....	62
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3.....	63
FIGURA 32 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), E COSY (TRACEJADO) PARA A SUBSTÂNCIA 3.....	64
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.....	65
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.....	65
FIGURA 35 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), E COSY (TRACEJADO) PARA A SUBSTÂNCIA 4.....	66

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DA COLUNA DE ÉTER DE PETRÓLEO DA PARTE AÉREA COLETADA NO VERÃO .....	37
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA DE <i>E. plana</i> .....	39
TABELA 2 - FRAÇÕES AGRUPADAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA FLASH DO EXTRATO DA PARTE AÉREA EM ÉTER DE PETRÓLEO.....	51
TABELA 3 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz), DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C E CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTANCIA 1 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.....	56
TABELA 4 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz), DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C E CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTANCIA 2 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.....	60
TABELA 5 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz), DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C E CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 3 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.....	63
TABELA 6 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz), DE <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C E CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTANCIA 4 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.....	66
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) PARA OS EXTRATOS DE <i>E. PLANA</i> .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.

$\delta$	–	Deslocamento químico
%	–	Porcentagem
°C	–	Grau Celsius
$\mu\text{L}$	–	Microlitro
$\mu\text{m}$	–	Micrômetro
$^1J_{\text{H-C}}$	–	Correlação direta H-C
AcOEt	–	Acetato de Etila
ATCC	–	<i>American Type Collection Culture</i>
CBM	–	Concentração Bactericida Mínima
CC	–	Coluna Cromatográfica
CCDA	–	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	–	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
$\text{CDCl}_3$	–	Clorofórmio Deuterado
CFM	–	Concentração Fungicida Mínima
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	–	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CPQBA	–	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.
cm	–	Centímetros
COSY	–	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
br s	–	Simpleto largo
d	–	Dupleto
DCM	–	Diclorometano
EP	–	Éter de Petróleo
g	–	Gramas
h	–	Hora
hex	–	Hexano
HMBC	–	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	–	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IV-TF	–	Infravermelho com Transformada de Fourier
L	–	Litro
m	–	Multiplete
MeOH	–	Metanol

MHz	–	Megahertz
mg	–	Miligrama
min	–	Minuto
mL	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
nm	–	Nanômetro
m/v	–	Massa por Volume
NOESY	–	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PCA	–	Análise de Componentes Principais
PC1	–	Primeiro Componente Principal
PC2	–	Segundo Componente Principal
PC	–	Componente Principal
ppm	–	Parte por milhão
TCC	–	<i>Tropical Culture Collection</i>
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	–	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
rpm	–	Rotação por Minuto
RPMI	–	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	–	Sinpleto
TMS	–	Tetrametilsilano
t <sub>R</sub>		Tempo de Retenção
UNICAMP	–	Universidade Estadual de Campinas
UTFPR	–	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UV	–	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Plantas Daninhas e suas Interações Alelopáticas .....	19
1.2 Biossíntese de Terpenos .....	22
1.3 <i>Eragrostis plana</i> Nees e seu Potencial Alelopático.....	23
1.4 Potencial Biológico.....	28
1.5 Quimiometria .....	28
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos .....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1 Coleta e Identificação Botânica de <i>Eragrostis plana</i> Nees.....	31
3.2 Obtenção dos Extratos da Parte Aérea.....	31
3.3 Cromatografia .....	32
3.4 Equipamentos.....	33
3.5 Comparação dos Extratos Brutos da Parte Aérea por RMN, IV e CLAE.....	33
3.5.1 Tratamento Estatístico .....	34
3.6 Fracionamento dos Extratos Brutos .....	35
3.6.1 Fracionamento do Extrato em Éter de Petróleo da Parte Aérea – Estação Verão... 35	
3.7 Remoção dos Ácidos Graxos das Frações em Éter de Petróleo.....	35
3.8 Purificação das Frações F11, F19 e F24 oriundas do Extrato em Éter de Petróleo – Verão.....	37
3.9 Elucidação Estrutural .....	38
3.10 Atividade Antimicrobiana.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1 Comparação dos Extratos Brutos da Parte Aérea de <i>E. plana</i> .....	40
4.1.1 Comparação dos Extratos Brutos de <i>E. plana</i> por RMN <sup>1</sup> H.....	40
4.1.2 Comparação dos Extratos Brutos de <i>E. plana</i> por IV .....	42
4.1.3 Análise de Componentes Principais dos Dados Obtidos por IV .....	44
4.1.4 Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência .....	46
4.1.5 Análises de Componentes Principais dos Dados Obtidos por CLAE.....	47
4.2 Fracionamento do Extrato da Parte Aérea em Éter de Petróleo – Verão .....	50
4.3 Remoção dos Ácidos Graxos das Frações F11, F19 e F24 .....	52
4.4 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato da Parte Aérea em Éter de Petróleo Verão.....	53
4.4.1 Determinação Estrutural das Substâncias <b>1-4</b> Isoladas do Extrato da Parte Aérea	

em Éter de Petróleo Verão.....	53
4.5 Atividade Antimicrobiana.....	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE.....	78

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas fazem parte do ecossistema e muitas dessas espécies foram introduzidas de forma intencional, proposital para alguma atividade, ou acidental, oportunista e inesperada. O grau de interferência dessas espécies leva em consideração o prejuízo causado no desenvolvimento das plantas cultivadas ao disputar os recursos do meio vital, e a inibição química com liberação de substâncias alelopáticas (BRIGHENTI, 2010; LORENZI, 2014; SCHNEIDER, 2007).

Existem vários conceitos para definir alelopatia, e segundo Macias (2008) a Sociedade Internacional de Alelopatia (SIA) define como um processo que envolve metabólitos secundários, os quais são produzidos pelas plantas, fungos, bactérias e atuam no crescimento e desenvolvimento do meio ambiente, normalmente de forma natural.

Há muito tempo se estuda o metabolismo secundário das plantas, e suas aplicações com uso seguro nas mais diversas áreas, destacando na área medicinal, por possuírem efeitos biológicos sobre a saúde humana. Os metabólitos secundários compreendem os alcaloides, compostos fenólicos, terpenos, flavonoides e nitrogenados (MANTOVANI; PORCU, 2009; PAVARINI et al., 2012; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Dessa forma, o estudo químico é de grande importância, uma vez que contribui significativamente para o conhecimento da flora e sua atividade química, a caracterização estrutural, investigações biossintéticas de substâncias naturais (FILHO, 2010).

Uma espécie que se favorece do seu potencial alelopático é o capim-annoni-2 (*Eragrotis plana* Nees). Sua população vem aumentando, se dispersando em grandes distâncias, competindo com populações nativas e impactando o ambiente. Os compostos químicos já detectados em extratos dessa planta atuam negativamente sobre a germinação e o desenvolvimento de algumas espécies (GOULART et al., 2009).

Ao realizar pesquisas/buscas na literatura científica, pode-se constatar a reduzida quantidade de estudos químicos envolvendo a parte aérea de *E. plana* Nees, devido a isso, este trabalho visa realizar o isolamento e identificação dos constituintes da espécie, por apresentarem uma promissora ação herbicida, além da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos.

## 1.1 Plantas Daninhas e suas Interações Alelopáticas

Historicamente, a ciência das “plantas invasoras” ou “plantas daninhas”, se confunde com a do homem e da agricultura. Houve no decorrer do tempo uma domesticação lenta de certas espécies úteis utilizadas na alimentação em geral, quando se passou a criar animais e cultivar plantas próximas ao local de habitação. Algumas espécies foram totalmente eliminadas, outras que não apresentavam prejuízos à sobrevivência do homem permaneceram, no entanto, as espécies úteis reduziram sua agressividade para a sobrevivência e a natureza também agiu a seu modo, fazendo com que as plantas silvestres se tornassem mais fortes para sua sobrevivência (CONSTANTIN et al., 2001).

As “plantas daninhas” são caracterizadas como plantas ruderais, silvestres, mato ou inço que nascem e crescem onde não são desejadas, porém estes conceitos são referentes a um posicionamento humano. Mais de 20% dessas espécies são arbustivas ou até arbóreas e trepadeiras (LORENZI, 1991; FONTES et al., 2013). São plantas que ocupam áreas agrícolas, pecuárias por qualquer motivo, onde a cobertura natural foi extinta, e o solo está parcialmente exposto (PITELLI, 1987).

Essas espécies de plantas podem ser vistas como daninhas, devido à interferência negativa no propósito dos homens, apresentando toxicidade ou interferindo no desenvolvimento de culturas comerciais, por outro lado podem ser úteis controlando a erosão e fazendo a reciclagem de nutrientes e ainda serem usadas medicinalmente, dentre outros usos (SILVA; SILVA, 2007).

Para o controle dessas plantas, o homem vem utilizando herbicidas em larga escala e por longo prazo, tornando-se uma prática comum, mas com grandes efeitos negativos no ecossistema ambiental e agrícola. Os herbicidas são capazes de selecionar populações de plantas, provocando a morte de certas espécies e de outras não, no entanto, apresentando alta toxicidade tanto para os humanos, quanto para plantas e animais (CONSTANTIN, et al., 2011; XU et al., 2010). Contudo, existem outras formas de controle as quais são pouco utilizadas, definidas como preventivas são denominadas culturais, mecânicas, físicas e também o controle biológico com a utilização da alelopatia, sendo uma alternativa ou um complemento, que vem assumindo destacada importância (RODRIGUES, 2016; CARVALHO, 2013).

A preservação do meio ambiente busca eliminação da contaminação por produtos químicos, e as substâncias alelopáticas se tornam útil, ecologicamente por se tratar de um herbicida natural. O uso em conjunto com outras técnicas pode ser viável e não causa a contaminação de solo e água, agindo diretamente na planta invasora

(OLIVEIRA et al., 2015; LÔBO et al., 2008).

O termo alelopatia é a junção de duas palavras gregas, *alléton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) (FERNANDES; MIRANDA; SANQUETTA, 2007). Segundo Rice (1984) é uma interação que interfere direta ou indiretamente, atuando de forma a beneficiá-la ou prejudicá-la, ou seja, o que as plantas exercem sobre outras na sua vizinhança por meio da produção de substâncias químicas liberadas no ambiente.

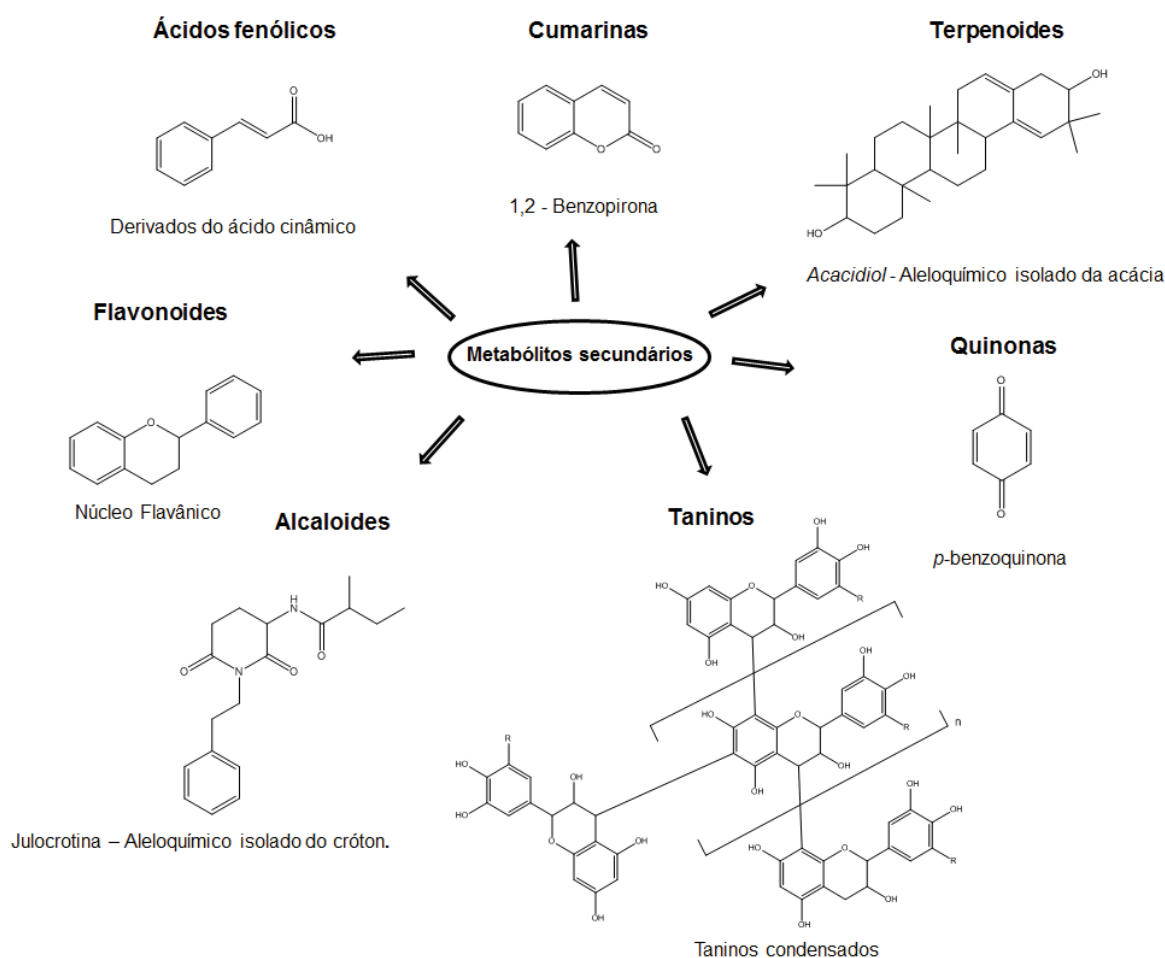
Essas substâncias químicas (aleloquímicas) são liberadas naturalmente pelas plantas, através das raízes, tronco e folhas como na decomposição de material vegetal, interferindo em alguma etapa da vida de outra espécie, podendo influenciar em graus diferentes na composição dos ecossistemas naturais (ALVES, 2004; BORELLA, 2009; FELIX, 2010).

Essas substâncias químicas estão presentes em todos os tecidos das plantas, variando em quantidade no local de ocorrência ou estágio de desenvolvimento. São compostos produzidos pelo metabolismo secundário, e aparentemente não apresentam função no metabolismo primário das plantas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os metabólitos primários asseguram a realização das funções vitais para a sobrevivência da espécie e, são os precursores dos metabólitos secundários, que por sua vez são produzidos pelas plantas, cuja quantidade e classe variam de espécie para espécie. Algumas plantas apresentam maior tolerância ou resistência a essas substâncias, cada espécie produz um conjunto diferente de aleloquímicos adequado às demandas particulares do seu nicho ecológico (BITTENCOURT, 2017; BREITMAIER, 2006; FERREIRA; AQUILA, 2000; INOUE, 2010).

Segundo Piña-Rodrigues et al. (2001) os metabólitos secundários que mais se destacam pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenoides, flavonoides, alcaloides, taninos e quinonas complexas (Figura 1).

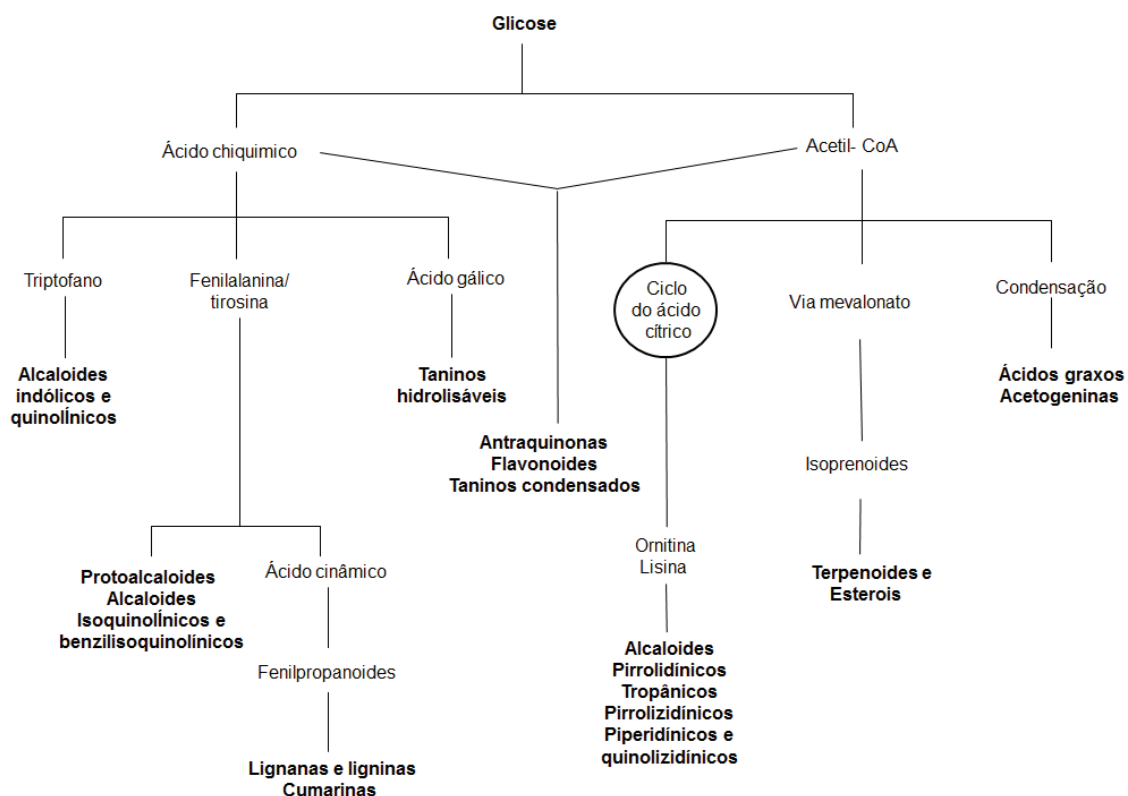
FIGURA 1 - PRINCIPAIS GRUPOS ORGÂNICOS COM POTENCIAL ALELOPÁTICO



FONTE: Adaptada de Silva, 2014.

O precursor dos metabólitos secundários é a glicose, tendo como intermediários principais o ácido chiquímico e a acetil-CoA (Figura 2). São compostos complexos, geralmente apresentam baixa massa molecular, podem apresentar atividades biológicas, e baixas concentrações em determinadas plantas (SIMÕES et al., 2007).

FIGURA 2 - VIA METABÓLICA SECUNDÁRIA PARA TERPENÓIDES E ARILPROPANOÍDES.



FONTE: Adaptado de Ootani et al., 2013.

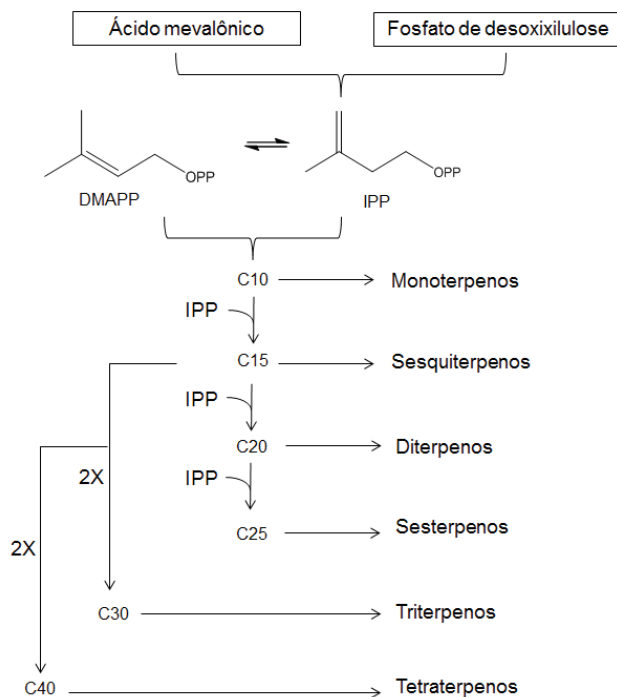
Algumas classes de metabólitos secundários são encontradas em maiores concentrações em comparação com as demais, como caso dos terpenóides, alcalóides e ácidos fenólicos. Consequentemente, se torna mais fácil o isolamento e a identificação em laboratórios, considerando juntamente as técnicas mais modernas para a extração, isolamento e purificação (TREZZI, 2002).

## 1.2 Biossíntese de Terpenos

Terpenos são compostos formados por átomos de carbono e hidrogênio, podendo possuir ligações duplas carbono-carbono, átomos de oxigênio em grupos como hidroxila (OH), carbonila (C=O) dentre outros e assim são denominados de terpenóides (BREITMAIER, 2006; MCMURRY, 2010). As ligações entre as unidades de cinco átomos de carbono são “cabeça-cauda” seguindo a regra do isopreno, no entanto existem os “terpenos irregulares” com ligações “cauda-cauda” (BICAS; FELIPE, 2017).

Dessa forma, os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de unidades de cinco átomos de carbono, hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Figura 3), e serem subclassificados como acíclicos (moléculas abertas), monocíclicos ou bicíclicos (SIMÕES et al., 2017; DEWICK, 2009).

FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DE TERPENÓIDES



FONTE: Adaptado de Dewick, 2009.

Devido ao aumento dos estudos e compreensão em relação aos terpenos, estes passaram a ter um interesse comercial maior tendo em vista o amplo papel para uso em terapia humana, apresentando atividade anticâncer, antimicrobiana, antiinflamatórias, antialérgicas, podendo ser utilizados tanto na prevenção como em tratamento de várias doenças, além de incorporar também a atuação como inseticida natural (CARVALHO; FONSECA, 2006; PADUCH et al., 2007; AJIKUMAR et al., 2008).

### 1.3 *Eragrostis plana* Nees e seu Potencial Alelopático.

O capimannoni-2, *Eragrostis plana* Nees (Figura 4), é da família *Poaceae*

tropical, tem origem africana, introduzida acidentalmente na década de 1950 no estado do Rio Grande do Sul. Com a importação de sementes da África do Sul, acredita-se que houve contaminação de sementes de outras plantas forrageiras. Devido à tolerância às mudanças climáticas e a resistência ao pisoteio, essa planta forrageira foi utilizada como alternativa para aumentar a produção animal, e passou a ser comercializada e considerada uma revolução na agropecuária (MEDEIROS; FOCHT, 2007; COELHO, 1986).

A família *Poaceae* tem grande importância como fonte de alimento e estão distribuídas em todo ecossistema do planeta, representadas por gêneros nativos ou introduzidos com algum objetivo (FILGUEIRAS et al., 2010; KAWAKITA et al., 2016).

FIGURA 4 - TOUCEIRA DE *E. plana* Nees COLETADO NA FAZENDA PACHECO NO MUNICÍPIO DE ABELARDO LUZ-SC



A espécie forma touceiras profundamente enraizadas, quando florescidas podem atingir 110 cm de altura, apresenta a base de bainha fortemente comprimida, lisa e brilhante e, o seu crescimento ocorre de forma expansiva para as laterais de suas touceiras (FOCHT, 2008).

Segundo Reis (1993), a origem do nome é associada ao Sr. José Annoni que em uma fazenda de sua propriedade, no município de Sarandi notou a existência da espécie *Setaria* cf. *onuros* Willd. ex Trind. (= *Setaria* cf. *vaginata* Spreng), denominada de capim annoni-1 e o *Eragrostis plana* Nees de capim annoni-2.

*Eragrostis* é um gênero com cerca de 350 espécies, encontradas em regiões com temperaturas desde elevadas a amenas, nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios, no entanto, são mais encontradas em lugares abertos e solos secos (BOECHAT; LONGHI-WAGNER, 2000).

A produção de sementes dessa espécie é alta e de fácil dispersão, apenas um indivíduo é capaz de gerar mais de 300 mil sementes. Sua rusticidade e a capacidade competitiva podem explicar a adaptação às condições ambientais. Isso vem sendo observado na região Sul do Brasil, onde a infestação é de quase 20%, o que representa uma área de 3,1 milhões de hectares (GOULART et al., 2009). O gênero *Eragrostis* é conhecido pelo seu valor nutritivo, contém proteína, gordura bruta, açúcares, cinzas e minerais, mas a espécie *E. plana* Nees não apresenta benefícios nutricionais, são fibrosas (33,7%) e, portanto os animais se recusam a ingeri-las (SEBASTIÃO et al., 2012).

Para se evitar a propagação das espécies o Ministério da Agricultura em 1979 proibiu a comercialização de sementes (BITTENCOURT et al., 2018), devido a expansão da *E. plana* Nees ser preocupante, e depois de estabelecida é de difícil controle, sendo mais comum o controle químico, herbicidas, além de queimas, gerando poluição ambiental (PICCININI et al., 2012). Considerada hoje uma planta invasora, seus efeitos de alelopátia afetam a germinação e o desenvolvimento de vegetais, provavelmente isso colabora para a sua expansão nos campos, passando a dominar o lugar ao qual está inserida (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008).

Há muitos trabalhos relacionados com *E. plana* Nees, mas poucas são as investigações da atividade do potencial alelopático. No entanto têm-se alguns estudos relacionados, como o de Coelho (1986) que observou que nos extratos das raízes e parte aérea havia substâncias fitotóxicas, reduzindo a germinação de sementes de trevo-branco (*Trifolium repens*) prejudicando o crescimento das partes aéreas e raízes de azevém (*Lolium multiflorum*), e não afetou o cornichão (*Lotus corniculatus*).

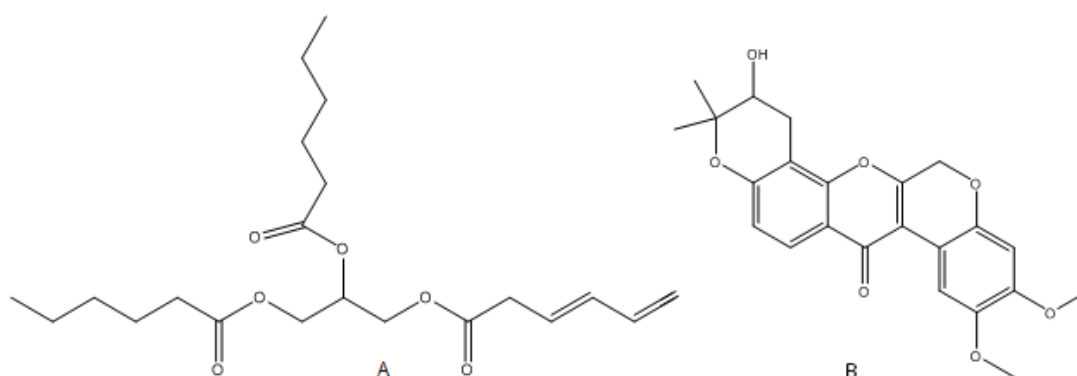
Em trabalho desenvolvido por Ferreira et al. (2008), que utilizou os extratos da parte aérea e raízes de *E. plana* com sementes de grama-de-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé) e capim kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach), obteve-se resultados que inibiram a germinação. Favaretto et al. (2011) observou efeitos usando os extratos da parte aérea e raízes nas radículas do trevo branco (*Trifolium repens*) como necrose e ausência de raízes secundárias. Extratos da parte aérea e das raízes, também foram usados nas espécies invasoras corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) e leiteira (*Euphorbia heterophylla*) demonstrando inibição de germinação e do crescimento da radícula e hipocótilo (DALBOSCO, 2013; SILVA, 2014).

Fiorenza et al. (2016) verificou que extratos aquosos da parte aérea secas causavam a redução e/ou a inibição da germinação de sementes, o índice de velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de todas as espécies testadas, milho (*Zea mays*), aveia-branca (*Avena sativa*), azevém-anual

(*Lolium multiflorum*), trevo-vermelho (*Trifolium pratense*), cornichão (*Lotus corniculatus*) atribuindo os efeitos à presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides.

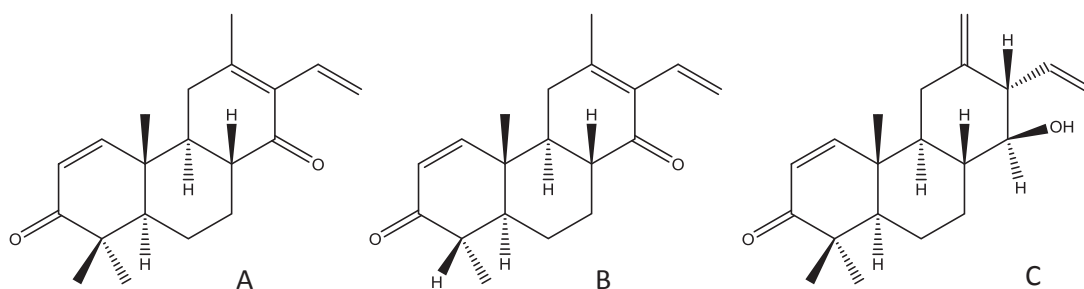
A presença de aleloquímicos como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico e vanílico) e cumarinas se mostraram presentes nos extratos da parte aérea e raízes de *E. plana*, obtendo maiores quantidades de compostos na parte aérea desta espécie e podendo ser potencialmente usados como bio-herbicidas (FAVARETTO et al., 2015). Klein (2015) identificou um triacilglicerol (Figura 5A) e um rotenoide (Figura 5B), da parte aérea dessa espécie, o qual tem grande importância por estar presente em outras misturas com ação herbicida, justificando o potencial alelopático do *E. plana* Nees.

FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE TRIACILGLICEROL (5A) E ROTENOIDE (5B).



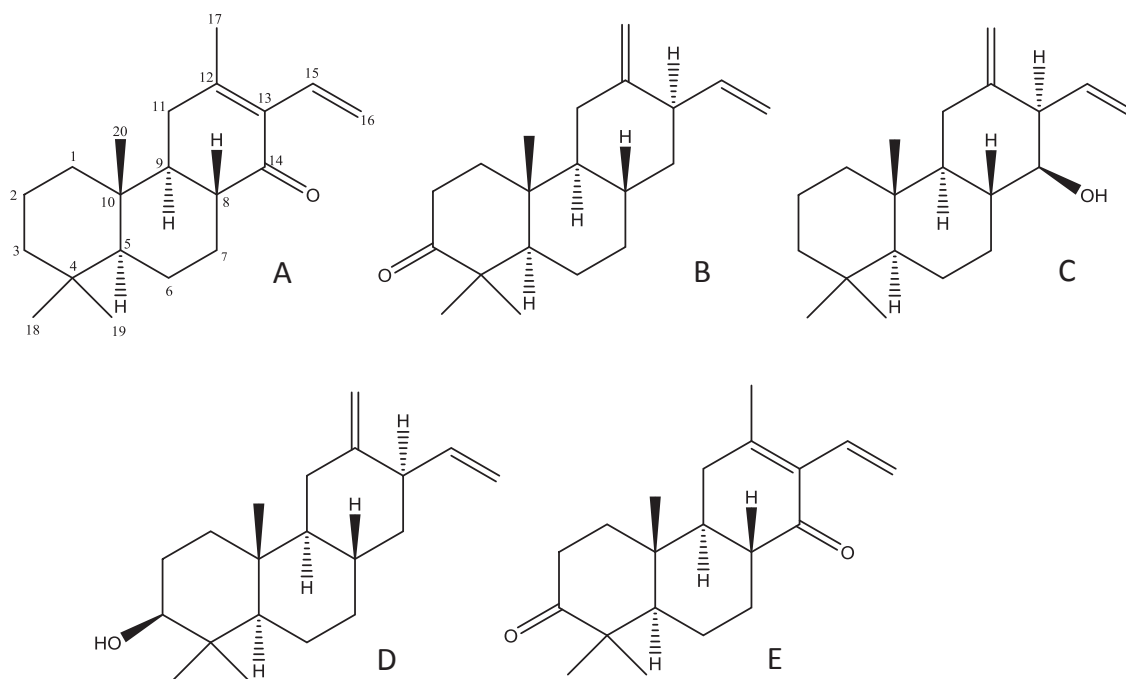
Favaretto et al. (2019) relata três novas estruturas da classe diterpenos neocassano, identificados como neocassa-1,12(13),15-trieno-3,14-diona (Figura 6A); 19-norneocassa-1,12(13),15-trieno-3,14-diona (Figura 6B) e 14-hidroxineocassa-1,12(17),15-trieno-3-ona (Figura 6C) isolados a partir das raízes. As substâncias 6A, 6B e 6C inibiram o crescimento de lentilha em 50%, e a 6B foi fungicida para *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

FIGURA 6 – ESTRUTURAS DE NEOCASSA-1,12(13),15-TRIENO-3,14-DIONA (A); 19-NORNEOCASSA-1,12(13),15-TRIENO-3,14-DIONA (B) E 14-HIDROXINEOCASSA-1,12(17),15-TRIENO-3-ONA (C).



Recentemente Hendges et al. (2020) identificou cinco novos diterpenos semelhantes aos neocassanos isolados das raízes de *E. plana*. Os compostos 7C, 7D e 7E foram testadas para atividade fitotóxica em que foi possível observar inibição no crescimento de *I. grandifolia* e *E. heterophylla*. Essas substâncias podem contribuir para novos estudos de bio-herbicidas.

FIGURA 7 – ESTRUTURAS DE NEOCASSA-12(13),15-DIEN14-ONA (7A), NEOCASSA-12(17),15-DIEN-3-ONA (7B), 14-HIDROXINEOCASSA-12(17),15-DIONA (7C), 3-HIDROXINEOCASSA-12(17),15-DIONA (7D) E NEOCASSA-12(13),DIENO-3,14-DIONA (7E).



## 1.4 Potencial Biológico

A humanidade vem utilizando produtos naturais desde os primórdios para o controle de patologias, mas devido ao uso excessivo e sem restrições induziu o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, reduzindo sua eficácia e gerando um grande problema de saúde pública (CABRAL, 2008; ALENCAR, 2014; QIAO, et al., 2018). Geralmente, as bactérias detêm a capacidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas utilizadas como agentes terapêuticos, e isso é um fato preocupante (COHEN, 1992; NASCIMENTO et al., 2000, ZHANG, 2003).

Atualmente as plantas têm sido muito estudadas na aplicabilidade da atividade antimicrobiana frente alguns microrganismos, visando uma alternativa terapêutica mais segura e acessível à população (MESA-ARANGO et al., 2009; OLIVEIRA, et al., 2016).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos através de plantas pode ser uma boa alternativa. Essas possuem nos extratos vegetais, óleos essenciais ou compostos isolados como alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas que são substâncias com potencial bioativo (RIOS et al., 2005; BOLIGON et al., 2015; MIRANDA, et al., 2013; SAAD et al., 2016). Portanto, mais estudos devem ser realizados para busca de novos compostos bioativos.

## 1.5 Quimiometria

A quimiometria é uma área da química que emprega métodos estatísticos e matemáticos para o tratamento de dados químicos com o objetivo de extrair o máximo de informações químicas relevantes. Pode ser considerada uma das áreas mais recentes da química analítica, no entanto vem se difundindo nas mais diversas áreas da química. Desde seu surgimento muitos métodos foram desenvolvidos os quais possibilitaram a interpretação de dados que antes não poderiam ser analisados (SIMÕES, 2008).

Entre os métodos de calibração mais empregados para análise multivariada tem-se a Análise de Componentes Principais (PCA), que consiste em um procedimento que reduz o número de variáveis, havendo substituição por novas variáveis chamadas de PC, sem perder a informação dos dados originais

(GUIMARÃES, 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Realizar o estudo da composição química e atividade biológica dos extratos da parte aérea de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) coletadas no verão, inverno, outono e primavera.

### 2.2 Específicos

- Analisar os extratos brutos utilizando métodos espectroscópicos (IV-TF, CLAE e RMN ( $^1\text{H}$ ));
- Realização das análises quimiométricas (PCA) dos extratos para verificar estatisticamente as diferenças na composição química por sazonalidade e diferença de polaridade dos solventes utilizados (EP, AcOEt, MeOH);
- Fracionar os extratos ativos visando o isolamento e identificação dos principais metabólitos secundários dos extratos obtidos da parte aérea por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , bidimensionais (HSQC e HMBC);
- Realizar testes biológicos com os extratos brutos da parte aérea, verificando as Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e Concentrações bactericidas mínimas (CBM);
- Correlacionar os resultados da análise do estudo químico com os resultados obtidos em testes alelopáticos realizados em trabalhos anteriores.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e Identificação Botânica de *Eragrostis plana* Nees.

As coletas dos materiais botânicos (parte aérea e raiz) do *E. plana* foram realizadas nas datas 22/11/2016, 18/02/2017, 10/06/2017 e 15/09/2017 (primavera, verão, outono e inverno, respectivamente) na Fazenda Pacheco, localizada no município de Abelardo Luz, no estado de Santa Catarina, coordenadas -26.527820, -52.255808 e altitude média de 850 metros. Este material foi identificado pela Professora Giovana Faneco Pereira da UTFPR, e duas exsiccatas foram depositadas no herbário da UTFPR campus Pato Branco com registro HPB1102.

#### 3.2 Obtenção dos Extratos da Parte Aérea

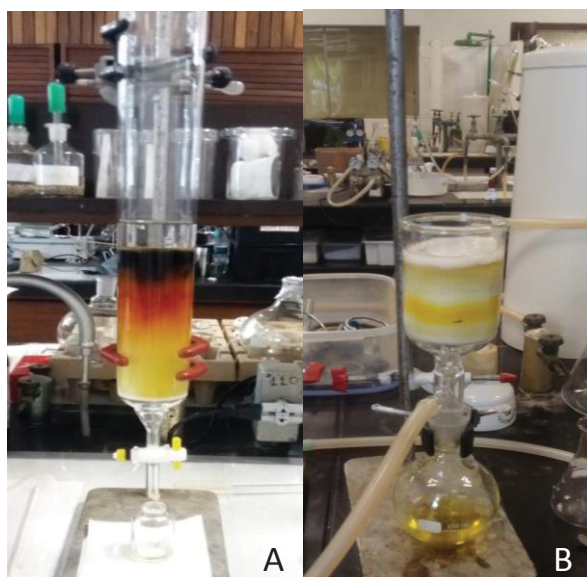
A parte aérea da espécie em estudo foi submetida a uma pré-secagem à sombra em temperatura ambiente, seguido de secagem em estufa de ar circulante a 40°C e posteriormente foram trituradas em moinho de facas. Tendo o material vegetal seco, moído e pesado, foi submetido à extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo, acetato de etila e metanol. O volume de solvente utilizado foi em torno de 2 L, permaneceu em contato com o material por 24 horas, e então renovado, uma média de três trocas sucessivas, finalizando com filtração e recolhimentos periódicos dos filtrados.

Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C. Este procedimento foi realizado com material coletados em cada estação do ano. Após a secagem completa do extrato e de sua pesagem, foram calculados os rendimentos.

### 3.3 Cromatografia

Para os fracionamentos cromatográficos foram usados a cromatografia em coluna (CC) e cromatografia líquida a vácuo (CLV). Para a CC, foi usada uma coluna de vidro, fase estacionária gel de sílica 60, tamanho de partícula 0,040-0,063 mm (230-400 mesh) da Macherey - Nagel (Figura 8A). Para a CLV, foi utilizada sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; Merck, Germany), porém neste caso por ser uma coluna a vácuo, foi utilizado um funil com placa sinterizada e saída para vácuo (Figura 8B).

FIGURA 8 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DO EXTRATO EM ÉTER DE PETRÓLEO (A); COLUNA A VÁCUO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA (B).



Quanto às cromatografias em camada delgada analítica foram realizadas fazendo uso de cromatofolhas de alumínio TLC, as quais são recobertas por gel de sílica 60 com indicador de fluorescência  $F_{254}$  e 0,2 mm de espessura, da Merck. As placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas manualmente, utilizando placas de vidro de 20 x 20 cm recobertas com uma espessura de 1,00 mm de gel de sílica 60PF<sub>254</sub> (Macherey-Nagel), em seguida foram pré-condicionadas em estufa a temperatura de 100 °C por 2 horas, aproximadamente. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e solução de anisaldeído, seguida de aquecimento. Os solventes utilizados foram previamente destilados para aumentar o grau de pureza, sendo os solventes usados diclorometano (Dipa), acetato de etila (Alphatec), éter de petróleo (Vetec), metanol (Dipa), éter etílico

(Anidrol), hexano (Anidrol) e acetona (Alphatec). O critério de pureza adotado para as substâncias purificadas foi o surgimento de apenas uma mancha quando a amostra era analisada.

### 3.4 Equipamentos

Os extratos foram comparados quimicamente utilizando um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (CLAE) WATERS o qual possui uma bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower software. A coluna analítica utilizada foi de fase reversa - Kinetex X-B C18, 250 x 4,6 mm, partícula de 4  $\mu\text{m}$ , coluna de guarda de mesmo material, mantida a 24 °C, marca Phenomenex.

As análises no Infravermelho foram conduzidas em equipamento da Bruker 70 (FTIR), intervalo na região entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras, resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Para a identificação das substâncias foram usados os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D, obtidos no RMN multiusuário do Departamento de Química e no Centro de RMN da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em espectrômetros Bruker DPX 200 e Avance 400, operando a 4,7 e 9,4 Tesla, onde foi observado o núcleo de hidrogênio a 200, 400 e 600 MHz, respectivamente e a 50, 100 e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

As centrifugações das amostras foram realizadas em duas centrífugas, inicialmente na centrífuga marca Sigma 3-16P, rotor 12111, 14500 rpm, e posteriormente na centrífuga Heraes Megafuge 11, 14600 rpm, com controle de temperatura de - 9° C a 40° C.

### 3.5 Comparação dos Extratos Brutos da Parte Aérea por RMN, IV e CLAE.

Para a análise de RMN todos os extratos brutos foram solubilizados em clorofórmio deuterado –  $\text{CDCl}_3$  (99,8%, 0,05% TMS) (Sigma - Aldrich), buscando sempre ter concentrações aproximadas em todas as análises, em torno de 9,0 mg em 0,5 mL ( $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ g mL}^{-1}$ ).

Outra comparação realizada dos extratos foi através da espectroscopia na região do infravermelho. A análise foi realizada em triplicata, utilizando 99,0 mg de brometo de potássio (KBr) para o preparo da pastilha e 1,0 mg de amostra, em seguida feito a leitura.

Os extratos em éter de petróleo, acetato de etila e metanol da parte aérea, das quatro estações do ano, foram submetidos à análise de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência para avaliação do perfil químico. Utilizou-se uma coluna C18, com injeções de 10  $\mu\text{L}$ , fluxo de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$  e como eluentes água (X) e metanol (Y). As condições de análise foram com gradiente de 20% de Y até 10 min, em seguida 50% de Y até 25 min, 90% de Y até 55 min, e por fim 95% de Y permanecendo até 60 min, no comprimento de onda de 280 nm. Foram preparadas triplicatas das amostras, na concentração de 3  $\text{mg mL}^{-1}$  em metanol grau HPLC, e transferidas para vials. Cromatogramas plotados e tratados no Origin 8.5.

### 3.5.1 Tratamento Estatístico

Em razão da grande quantidade de compostos que podem estar presentes nos extratos brutos de *E.plana*, a PCA pode ser utilizada como uma ferramenta capaz de determinar características importantes. Desta maneira, será verificada a similaridade e a diferença entre os extratos brutos das estações primavera, verão, inverno e outono em solventes de diferentes polaridades, com base no perfil da sua composição química, identificando quais metabólitos são responsáveis pela variação.

Foram analisadas as diferenças e/ou semelhanças entre os extratos brutos, comparando-os por sazonalidade e diferença de polaridade dos solventes utilizados (EP, AcOEt, MeOH) através de métodos quimiométricos PCA. Foi realizado o devido tratamento dos resultados com o pacote PLS\_toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operado no *software* Matlab<sup>®</sup> v.7.0.1 (MathWorkInc<sup>®</sup>).

Foi aplicado pré-processamento nos dados obtidos por CLAE, dados centrados na média, e para o IV foi utilizado SNV (Standard Normal Variate) e dados centrados na média. Todos os gráficos foram gerados utilizando os programas Origin 8.5 e Matlab.

### 3.6 Fracionamento dos Extratos Brutos

#### 3.6.1 Fracionamento do Extrato em Éter de Petróleo da Parte Aérea – Estação Verão

O extrato em éter de petróleo (3,9 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico, em coluna flash (diâmetro 3,5 cm) utilizando fase estacionária gel de sílica 60 (0,040-0,063 mm, 20 cm de altura), e como fase móvel utilizou-se gradiente dos solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (100%), hex:DCM (75:25), hex:DCM (65:35), hex:DCM (50:50), hex:DCM (35:65), hex:DCM (25:75), DCM (100%), DCM:AcOEt (75:25), DCM:AcOEt (50:50), DCM:AcOEt (25:75), AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (75:25), AcOEt:MeOH (50:50), AcOEt:MeOH (25: 75), MeOH (100%), resultando em 148 frações, de aproximadamente 10 mL cada.

As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus fatores de retenção ( $t_R$ ) na CCDA, depois de reveladas sob lâmpada UV (254-366 nm) e solução de anisaldeído como revelador universal, em seguida foram secas à temperatura ambiente e pesadas.

#### 3.7 Remoção dos Ácidos Graxos das Frações em Éter de Petróleo

Para a remoção/redução dos ácidos graxos foram utilizadas as frações F11, F19 e F24 oriundas do extrato em éter de petróleo, por apresentarem maior quantidade de massa.

Iniciou-se com a solubilização das amostras em acetona (1:5, m/v) deixando em repouso à temperatura ambiente por 24 h e em seguida levadas à refrigeração para acelerar o processo (Figura 9a). Não houve diferenças significativas na presença dos ácidos graxos nas amostras antes e depois do tratamento, verificados por RMN  $^1\text{H}$ .

Diante disso passou-se a solubilizar as amostras em acetona (1:5, m/v), e em seguida transferidas para tubos Falcon de 12 mL, e centrifugados, permanecendo inicialmente por 40 min a 6000 rpm (Figura 9b), podendo ser observado a separação. As amostras foram separadas em precipitado (ácidos graxos) e sobrenadante (demais

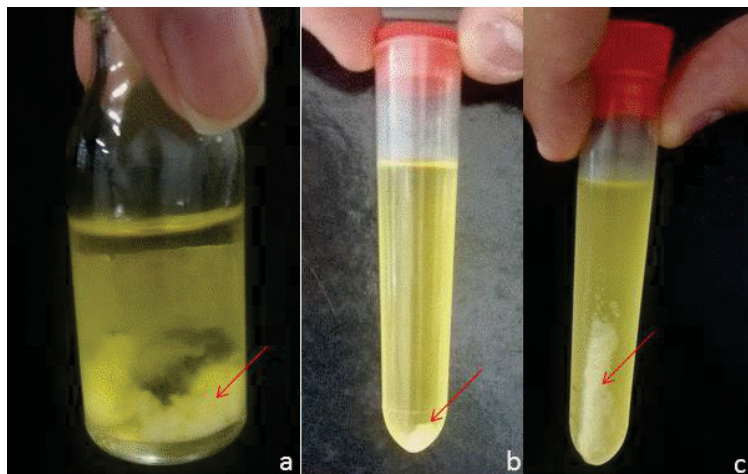
compostos) com a ajuda de uma pipeta de Pasteur e mantidas a temperatura ambiente para a evaporação da acetona residual. Depois de secas, foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$ , demonstrando a diminuição do pico referente ao ácido graxo, porém ainda existente.

Sendo assim, optou-se centrifugar pela segunda vez intercalando interrupções, onde foi possível observar não haver necessidade de centrifugar mais que 24 min a 6000 rpm. Novamente separados em frascos diferentes, e depois de secas analisadas por RMN  $^1\text{H}$ .

Ainda evidenciando o pico referente à graxa decidiu-se centrifugar pela terceira vez, e com 16 min em 7000 rpm já apresentou separação entre sobrenadante e precipitado não ocorrendo melhora ao prosseguir com o procedimento. Foram realizadas análises por RMN  $^1\text{H}$  depois de secas.

Na quarta e última etapa, essas mesmas amostras foram centrifugadas por mais 5 min em 6000 rpm à temperatura de  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 9c). E devido à temperatura ser baixa, facilitou a transferência tendo menor quantidade de partículas no sobrenadante, assim pode ser considerada a condição mais assertiva, apresentando os melhores resultados observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

FIGURA 9 - FRAÇÃO F24, ORIUNDA DO EXTRATO EM ÉTER DE PETRÓLEO, AMOSTRA SOLUBILIZADA EM REPOUSO (a); F24 APÓS A CENTRIFUGAÇÃO (b); F24 APÓS CENTRIFUGAÇÃO A  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  (c).

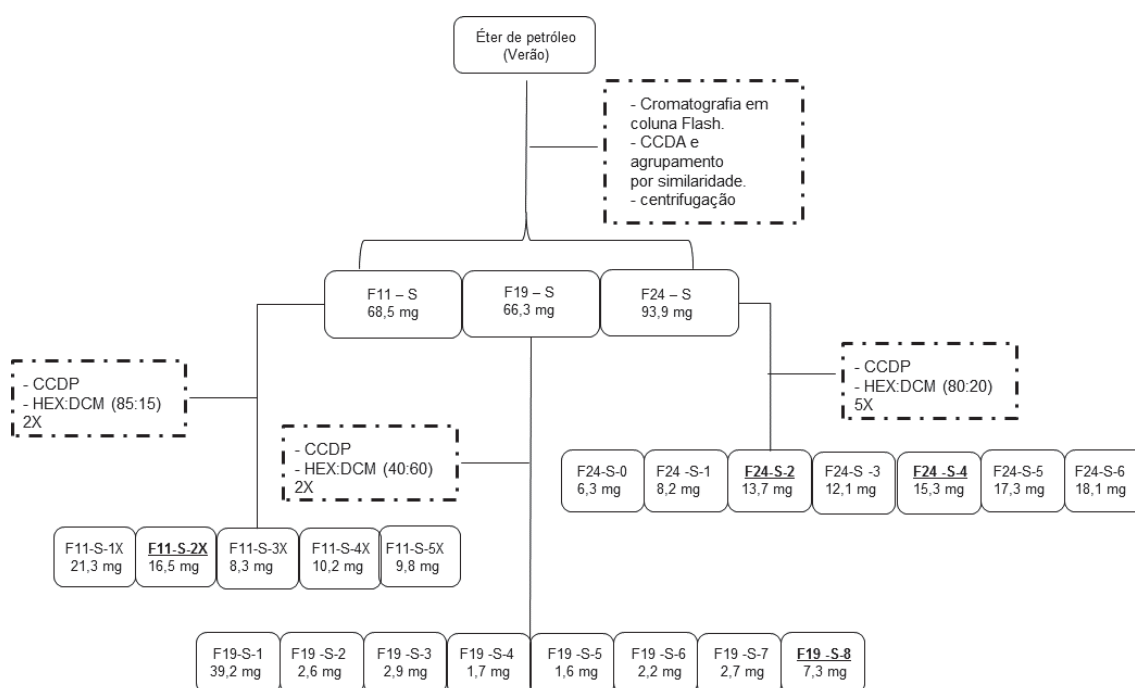


A escolha das rotações e tempo durante todos os procedimentos levou em consideração a resistência do tubo Falcon, portanto isso pode ter sido um empecilho para melhores resultados. A partir de então foi realizado a investigação da fase móvel para a purificação das frações.

### 3.8 Purificação das Frações F11, F19 e F24 oriundas do Extrato em Éter de Petróleo – Verão

As amostras resultantes do fracionamento do extrato em éter de petróleo da parte aérea coletadas no verão foram submetidas à purificação (Fluxograma 1). Em função da separação entre precipitado e sobrenadante, houve redução de massa nessas frações a serem trabalhadas.

FLUXOGRAMA 1 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DA COLUNA DE ÉTER DE PETRÓLEO DA PARTE AÉREA COLETADA NO VERÃO



As frações sublinhadas originaram as substâncias identificadas.

Para as análises de RMN as frações foram solubilizadas em 0,5 mL  $\text{CDCl}_3$  (99,8%, 0,05% TMS) (Sigma - Aldrich), a quantidade de massa utilizada para as análises foi definida a partir do quanto era obtido na purificação, portanto, não havendo um valor fixo.

### 3.9 Elucidação Estrutural

Para a identificação das substâncias isoladas foram utilizados métodos espectroscópicos: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e Carbono ( $^{13}\text{C}$ ), bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY).

### 3.10 Atividade Antimicrobiana

Os extratos brutos de *E. plana* foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica e antibacteriana frente a diferentes tipos de bactérias e fungos. Os testes antimicrobianos foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP tendo como colaboradora a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Os microrganismos utilizados foram *Bacillus subtilis* CCT 2576, *Escherichia coli* CCT 0547, *Staphylococcus aureus* CCT 2740, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* CCT 4296, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Candida albicans* CCT 776.

Os meios de cultura utilizados para os ensaios com as bactérias foram Nutrient Agar (Merk) e para levedura Sabouraud Dextrose Agar. A preparação dos inóculos para os ensaios foi realizada por diluição de uma massa de células raspadas em solução de NaCl (0,85%), ajustado à escala de McFarland no 0,5 e confirmado pela leitura em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias e 530 nm para leveduras. As suspensões de células foram diluídas para  $10^3$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para utilização nos ensaios.

Foram realizados os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acordo com a CLSI (2005), com a seguinte descrição: primeiramente foi depositado caldo Muller-Hinton (bactérias) ou caldo RPMI-1640 (levedura), em uma microplaca esterilizada de 96 poços. A solução estoque dos extratos brutos foi diluída e transferida para o primeiro poço, as diluições seriadas foram efetuadas e resultaram nas concentrações obtidas na faixa de 1,0 a 0,015 mg mL<sup>-1</sup>. Como controle de referência foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e nistatina (Merck) com concentração na faixa de 0,25 a 0,002 mg mL<sup>-1</sup>. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 36 °C durante 48h. Cada concentração foi realizada em

triplicata. A atividade antibacteriana foi detectada por adição de 20 µL de solução de 0,5% de TTC (cloreto de trifênil tetrazolium, Merck) aquoso. A CIM foi definida como a concentração mínima da amostra que inibiu o crescimento visível, tal como indicado por coloração pelo TTC (células mortas não são coradas pelo TTC). No caso da levedura *Candida albicans*, após o período de incubação, constatou-se a alteração na coloração do meio RPMI -1640 passando de rosa (cor original) para amarelo. Essa alteração indica uma acidificação do meio pelo crescimento dos microrganismos.

As concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (CBM e CFM, respectivamente) foram definidas por meio de plaqueamento de 10 µL do material contido no poço correspondente ao da CIM e dos três poços subsequentes de maior concentração, nos meios sólidos adequados para cada microrganismo. Na sequência, as placas contendo bactérias e leveduras foram incubadas de acordo com a temperatura determinada para cada microrganismo. As CBM e CFM foram definidas como as concentrações mínimas capazes de inibir totalmente o crescimento bacteriano ou fúngico (99,9%) nos meios de cultura sólidos específicos CLSI - "Clinical and Laboratory Standards Institute" (2005).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o rendimento dos extratos brutos obtidos da parte aérea de *E. plana* coletadas na primavera, no verão, no outono e no inverno, extraídos com solventes de diferentes polaridades.

TABELA 1 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA DE *E. plana*.

Massa de material	Estação	Éter de petróleo	Acetato de etila	Metanol
800g	Primavera	8,9 g	12,9 g	14,1 g
1000g	Verão	4,2 g	5,8 g	23,9 g
1013 g	Outono	3,2 g	9,5 g	10 g
1062 g	Inverno	3,3 g	16,1 g	17,4 g

FONTE: Dados da pesquisa.

#### 4.1 Comparação dos Extratos Brutos da Parte Aérea de *E. plana*

##### 4.1.1 Comparação dos Extratos Brutos de *E. plana* por RMN $^1\text{H}$ .

Todos os extratos brutos da parte aérea de *E. plana* foram analisados nas mesmas condições e utilizando a mesma concentração, como descrito no item 3.5, por RMN  $^1\text{H}$  e, os respectivos espectros comparados com a literatura.

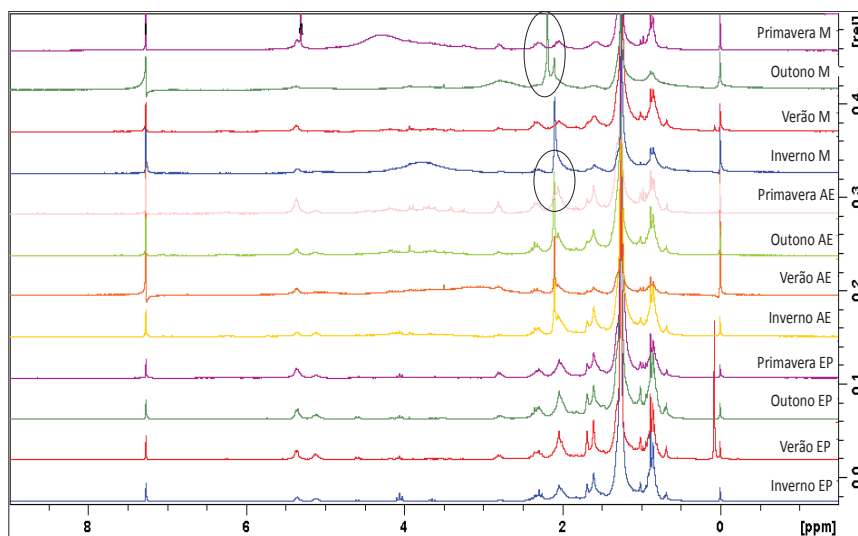
Comparando os espectros obtidos (Figura 10), é possível perceber que na região entre 0 e 2 ppm estão concentrados a maioria dos sinais, características de hidrogênios metilênicos e metílicos ligados a átomos de carbono  $\text{sp}^3$ . A ocorrência de sinais entre 2 a 4 ppm é indicativo de hidrogênios alílicos, alifáticos  $\alpha$ -mono e dissubstituídos. E por fim, é possível verificar a presença de hidrogênios ligados a átomos de carbono  $\text{sp}^2$ , entre 4 a 6 ppm porém, com menor intensidade.

A comparação preliminar dos extratos brutos da parte aérea em éter de petróleo apresenta muita similaridade no que diz respeito ao perfil químico nas diferentes estações. A diferença mais significativa está relacionada à intensidade dos sinais.

Os espectros dos extratos em acetato de etila mostram pouca diferença no que diz respeito ao perfil químico deles, em relação às estações. A única diferença verificada é no espectro de primavera, em que se observa um sinal (2,08 ppm) de menor intensidade em relação aos extratos das outras estações.

A análise dos espectros dos extratos em metanol mostra muita diferença no que diz respeito ao perfil químico. Observa-se que o extrato de verão é mais rico em substâncias químicas, seguido dos extratos de primavera e inverno, enquanto no outono pode ser observada menor diversidade de substâncias, e apresenta uma diferença acentuada, um sinal (2,17 ppm) de maior intensidade diferente nos demais extratos.

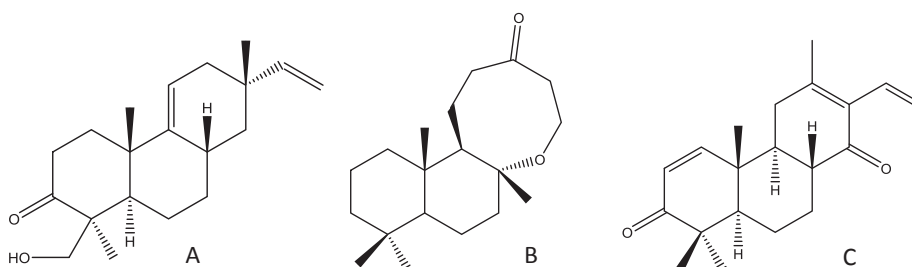
FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN  $^1\text{H}$  DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *E. plana* COLETADAS NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO. UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER DE PETRÓLEO (EP), ACETATO DE ETILA (AE) E METANOL (M) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



Quando comparados os espectros dos extratos brutos preparados com os três solventes de polaridade diferentes na mesma estação, há poucas diferenças no que diz respeito ao perfil químico. A maioria dos sinais se concentram na mesma região, novamente a maior diferença é a intensidade deles. Nota-se que não ocorrem sinais entre 6 a 10 ppm, indicando ausência de compostos aromáticos.

O perfil dos extratos no RMN  $^1\text{H}$  mostra características de compostos alifáticos e/ou alicíclicos que pode ser um indicativo da presença de terpenos, classe mais comum encontrada no gênero *Eragrostis*. De acordo com estudos desse gênero abordando sua composição química, encontrou-se principalmente diterpenos das classes cassano, pimarano (Figura 11A), labdano (Figura 11B), e neocassano (Figura 11C), os quais já foram relatados por Nishiya et al. (1991), Sebastião et al. (2012) e Favaretto et al. (2019), estudando *E. ferruginea*, *E. viscosa* e *E. plana*, respectivamente.

FIGURA 11 - ESTRUTURAS DE PIMARANO (11A);  $8\alpha,15$ -EPÓXI-16-NORLABDAN-13-ONA (11B) E NEOCASSA-1,12(13)15-TRIENO-3,14-DIONA (11C).



#### 4.1.2 Comparação dos Extratos Brutos de *E. plana* por IV

Todos os extratos da parte aérea de *E. plana* foram analisados por infravermelho. O espectro no IV mostra regiões de absorção de cada tipo de ligação, assim uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada (PAVIA et al., 2010).

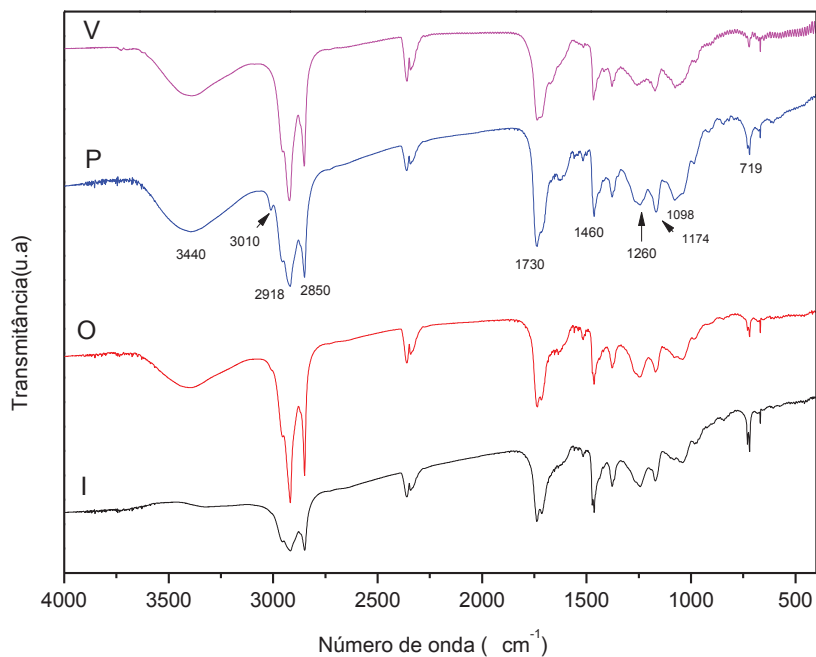
As regiões compreendidas pelo IV são nas frequências de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , no entanto, as absorções mais comuns ocorrem entre 650  $\text{cm}^{-1}$  a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 650 a 1550  $\text{cm}^{-1}$  tem-se absorções características de C – Cl, C – O, C – N, C – C, de 1550 a 1650  $\text{cm}^{-1}$  C = N e C = C, entre 1650 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  C = O, enquanto de 1800 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  ocorrem poucas absorções. De 2000 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  as absorções são referentes aos grupos C  $\equiv$  C, C  $\equiv$  N, X = C = Y (C, O, N, S) e em 2500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  finaliza com C – H, O – H e N – H (PAVIA et al., 2010).

Absorção na região de 3010  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramento em C  $sp^2$  de ligação dupla, e bandas entre 3000 a 2760  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a deformações axiais de C-H de grupo metila e metileno. Em 1730  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda que sugere a presença de grupo carbonila (C=O), a banda em 1460  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , e em 1260  $\text{cm}^{-1}$  é resultante da deformação axial de C-O de álcoois ou fenóis (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA, et al., 2010).

As bandas que aparecem na região de 1174 e 1098  $\text{cm}^{-1}$  são estiramentos de C-O, e nas regiões entre 719 e 590  $\text{cm}^{-1}$  são em geral correspondentes à absorção da ligação H-C de ligações duplas presentes nos ácidos graxos insaturados (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA, et al., 2010).

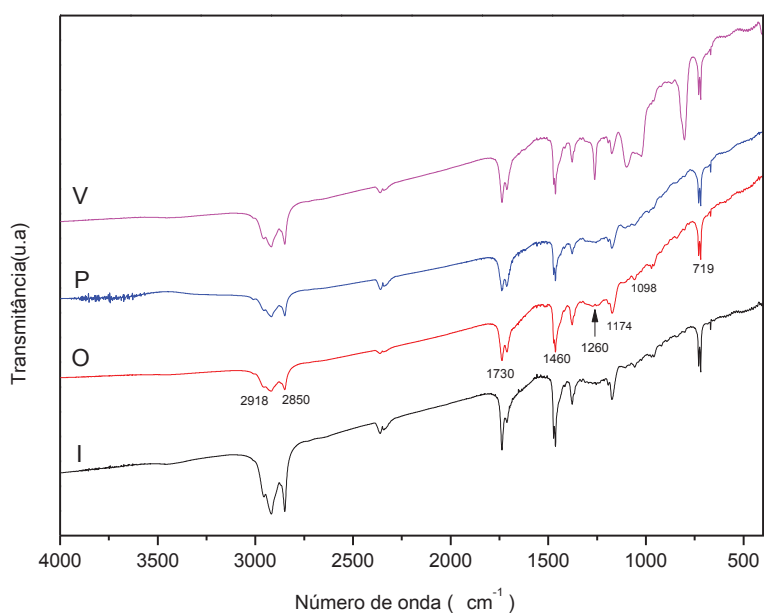
Diante dessas observações, considerando o solvente utilizado na extração da parte aérea coletada nas diferentes estações do ano, nota-se que os espectros de IV dos extratos em acetato de etila (Figura 12) e metanol (APÊNDICE 1, pág. 78), apresentam muitas semelhanças. As pequenas diferenças observadas correspondem, principalmente, às intensidades de algumas bandas.

FIGURA 12 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DOS EXTRATOS EM ACETATO DE ETILA DAS ESTAÇÕES INVERNO (I), OUTONO (O), PRIMAVERA (P) E VERÃO (V).



Como pode ser observada a banda entre 3550 e 3350  $\text{cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de O-H (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA, et al., 2010) está presente nos extratos obtidos em acetato de etila e metanol, no entanto, está ausente nos extratos em éter de petróleo (Figura 13).

FIGURA 13 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DOS EXTRATOS EM ÉTER DE PETRÓLEO NAS ESTAÇÕES INVERNO (I), OUTONO (O), PRIMAVERA (P) E VERÃO (V).



Essa comparação foi realizada para todas as estações/solventes tendo uma similaridade significativa em praticamente todos os extratos (APENDICE 2-4, pág. 78-79), apenas os extratos em éter de petróleo mostraram poucas variações em algumas regiões no espectro em relação aos demais extratos. A diferença está associada à polaridade dos solventes usados para a extração.

#### 4.1.3 Análise de Componentes Principais dos Dados Obtidos por IV

Os dados foram processados no software MATLAB, em que se utilizou a técnica de Análises por Componentes Principais, em inglês “Principal Component Analysis” (PCA). É um método exploratório, que visa reduzir o conjunto de variáveis originais, preservando a maior quantidade de variância com mínima perda de informações, permitindo interpretação multivariada e verificação de similaridade entre amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007; SOEIRO et al., 2010; ROSÁRIO; KIPPER; FERRÃO, 2012; SOUZA; POPPI, 2012).

Os resultados das análises de infravermelho foram organizados em uma planilha de modo que geraram uma matriz de 3736 linhas e 36 colunas, e em seguida, foram submetidos à análise das componentes principais.

A primeira componente (PC1) explica 72,09% da variância dos dados, enquanto a segunda componente (PC2) explica 20,31%, assim PC1 x PC2 representa a variância de 92,4% do conjunto de dados (Figura 14).

Observa-se, em cada quadrante, claramente um agrupamento dos extratos em função do solvente de extração, independente da estação do ano. Os extratos em éter de petróleo nas quatro estações são os mais similares.

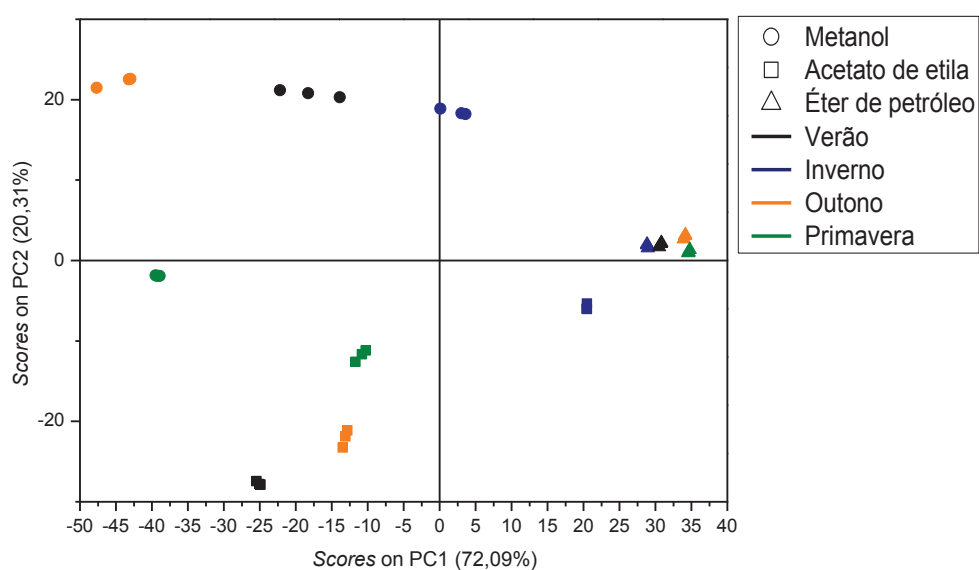
Pode-se observar, pelo gráfico de *Scores* da PC1, a diferenciação dos extratos em metanol e acetato de etila (verão, outono e primavera), que encontram-se no quadrante negativo dessa PC, dos extratos em éter de petróleo (em todas as estações), acetato de etila inverno e metanol inverno, que encontram-se no quadrante positivo dessa PC.

Na análise da PC2 se observa que os extratos em acetato de etila (em todas as estações) encontram-se no quadrante negativo dessa PC, enquanto os extratos em metanol (verão, inverno e outono) estão no quadrante positivo. Os extratos em éter de petróleo (em todas as estações) e em metanol (primavera) não contribuem estatisticamente devido a proximidade ao eixo.

A diferença observada no perfil químico desses extratos ocorre em função da polaridade do solvente utilizado na extração, uma vez que solventes mais polares, como metanol, tendem a extrair compostos mais polares. Essa diferenciação do extrato mais polar dos demais também foi observada por Silva (2014) e Klein (2015), em trabalho com as raízes e parte aérea de *E. plana*, respectivamente.

Essa separação dos extratos obtidos em metanol, no que diz respeito ao perfil químico, também foi observada nas análises por CLAE.

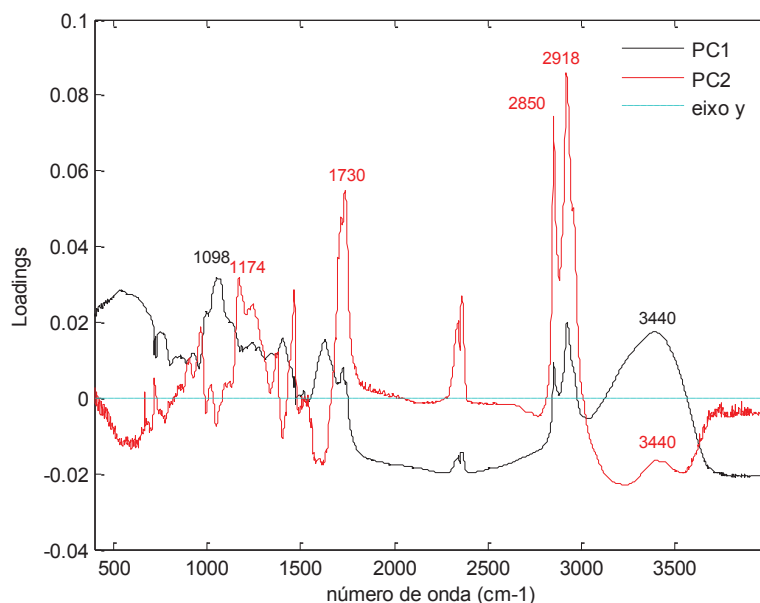
FIGURA 14 - SCORES OBTIDO POR PCA DOS DADOS DE IV DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA COLETADAS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETRÓLEO.



O fato de alguns extratos obtidos com o mesmo solvente encontrarem-se em quadrantes distintos pode ser explicado por algumas diferenças encontradas nos seus espectros, as quais foram consideradas estatisticamente significativas.

Para identificar quais variáveis influenciam a diferenciação e agrupamento das amostras, foi analisado o gráfico de *loadings* (Figura 15).

Pelo gráfico de *loadings* (Figura 15), pode-se afirmar que as amostras de Scores positivos na PC1 sofrem maior influência das bandas em 1098 e 3440  $\text{cm}^{-1}$ . Considerando a PC2, as de maior influência no quadrante positivo são as bandas em 1730  $\text{cm}^{-1}$  e 1174  $\text{cm}^{-1}$  enquanto a banda em 3440  $\text{cm}^{-1}$ , influencia os extratos em acetato de etila no Scores negativo.

FIGURA 15 - GRÁFICO DE *LOADINGS* – PC1 E PC2

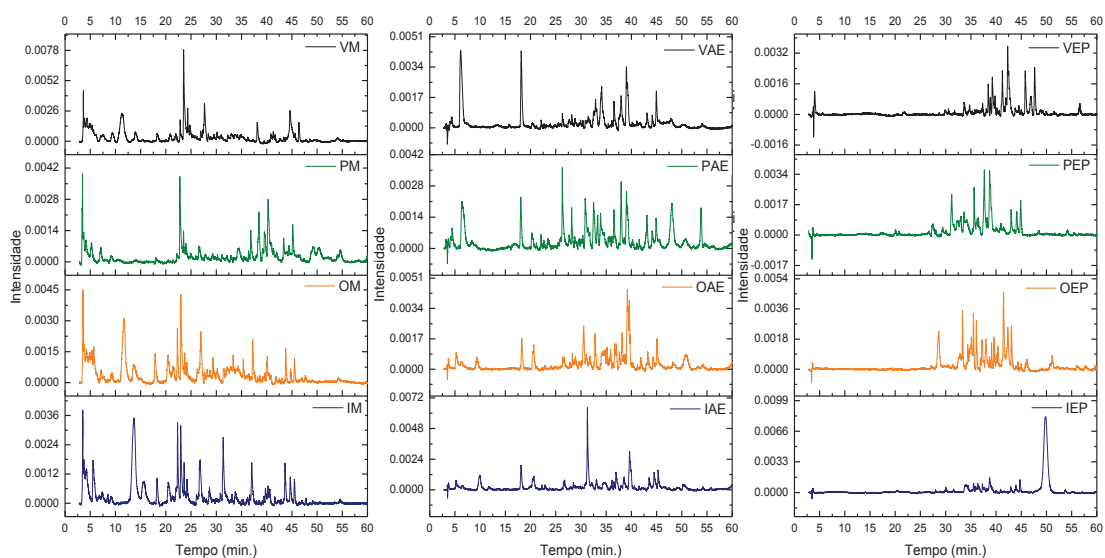
#### 4.1.4 Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência

Os extratos brutos de *E. plana*, obtidos com diferentes solventes e de partes aéreas coletadas nas quatro estações do ano foram analisados por CLAE (Figura 16). Nota-se ao analisar os extratos em metanol, que há semelhança entre as estações inverno, outono e verão, ocorrendo alta concentração de sinais, diferenciando apenas na intensidade e presença ou não de alguns compostos.

Os extratos em acetato de etila apresentam semelhanças entre as estações verão, primavera, outono e inverno, havendo maior concentração, entre 15-55 minutos, em que podem ser observadas diferenças relacionadas à intensidade de alguns sinais e poucas diferenças no que diz respeito à variedade de compostos.

Ao analisar os extratos em éter de petróleo nas estações verão, primavera e outono, são similares em alguns constituintes na região entre 20-50 minutos diferenciando apenas na intensidade e presença ou não de alguns constituintes. Já inverno possui um perfil diferenciado dos demais com um pico entre 45-55 minutos de alta intensidade que faz com que os demais picos não se sobressaiam.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETRÓLEO.



V = verão; I = inverno; O = outono; P = primavera; EP = éter de petróleo; AE = acetato de etila; M = metanol.

#### 4.1.5 Análises de Componentes Principais dos Dados Obtidos por CLAE

Os resultados obtidos pelas análises de CLAE foram organizados em planilhas de 34302 linhas por 36 colunas, cada linha corresponde à intensidade dos constituintes e cada coluna contém as amostras dos extratos brutos da parte aérea (quatro estações e três solventes de diferentes polaridades) e, em seguida, submetido à PCA.

A primeira componente (PC1) da PCA, explica 20,36% das informações originais, enquanto a segunda componente (PC2) explica 14,06%, assim PC1 x PC2 representa a variância de 34,42% do conjunto de dados (Figura 17). Embora as componentes respondam por 20,36% e 14,06% da variância total, respectivamente, elas contêm informações úteis.

Observando o gráfico de Scores PC1 (20,36%), é possível ver separação dos extratos com relação à polaridade do solvente utilizado na extração. Os extratos obtidos da parte aérea em metanol encontram-se no quadrante positivo dessa PC, enquanto os extratos obtidos em éter de petróleo e acetato de etila encontram-se no quadrante negativo dessa PC.

De acordo com a PC2 (14,06%) é possível notar também separação com relação à polaridade do solvente utilizado na extração, os extratos obtidos com éter de petróleo, encontram-se no quadrante negativo dessa PC, enquanto, os extratos obtidos em acetato de etila e metanol, exceto primavera metanol, estão no quadrante positivo.

FIGURA 17 - SCORES OBTIDO POR PCA DOS DADOS DE CLAE DOS EXTRATOS DA PARTE AÉREA COLETADAS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL, ACETATO DE ETILA E ÉTER DE PETROLEO.

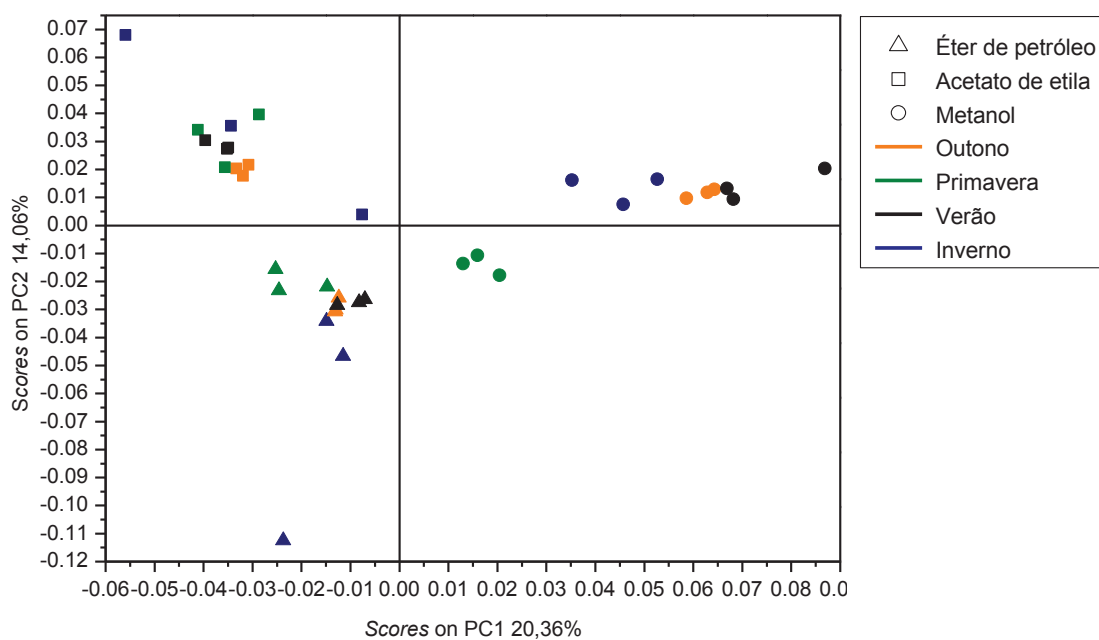
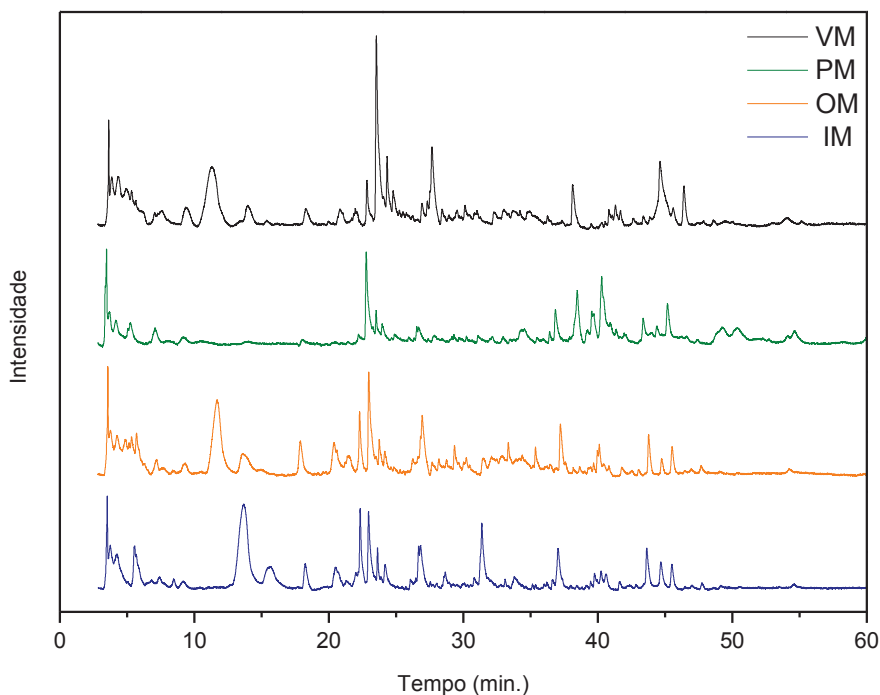


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS NAS ESTAÇÕES INVERNO, OUTONO, PRIMAVERA E VERÃO EM METANOL.



V = verão; I = inverno; O = outono; P = primavera; M = metanol.

Nos cromatogramas dos extratos em metanol é possível observar que aqueles extratos obtidos da coleta na primavera não apresentam picos entre 10-20 min., e possuem concentração de picos entre 35-50 min. mais intensos. Pode-se sugerir que essas diferenças observadas podem ser as responsáveis pela diferenciação desses extratos dos demais na PCA.

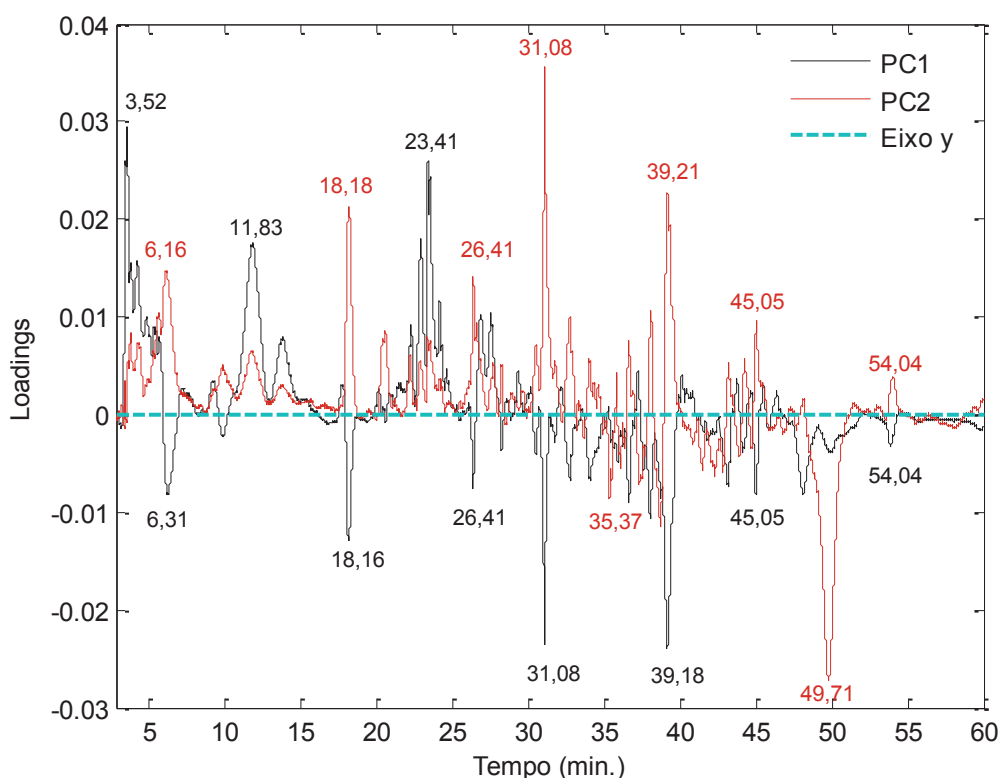
Para avaliar as correlações observadas no gráfico da PCA, também foi analisado o gráfico de *loadings* (Figura 19), onde é possível explicar os agrupamentos das amostras, influenciadas pelas bandas cromatográficas responsáveis por caracterizá-las.

O gráfico de *loadings* (Figura 19), ajuda a explicar a separação das amostras de *Scores* positivos na PC1. Os extratos em metanol nas quatro estações (lado positivo da PC1) são caracterizados, principalmente, pelas bandas cromatográficas no tempo de retenção de 3,52, 11,83 e 23,41 min., portanto, esses extratos se separam dos demais devido à presença desses sinais mais intensos. As amostras de *Scores* negativos tem influência das bandas cromatográficas no tempo de retenção de 6,31, 18,16, 26,41, 31,08, 39,18, 45,05 e 54,04 min.

Pelo gráfico de *loadings* (Figura 19), pode-se afirmar que as amostras de

Scores positivos na PC2, os extratos em acetato de etila e em metanol exceto primavera, as bandas cromatográficas responsáveis pela correlação possuem tempo de retenção 6,19; 18,18; 26,41; 31,08; 39,21; 45,05 e 44,04 min. Por outro lado, as amostras de Scores negativos na PC2, os extratos em éter de petróleo e metanol primavera, apresentam maior influência das bandas cromatográficas no tempo de retenção 35,37 e 49,71 min.

FIGURA 19 - GRÁFICO DE *LOADINGS* – PC1 E PC2.



Os resultados observados têm relação com a diferença no perfil químico dos extratos brutos, claramente mostrado nos cromatogramas e refletido nos dados quimiométricos.

#### 4.2 Fracionamento do Extrato da Parte Aérea em Éter de Petróleo – Verão

O extrato em éter de petróleo da parte aérea na estação verão foi escolhido para ser purificado, baseado nos resultados de atividade alelopática apresentados por Dalbosco (2013), e por mostrar nas análises de IV e CLAE constituintes diferenciados

dos outros extratos.

A coluna resultou em 148 frações, as quais foram agrupadas após análise em CCD, originando em 17 frações, como mostra a Tabela 2 abaixo e suas respectivas massas.

TABELA 2 - FRAÇÕES AGRUPADAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA FLASH DO EXTRATO DA PARTE AÉREA EM ÉTER DE PETRÓLEO.

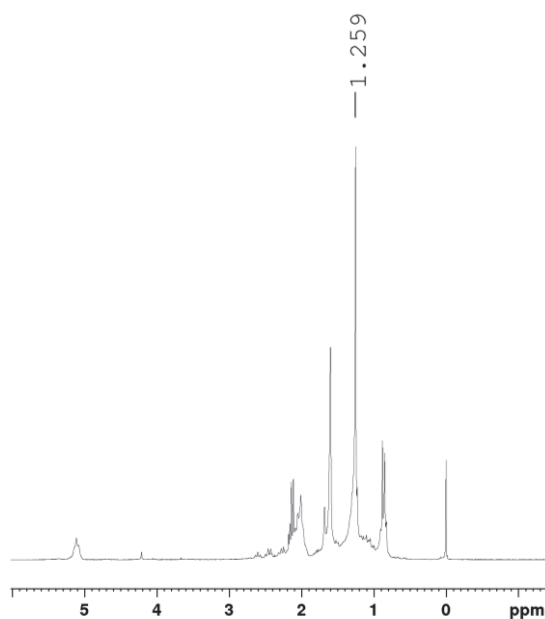
Fração	Código	Massa (mg)	Substâncias		Fração	Código	Massa (mg)
			identificadas				
1-5	F05	198,0			56-61	F61	119,6
6-11	<u>F11*</u>	511,7	<b>2</b>		62-74	F74	175,5
12-19	<u>F19*</u>	389,5	<b>1</b>		75-89	F89	197,2
20-24	<u>F24*</u>	265,9	<b>3, 4</b>		90	F90	898,3
25-33	<u>F33</u>	41,2			91-97	F97	249,6
34-38	<u>F38</u>	37,0			98	F98	262,6
39-45	<u>F45</u>	48,2			99-113	<u>F113</u>	65,0
46-51	<u>F51</u>	45,1			114-148	F148	15,7
52-55	<u>F55</u>	63,9					

As frações sublinhadas foram purificadas e com asterisco as frações que deram origem às substâncias identificadas.

Todas as frações apresentam massa suficiente para dar continuidade aos estudos fitoquímicos, recuperando da coluna a massa total de 3584 mg, com 91,9% de eficiência.

As frações F33, F38, F45, F51, F55 e F113 foram submetidas à CCDA para encontrar melhores sistemas de solvente para a separação dos compostos e em seguida submetidos à CCDP para a purificação (APÊNDICE 5, pág. 80).

As frações obtidas após a purificação foram analisadas em RMN  $^1\text{H}$ , e comparadas à literatura. Como observado nos extratos brutos, a maior concentração dos sinais está entre 0 e 2 ppm, valores característicos de átomos de hidrogênio metilênicos e metílicos. Para Parker et al. (2014) e Guillén et al. (2001) o pico que se evidencia em 1,25 ppm é característico e correspondente a grupos  $-\text{CH}_2$  em uma cadeia de ácidos graxos. A escassez de picos isolados, observado, por exemplo, na fração F45-6, (Figura 20), pode-se inferir que os sinais por estarem encobertos por outros de maior intensidade, dificultam dessa forma, a elucidação de metabólitos, provavelmente da classe dos terpenos.

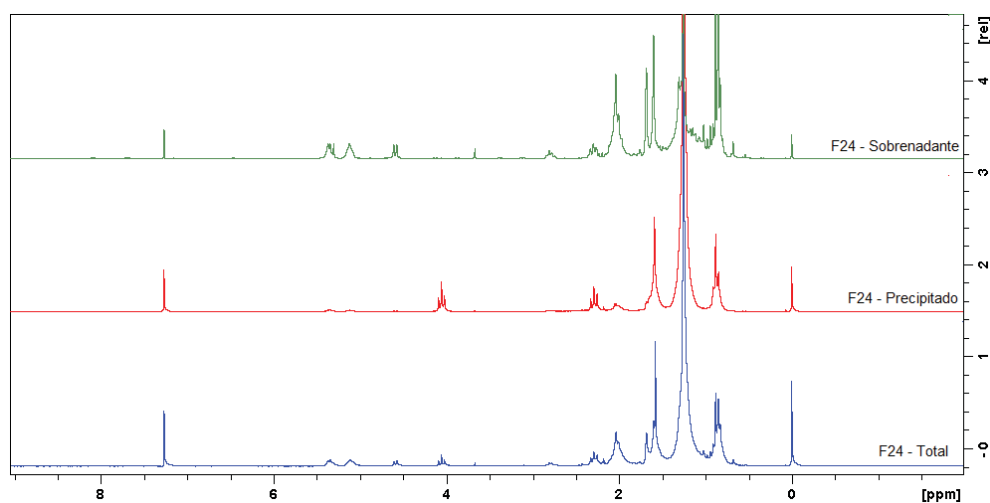
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DA F45-6 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

As frações F38, F51 e F55 foram purificadas e apresentaram o mesmo resultado nas análises de RMN  $^1\text{H}$  quando comparadas à F45. Isso evidenciou que o principal composto presente nesse extrato é derivado de ácidos graxos e que, portanto, haveria necessidade de sua remoção, a fim de permitir o isolamento dos compostos minoritários. Sendo assim, adotou-se outra abordagem nas frações F11, F19 e F24.

#### 4.3 Remoção dos Ácidos Graxos das Frações F11, F19 e F24

Inicialmente foram realizadas análises de RMN  $^1\text{H}$  das três frações (F11, F19 e F24), para o acompanhamento da separação ou eliminação dos ácidos graxos no decorrer do procedimento, e todas apresentaram o pico em 1,25 ppm bem intenso. Durante os intervalos nas centrifugações de cada fração foram realizadas novamente as análises de RMN  $^1\text{H}$ , evidenciando a diminuição do sinal no espectro referente aos ácidos graxos (Figura 21).

FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO F24 APÓS A ÚLTIMA CENTRIFUGAÇÃO A  $-4^\circ\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



O mesmo resultado positivo se obteve para as demais frações (APÊNDICES 6-7, pág. 81), havendo diminuição do pico em 1,25 ppm e intensificando sinais de outros compostos.

Metodologia similar já foi relatada por Avelar et al., (2013), Santos et al., (2013), Silva et al., (2014) e Pierozan, et al., (2009) na obtenção de extrato bruto através de endospermas com extração de lipídeos e outras finalidades. No caso do extrato bruto da parte aérea do *E. plana* foram realizadas algumas modificações definidas no decorrer do experimento.

#### 4.4 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato da Parte Aérea em Éter de Petróleo Verão.

##### 4.4.1 Determinação Estrutural das Substâncias **1-4** Isoladas do Extrato da Parte Aérea em Éter de Petróleo Verão.

As substâncias **1** (7,3 mg) e **2** (16,5 mg) estão sendo identificadas em mistura, porém sabe-se pelo perfil químico tratarem-se de terpenos. Ambas foram isoladas como substâncias sólidas, incolores e estão sendo identificadas pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D. Os dados do RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1** (Tabela 3) e **2** (Tabela 4) são muito semelhantes.



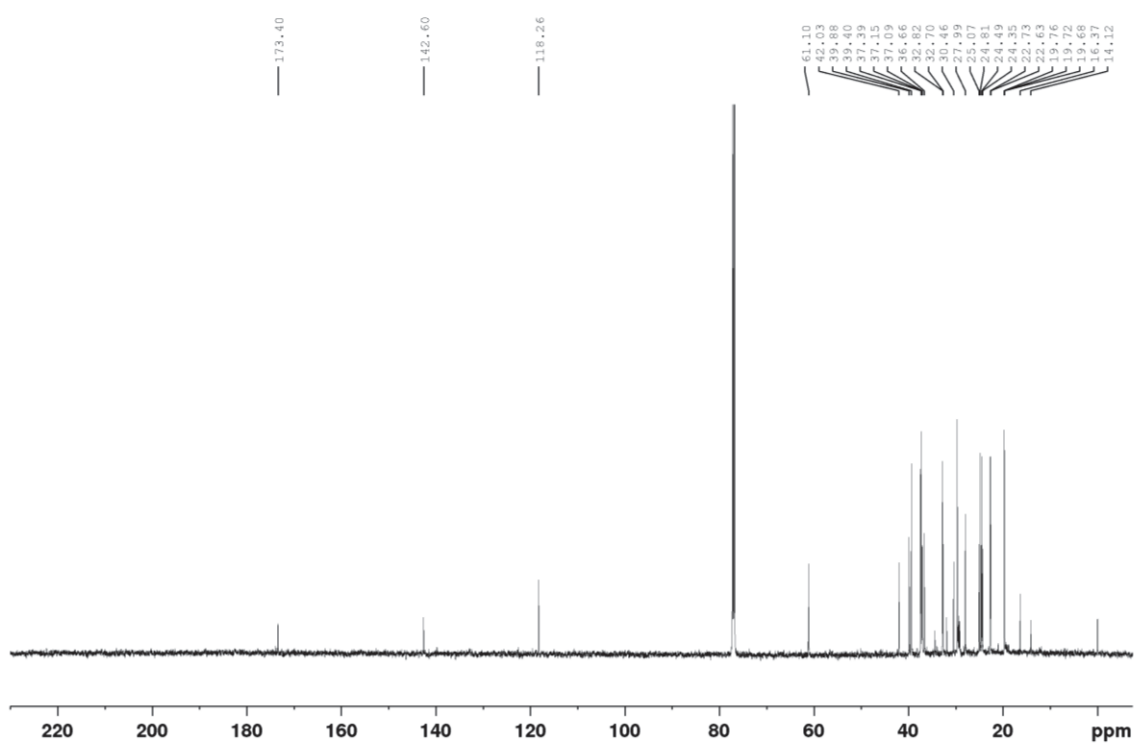
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1

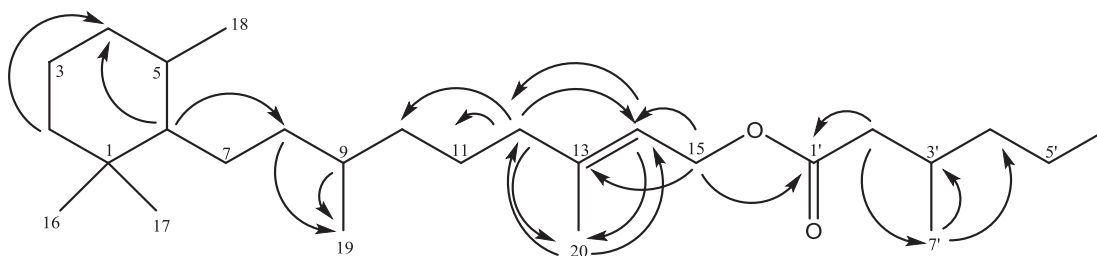
TABELA 3 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz), DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  E CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 1 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.

Nº	Substância 1			Tam et al., 2018	
	$^1\text{H}$	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$	HMBC	$^1\text{H}$	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$
1	-	36,66	-	-	36,64
2	1,13 (m)	39,39	3; 4; 16; 17	1,14 (m)	39,38
3	1,05 (m)	24,48	2	1,25 (m)	24,47
4	1,05 (m)	37,38	5; 18	1,25 (m)	37,37
5	1,52 (m)	27,99	3	1,52 (m)	27,98
6	1,37 (m)	32,81	4; 7; 18	1,38 (m)	32,80
7	1,61 (m)	24,81	6; 8	1,28 (m)	24,80
8	1,37 (m)	37,09	7; 19	1,30 (m)	37,30
9	1,37 (m)	32,69	8	1,36 (m)	32,68
10	1,06 (m)	37,15	8; 9; 19	1,25 (m) -1,08 (m)	37,44
11	1,43 (m)	25,07	10; 12	1,60 (m)	25,04
12	2,00 (m)	39,87	20; 11; 10; 14; 13	2,00 (m)	39,86
13	-	142,59	-	-	142,58
14	5,33 (t; 7,1)	118,25	20; 12; 15	5,33 (t; 7,0)	118,21
15	4,59 (d; 7,1)	61,10	14; 13; 1' (C=O)	4,59 (d; 7,0)	61,19
16	0,86 (s)	22,72	1; 2; 17	0,86 (s)	22,69
17	0,85 (s)	22,63	1; 2; 16	0,85 (s)	22,62
18	0,84 (d; 6,1)	19,76	5	0,845 (d; 7,0)	19,74
19	0,92 (d; 6,6)	19,71	8; 9	0,838 (d; 7,0)	19,71
20	1,69 (s)	16,37	12; 14	1,69 (br s)	16,36
1'	-	173,39	-	-	173,93
2'	2,10 (m) 2,28 (m)	42,02	-	2,29 (t, 7,5)	34,42
3'	1,95 (m)	30,46	-	1,58-1,60 (m)	24,80
4'	1,05 (m)	37,38	-	1,25 (m)	29,70- 29,16
5'	1,25 (m)	24,34	-	1,25 (s)	31,93
6'	0,88 (m)	14,11	-	1,25 (br s)	22,71
7'	0,92 (d; 6,6)	19,71	-	0,87 (t; 7,0)	14,10

Pelas correlações de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE 9, pág. 82) H-14/C12, H-15 /C-14, H-15/ C-13, H-15/C-1' (C = O), foi possível propor uma estrutura, a qual possui dois estereocentros no anel em C-5 e C-6, além dos estereocentros nos C- 9 e C-3' e uma ligação dupla de configuração *E*.

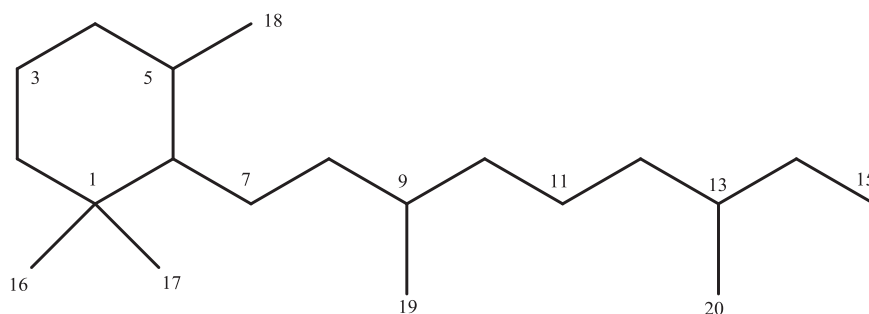
De acordo com os dados observados nas correlações espectroscópicas de RMN 1D e 2D, e por comparação na literatura (Tabela 3) propõe-se a seguinte estrutura (Figura 24) para a substância 1.

FIGURA 24 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), PARA A SUBSTÂNCIA 1



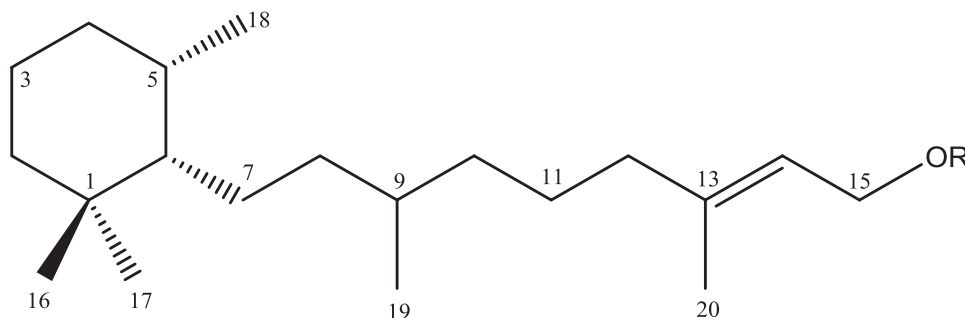
A estrutura apresentada acima pertence à classe dos ciclofitanos, são diterpenoides derivados do pirofosfato de geranylgeranila. A classe de 10,15-ciclofitano (Figura 25) surge por ciclização entre os carbonos 1 e 6 do esqueleto do fitano, diterpenoides acíclicos regulares (RAHMAN, A. U, 1992; BUCKINGHAM, J.B. 1994).

FIGURA 25 - ESTRUTURA DE 10,15-CICLOFITANO



Em outro estudo, compostos muito semelhantes foram isolados dos extratos em metanol de raízes e folhas de *Cassipourea madagascariensis* DC da família Rhizophoraceae, em que foram elucidados dois novos terpenoides, cassipourol (Figura 26-1) e acetato de cassipouril (Figura 26-2). Em extratos em metanol de galhos e raízes de *Dacrycarpus imbricatus* Blume de Laubenfels, da família Podocarpaceae um novo diterpeno, hexadecanoato de cassipouril (Figura 26-3), além do cassipourol (Figura 26-1).

FIGURA 26 – ESTRURAS DE CASSIPOUROL (1), ACETATO DE CASSIPOURIL (2) E HEXADECANOATO DE CASSIPOURIL (3)



- 1: R = H (CHATURVEDULA et al, 2006; TAM et al., 2018)  
 2: R = COCH<sub>3</sub> (CHATURVEDULA et al., 2006)  
 3: R = COCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub> (TAM et al., 2018)

A diferença na estrutura proposta neste trabalho para a estrutura dos autores mencionados é a sequência após o carbono de carbonila, porém isso requer uso de outras técnicas para confirmação.

Uma técnica empregada na elucidação estrutural é análise de Difração de Raio-X, em que é necessária a formação de monocristais da substância a ser analisada. O processo de cristalização envolve duas fases, a nucleação que é a formação de agregados de moléculas e, o crescimento de cristais pela incorporação de outras moléculas no mesmo. As interações por forças atrativas fazem com que ocorra a união dos cristais menores formando cristais maiores, tornando-os possíveis de serem observados (RODRIGUES, J.N.; ANTON, C; GIOIELLI, L. A., 2003).

No entanto, esse comportamento não ocorreu nas substâncias que foram propostas neste estudo. Isso pode ter ocorrido devido moléculas grandes serem suscetíveis à movimentação, ou seja, apresentam uma variedade de arranjos ou um arranjo peculiar nos pontos de atração. As moléculas tendem a se manter em posições mais estáveis, o que significa de menor energia de acordo com suas forças de atração, porém a estrutura apresentada possui baixa interação molecular, isso também pode ter influenciado a não cristalização da substância (BUNN C., 1972). Sendo assim, outros experimentos terão que ser realizados para auxiliar essa confirmação da estrutura, mas até o momento apenas é permitido propor o esqueleto dessa substância.

Para a substância **2** o espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 27) mostrou a presença de três simpletos de metila em  $\delta$  1,69 (H-20, 3H); 0,83 (H-17, 3H) e 0,86 (H-16, 3H); três dupletos de metila a  $\delta$  0,92 (H-19, 3H) e 0,84 (H-18 e H-6', 6H); uma metila multipletto em  $\delta$  0,88 (H-5', 3H), e apenas um átomo de hidrogênio ligados a carbono sp<sup>2</sup> em  $\delta$

5,33 (H-14; 1H) . É possível observar a presença de dois átomos de hidrogênio em  $\delta$  4,58 (H-15, 2H) que está ligado diretamente a um átomo de carbono carbinólico (Figura 29). Esses átomos de hidrogênio possuem correlação direta  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (HSQC) (APÊNDICE 10, pág. 83) estão ligados aos átomos de carbono em  $\delta$  16,36 (C-20); 22,62 (C-17); 22,71 (C-16); 19,70 (C-19); 19,74 (C-18 e C-6'); 14,11 (C-5'); 118,26 (C-14) e 61,13 (C-15), respectivamente (Tabela 4).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28) mostrou onze sinais de átomos de carbono metilenos, cinco metinos (um  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  118,26), e três átomos de carbonos quaternários (uma carbonila  $\delta$  173,44)

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2.

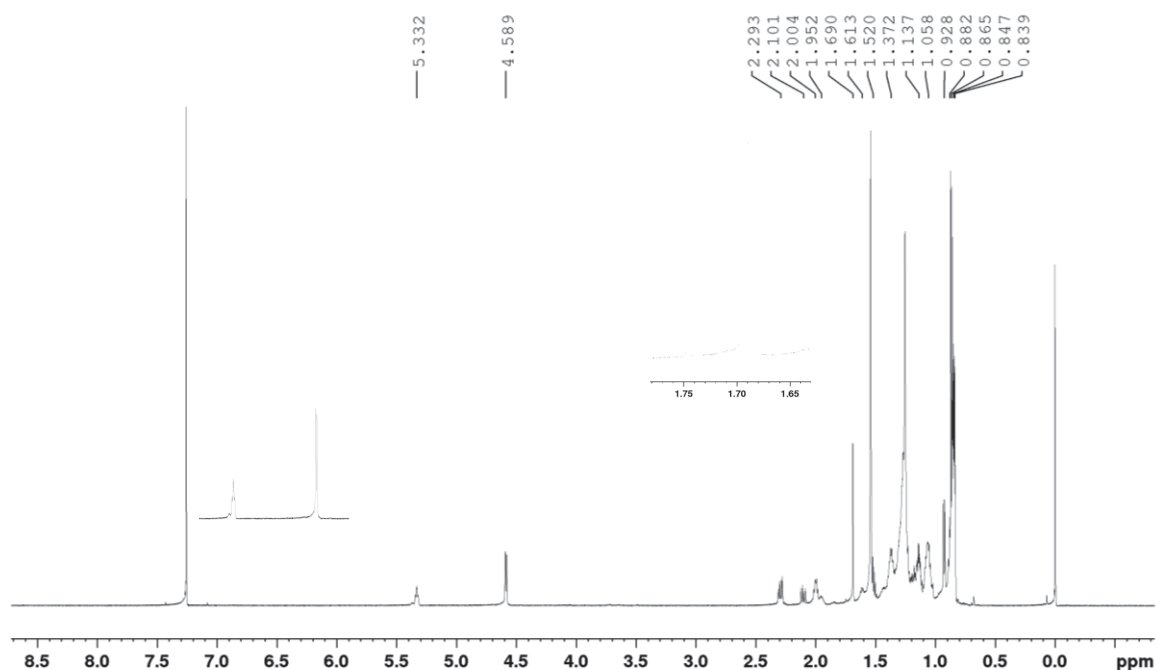
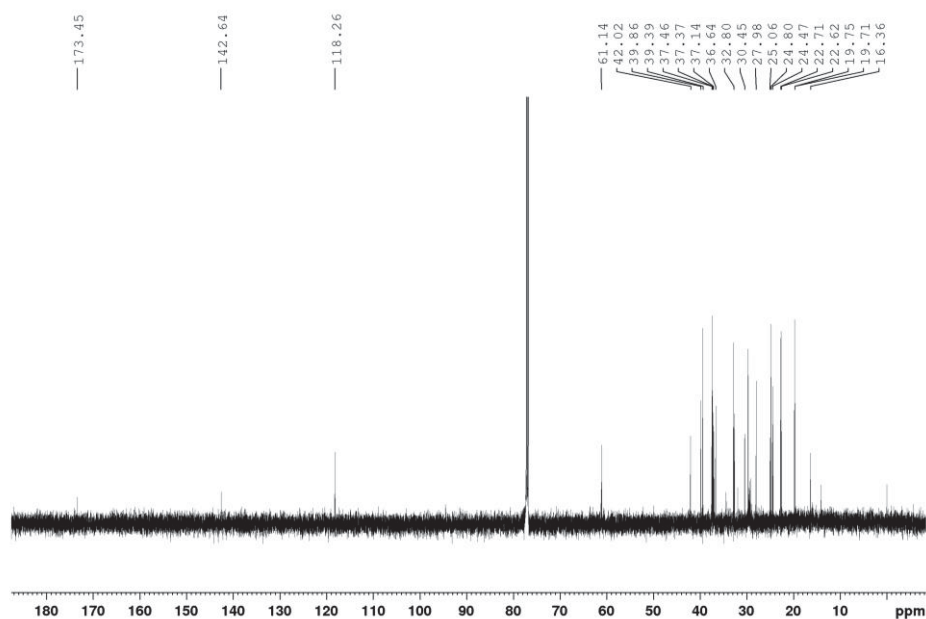


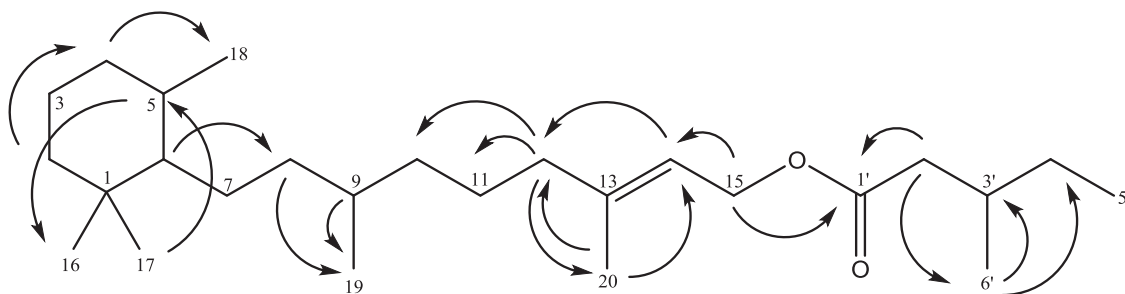
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2TABELA 4 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz), DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  E CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTANCIA 2 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.

Substância 2				Tam et al, 2018	
Nº	$^1\text{H}$	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$	HMBC	$^1\text{H}$	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$
1	-	36,64	-	-	36,64
2	1,13 (m)	39,38	3; 4; 16; 17	1,14 (m)	39,38
3	1,05 (m)	24,47	2	1,25 (m)	24,47
4	1,05 (m)	37,37	5; 18	1,25 (m)	37,37
5	1,52 (m)	27,97	3	1,52 (m)	27,98
6	1,37 (m)	32,80	4; 7; 18	1,38 (m)	32,80
7	1,61 (m)	24,79	6; 8	1,28 (m)	24,80
8	1,17 (m)	37,45	7; 19	1,30 (m)	37,30
9	1,95 (m)	30,44	8	1,36 (m)	32,68
10	1,37 (m)	37,13	8; 9; 19	1,25 (m) -1,08 (m)	37,44
11	1,61 (m)	25,05	10;12	1,60 (m)	25,04
12	2,00 (m)	39,85	20; 11; 10; 14; 13	2,00 (m)	39,86
13	-	142,64	-	-	142,58
14	5,33 (t; 7,1)	118,26	20; 12; 15	5,33 (t; 7,0)	118,21
15	4,58 (d; 7,1)	61,13	14; 13; 1' (C=O)	4,59 (d; 7,0)	61,19
16	0,86 (s)	22,71	1; 2; 17	0,86 (s)	22,69
17	0,83 (s)	22,62	1; 2; 16	0,85 (s)	22,62
18	0,84 (d; 6,6)	19,74	5	0,845 (d; 7,0)	19,74
19	0,92 (d; 6,6)	19,70	8; 9	0,838 (d; 7,0)	19,71
20	1,69 (s)	16,36	12; 14	1,69 (br s)	16,36
1'	-	173,44	-	-	173,93
2'	2,10 (m) 2,29 (m)	42,01	-	2,29 (t, 7,5)	34,42
3'	1,95 (m)	30,44	-	1,58-1,60 (m)	24,80
4'	1,05 (m)	37,37	-	1,25 (m)	29,70- 29,16
5'	0,88 (m)	14,11	-	1,25 (m)	31,93
6'	0,84 (d; 6,6)	19,74	-	1,25 (m)	22,71
-	-	-	-	0,87 (t; 7,0)	14,10

O experimento a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC) (APÊNDICE 11, pág. 83) mostra correlação dos átomos H-14/C12, H-15 /C-14, H-15/ C-13, H-15/C-1' (C = O). Sendo assim foi possível sugerir uma proposta de estrutura, em que possui uma ligação dupla de configuração *E*, e dois estereocentros no anel em C-5 e C-6, além dos estereocentros nos C-9 e C-3'.

Baseando-se em considerações observadas nas correlações espectroscópicas de RMN 1D e 2D, e por comparação na literatura (Tabela 4) propõe-se a seguinte estrutura (Figura 29).

FIGURA 29 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), PARA A SUBSTÂNCIA 2.



Como pode ser visto a estrutura proposta para a substância **2** é muito similar à proposta para a substância **1**, seus deslocamentos químicos são muito similares juntamente com suas correlações. A diferença observada é a cadeia após o carbono de carbonila em que as correlações nos fazem acreditar ser uma cadeia menor.

Esses diterpenos são escassos na literatura, existem exemplos publicados de outras espécies como em *Laurencia viridis*, *Laurencia obtusa*, mas até então não foi relatado no gênero *Eragrostis* (SÚAREZ, 1996/97).

A substância **3** (13,7 mg) foi isolada como um sólido branco em mistura, e apresenta sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  muito semelhantes às substâncias **1** e **2**.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30) observou-se a presença de seis metilas em  $\delta$  1,67 (H-20, 3H); 1,59 (H-19, 3H); 0,92 (H-16, 3H); 0,86 (H-17, 3H) e 0,84 (H-18, 3H); 0,91 (H-3', 3H), e dois átomos de hidrogênio ligados a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  5,33 (H-14; 1H) e  $\delta$  5,11 (H-10, 2H). Observa-se a presença de dois átomos de hidrogênio em  $\delta$  4,57 (H-15, 1H) ligado diretamente a um átomo de carbono carbinólico. Esses átomos de hidrogênio possuem correlação direta  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  (HSQC) (APÊNDICE 13, pág. 84) com os átomos de carbono em  $\delta$  23,41 (C-20); 16,02 (C-19); 19,71 (C-16); 22,70 (C-17); 19,75 (C-18); 16,02 (C-3'); 118,43 (C-14); 124,30 (C-10) e 61,44 (C-15),

respectivamente (Tabela 5).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) mostrou nove sinais de átomos de carbono metílenos, quatro metinos (dois  $\text{sp}^2$ , um em  $\delta$  118,43 e o outro em 124,30), e quatro átomos de carbono quaternário (uma carbonila em  $\delta$  173,30).

FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3.

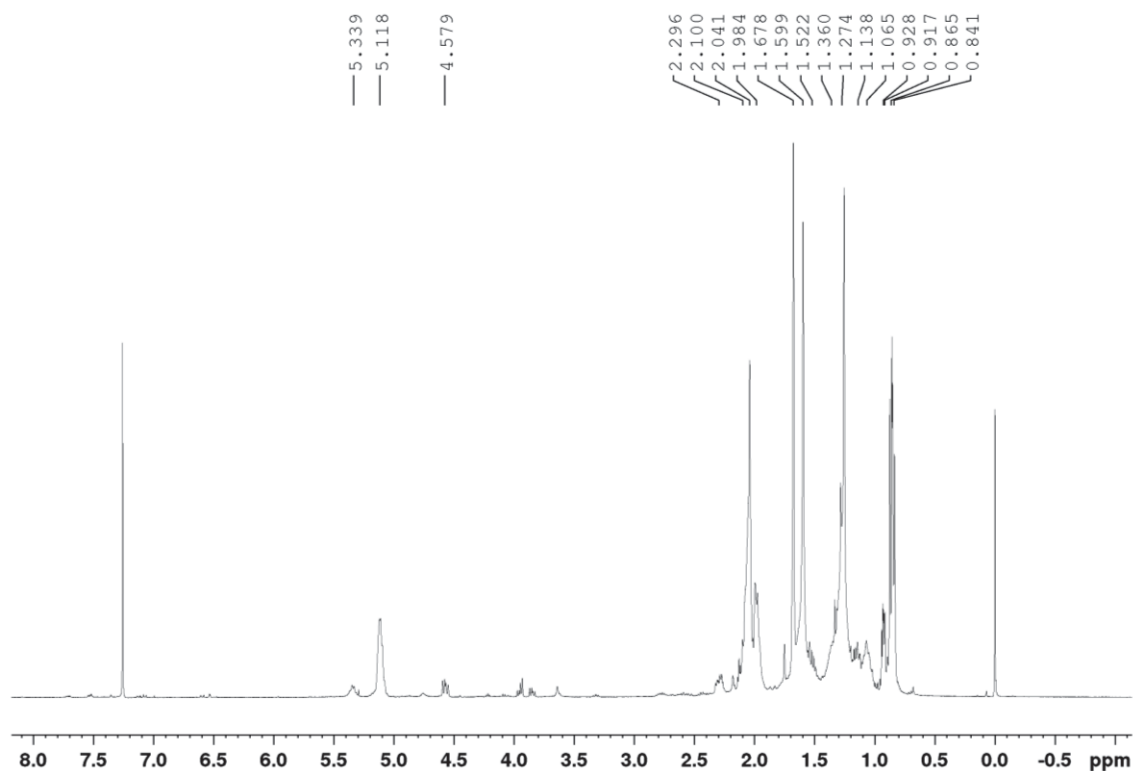
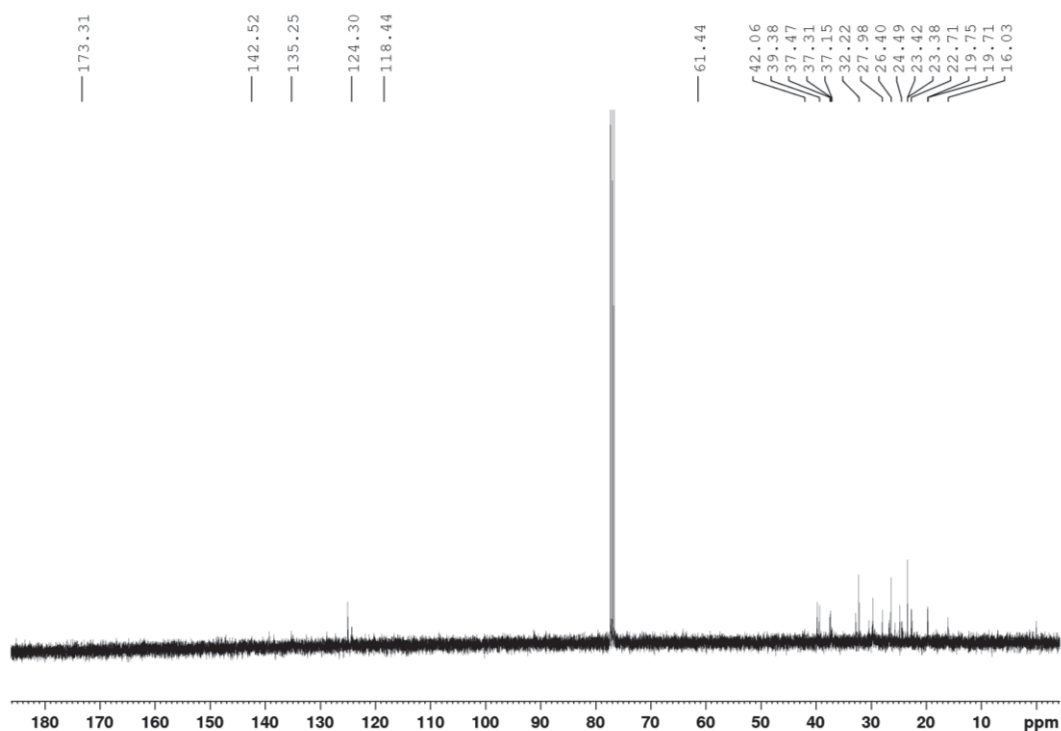
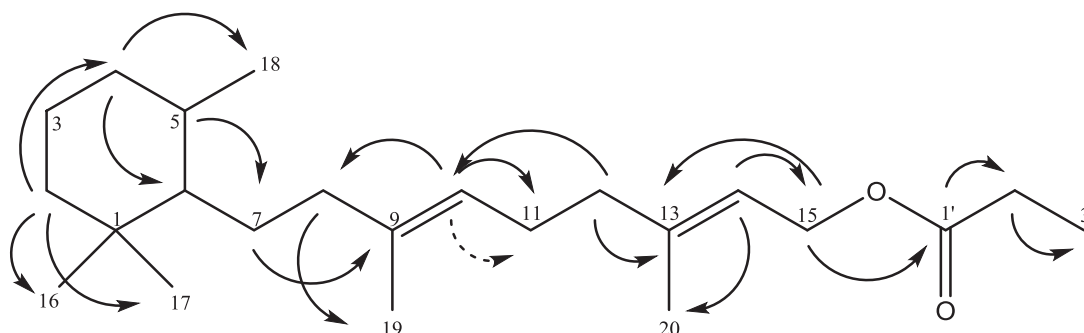


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3TABELA 5 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz), DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  E CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 3 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.

Substância 3			
Nº	$^1\text{H}$	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$	HMBC
1	-	37,30	-
2	1,13 (m)	39,38	3; 4; 16; 17
3	1,27 (m)	24,48	2; 6
4	1,27 (m)	37,47	5; 6; 18
5	1,52 (m)	27,98	3
6	1,36 (m)	32,21	4; 7; 18
7	1,67 (m)	23,38	9
8	1,27 (m)	37,15	7; 19
9	-	135,25	-
10	5,11(m)	124,30	8; 9;11
11	2,04 (m)	26,39	10
12	1,98 (m)	39,38	9; 10; 13
13	-	142,51	-
14	5,33 (m)	118,43	10; 15; 20
15	4,57 (m)	61,44	14; 13; 1' (C=O)
16	0,92 (m)	19,71	1; 2; 17
17	0,86 (m)	22,70	1; 2; 16
18	0,84 (m)	19,75	4;6
19	1,59 (m)	16,02	8; 9; 10
20	1,67 (m)	23,41	12; 14
1'	-	173,30	2'
2'	2,10 (m)	42,06	1'; 3'
	2,29 (m)		
3'	0,91 (m)	16,02	2'

As correlações de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE 14, pág. 85) H-14/C-12, H-15 /C-14, H-15/C-13, H-15/C-1' (C = O), H-12/C-10, H-10/C-11, nos permitem sugerir uma estrutura, a qual possui estereocentros em C-5 e C-6, e pelo experimento de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) (APÊNDICE 12, pág. 84) pode ser observado que o H-11 correlaciona com H-10, permitindo sugerir à posição da segunda ligação dupla na substância **3**.

FIGURA 32 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), E COSY (TRACEJADO) PARA A SUBSTÂNCIA **3**.



A definição da estrutura foi dificultada pela sobreposição dos sinais dos átomos de hidrogênios, não sendo possível a determinação das constantes de acoplamento.

A posição da segunda insaturação foi atribuída pelas correlações, no entanto, a presença de uma cadeia alifática grande favorece possível atribuição errada. Portanto, a substância **3** será submetida a reações de microderivatizações com dissulfeto de metila (DMDS).

A substância **4** (15,3 mg) foi isolada como sólida e branca, e sua identificação estrutural foi feita com base na análise de seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33) que mostra sinais em de seis metilas em  $\delta$  1,77 (H-20, 3H); 1,59 (H-19, 3H); 0,97 (H-16, 3H); 0,94 (H-5', 3H); 0,85 (H-18, 3H) e 0,82 (H-17, 3H), e dois átomos de hidrogênio ligados a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  5,35 (H-14; 1H) e  $\delta$  5,11 (H-10, 1H). Observa-se a presença de dois átomos de hidrogênio em  $\delta$  4,57 (H-15, 2H) ligados diretamente a um átomo de carbono carbinólico. Esses átomos de hidrogênio possuem correlação direta  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  (HSQC) (APÊNDICE 15, pág. 85) com os átomos de carbono em  $\delta$  16,30 (C-20); 15,15 (C-19); 21,00 (C-16); 18,72 (C-5'); 22,56 (C-18); 19,72 (C-17); 118,84 (C-14); 125,05 (C-10) e 60,69 (C-15), respectivamente (Tabela 6).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) mostrou onze sinais de átomos de carbono metilenos, quatro metinos (dois  $\text{sp}^2$ , um em  $\delta$  118,84 e o outro em 125,05), e quatro átomos de carbono quaternário (uma carbonila em  $\delta$  173,69).

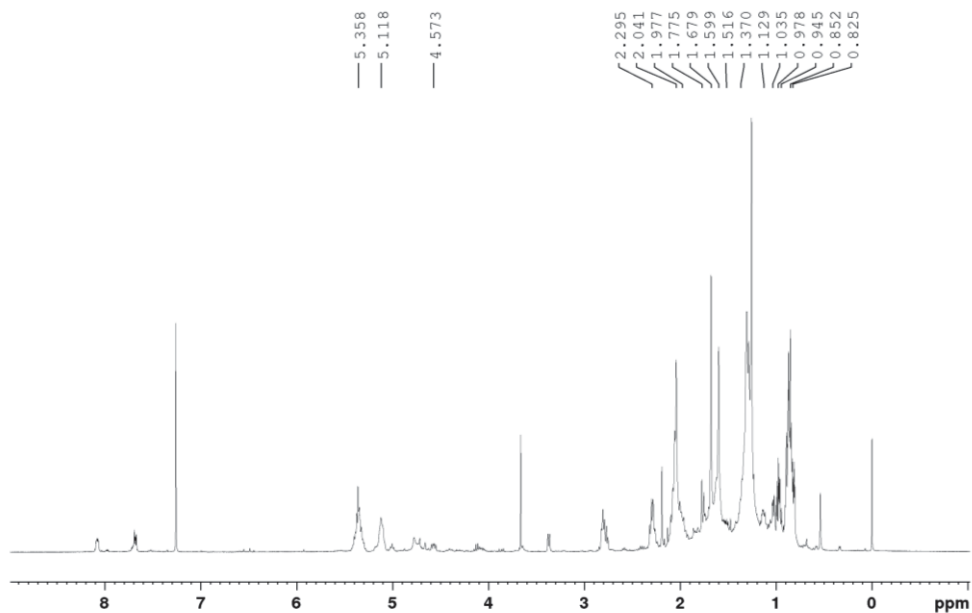
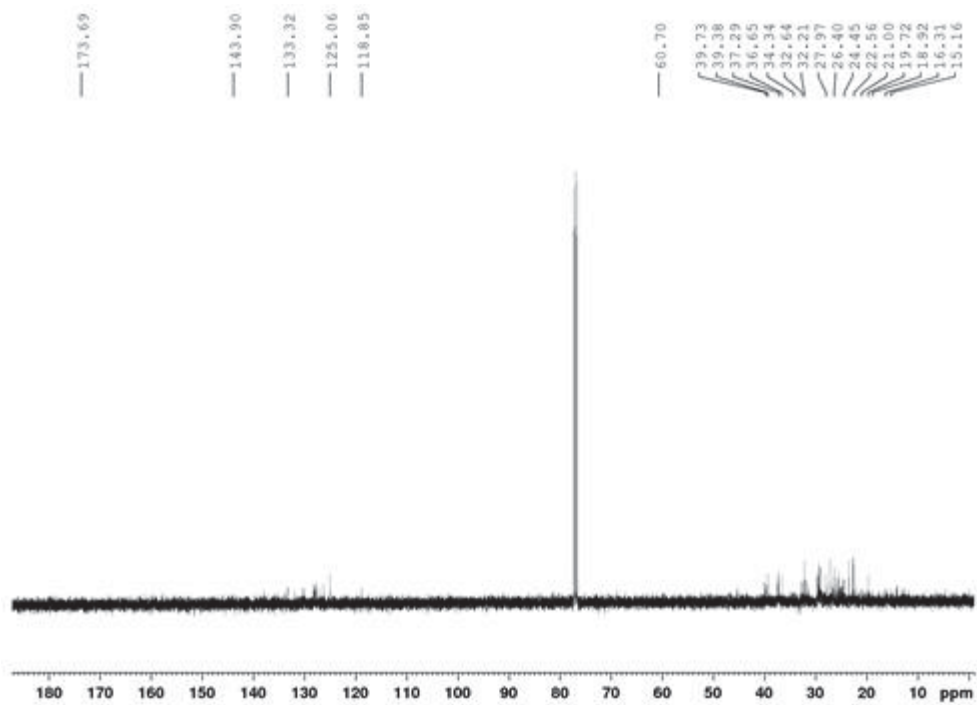
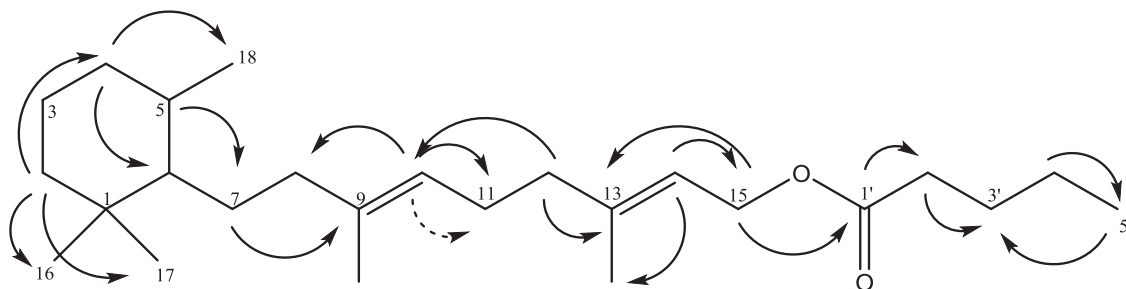
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.

TABELA 6 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz), DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz), HSQC CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  E CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 4 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.

Substância 4			
Nº	$^1\text{H}$	$^1J_{\text{H-C}}$	HMBC
1	-	36,65	-
2	1,12 (m)	39,38	3; 4; 16; 17
3	1,37 (m)	32,64	2; 6
4	1,03 (m)	37,29	5; 6; 18
5	1,51 (m)	27,96	3
6	2,04 (m)	32,21	4; 7; 18
7	1,67 (m)	24,45	9
8	1,12 (m)	39,38	7; 19
9	-	133,31	-
10	5,11(m)	125,05	8; 9;11
11	2,04 (m)	26,40	10
12	1,97 (m)	39,73	9; 10; 13
13	-	143,90	-
14	5,35 (m)	118,84	10; 15; 20
15	4,57 (m)	60,69	14; 13; 1' (C=O)
16	0,97 (m)	21,00	1; 2; 17
17	0,82 (m)	19,72	1; 2; 16
18	0,85 (m)	22,56	4;6
19	1,59 (m)	15,15	8; 9; 10
20	1,77 (m)	16,30	12; 14
1'	-	173,69	2'
2'	2,29 (m)	34,33	1'; 3, 4''
3'	1,51 (m)	27,96	2'; 5'
4'	1,67 (m)	24,45	5'
5'	0,94 (m)	18,72	3'

As correlações de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE 16, pág. 86) H-14/C-12, H-15 /C-14, H-15/C-13, H-15/C-1' (C = O), H-12/C-10, H-10/C-11, nos permitem sugerir uma estrutura, com estereocentros em C-5 e C-6, e se assemelha a estrutura proposta para a substância 3, diferenciando na cadeia após o grupo carbonila.

FIGURA 35 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS), E COSY (TRACEJADO) PARA A SUBSTÂNCIA 4.



Os sinais de hidrogênios estão sobrepostos dificultando determinar a multiplicidade e as constantes de acoplamento, isso porque a identificação está sendo

feita em mistura. Como no caso anterior, a substância **4** também precisará ser submetida a microderivatização para a determinação da posição da ligação dupla, como também a experimentos para a confirmação da estrutura proposta.

#### 4.5 Atividade Antimicrobiana

Os extratos de *E. plana* foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana. Para as atividades da concentração inibitória mínima e bactericida mínimas, foram avaliados 7 microrganismos.

A ação antimicrobiana de extratos é avaliada de acordo com a faixa de valores de CIM e CBM, sendo classificada quando inferior a 100 mg mL<sup>-1</sup> como promissora, moderada de 100 a 500 mg mL<sup>-1</sup>, de 500 a 1000 mg mL<sup>-1</sup> fraca e superiores a 1000 mg mL<sup>-1</sup> inativo (HOLETZ, et al., 2002; CHAVASCO et al., 2014).

Como resposta para as atividades microbiológicas, os maiores teores de inibição foram encontrados frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus*. É possível observar na Tabela 7 que em concentrações menores como 0,25 mg mL<sup>-1</sup> do extrato em éter de petróleo – verão, e 0,03125 mg mL<sup>-1</sup> do extrato em metanol – inverno, ocorreu a ação inibitória mínima, destacando assim a atividade bactericida do extrato de *E. plana*. Para a bactéria Gram-negativa *E. coli* foi necessário uma concentração maior (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) para sua inibição, comparado com as demais bactérias. Tal aumento na concentração do extrato se faz necessário, pois a atividade bactericida está ligada com a natureza da parede celular das bactérias.

Guimarães e colaboradores (2010), em seu estudo relatam que bactérias Gram-negativas são mais resistentes a metabólitos secundários, devido à existência da barreira lipídica que impede o acesso destes compostos a célula bacteriana. Porém, a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* se comportou diferentemente das demais, e sua ação inibitória pode estar relacionadas com o perfil fitoquímico, origem dos extratos e condições de crescimento (SANTOS; BLATT, 1998).

Para as bactérias *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *S. epidermidis* e para o fungo *C. albicans*, os extratos foram inativos nas concentrações testadas.

TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) PARA OS EXTRATOS DE *E. PLANA*.

Amostras	Microrganismo (mg mL <sup>-1</sup> )		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
V – EP	0,50	0,25	0,50
I – M	*	0,03125	*
Cloranfenicol (Padrão)	0,004	0,008	0,004

\*= CIM >2,0 mg mL<sup>-1</sup>, V = Verão; I = inverno; EP = éter de petróleo e M = metanol.

Para a atividade antimicrobiana – concentração mínima bactericida (CBM) somente *S. aureus* apresentou inibição com concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> no extrato em éter de petróleo – verão e metanol – inverno.

É possível observar que *S. aureus* teve maior inibição e com os menores teores de concentração, se mostrando mais sensível frente aos extratos testados.

Favaretto et al. (2016), estudando o extrato aquoso de *E. plana* demonstrou a baixa atividade antimicrobiana do mesmo, agindo apenas contra *S. epidermides*, *S. aureus* e *X. translucens* e o extrato da raiz apenas contra *S. epidermides*.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Os extratos brutos de *E. plana* Nees foram obtidos a partir da parte aérea por extração a frio com solventes de polaridades distintas, o que resultou em rendimentos diferentes com relação ao solvente de extração, sendo os extratos de metanol os que apresentaram maior rendimento.

A análise dos perfis dos extratos em éter de petróleo, acetato de etila e metanol nas quatro estações foram feitos utilizando as técnicas de RMN, IV e CLAE. Em todas as comparações se observa diferenças em relação ao solvente extrator e pelas análises quimiométricas (PCA), foi possível identificar os sinais, tanto no IV como em CLAE, responsáveis pela influência nos extratos.

A presença de ácidos graxos em todas as frações de todos os extratos dificultou o trabalho de isolamento e elucidação de substâncias puras. Pelas análises de RMN <sup>1</sup>H claramente se observou a presença de outras substâncias com características de terpenos, mas pela sobreposição e intensidade dos sinais referentes aos ácidos graxos, os sinais das substâncias de interesse apareciam muitas vezes como ruído da amostra.

Até o momento foram identificadas quatro substâncias do extrato em éter de petróleo - verão da parte aérea, diterpenos da classe dos ciclofitanos. Esta classe é rara na natureza e nunca descrita sua ocorrência no gênero *Eragrostis*.

Os extratos brutos da parte aérea, coletadas nas quatro estações do ano e obtidas com diferentes solventes foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana. O extrato em éter de petróleo - verão e o extrato em metanol - inverno, apresentaram atividade significativa contra os microrganismos *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli* ocorrendo a ação inibitória mínima, destacando assim a atividade bactericida do extrato de *E. plana*.

A parte aérea de *E. plana* tem demonstrado atividade alelopática, atividade antimicrobiana e a presença de ciclofitanos inéditos na literatura, compostos incomuns, que justificam seu estudo químico e sua continuação, para no futuro permitir sua aplicação nas áreas de interesse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIKUMAR, P. K.; TYO, K.; CARLSEN, S.; MUCHA, O.; PHON, T. H.; STEPHANOPOULOS, G. Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 167-190, 2008.
- ALENCAR, L.C.B. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais do Gênero *Spondias***. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, p.19, 2014.
- ALVES, M. da C. S.; MEDEIROS F. S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.11, p. 1083 – 1086, 2004.
- AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, 44(0): p. 452-458, 2013.
- BICAS, J. L.; FELIPE, L. O. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n° 2, p. 120-130, 2017.
- BITTENCOURT, H. V. H.; **Ecologia da germinação e potencial alelopático de capim-annoni-2 (*Eragrostis Plana* Nees)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, p. 174, 2017.
- BITTENCOURT, H. V. H.; TRESSI, M. M.; TEIXEIRA, S. D.; BONOME, L. da S.; VARGAS, A. G. de; FILHO, A. da S. S.; OLDONI, T. C. Chemical ecology of *Eragrostis plana* helps understanding of the species' invasiveness in an agroecosystem community. **Crop & Pasture Science**, v. 69, p. 1050-1060, 2018.
- BOECHAT, S. de C.; LONGHI-WAGNER, H. M. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Eragrostis* (Poaceae, Chloridoideae). **Revista Brasileira Botânica**, v.23, n.2, p.177 – 194, 2000.
- BOLIGON, A. A.; PIANA, M.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; DALMOLIN, T. V.; BONEZ, P. C.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; CAMPOS, M. M. A.; ATHAYDE, M. L. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 7-18, 2015.
- BORELLA, J.; WANDSCHEER, A. C. D.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, p. 260-265, 2009.
- BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, p. 214, 2006.
- BREGHENTI, A. M. Manual de identificação e manejo de plantas daninhas em cultivos de cana-de-açúcar. **Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite**, 1 ed., p.112, 2010.

BUCKINGHAM, J.B. Dictionary of Natural Products. **London: Chapman & Hall**, 1 ed., p. 210, 1994.

BUNN, C. W. Cristais: seu papel na natureza e na ciência. Tradução de William Gerson Rolim de Camargo. Título original: Crystals: Their role in nature and in science. SP: **Editora Nacional**, 3ª ed., p. 293, 1972.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, p. 94, 2008.

CARVALHO, L.B., **Plantas daninhas**. Editado pelo autor, Lages, SC, 1 ed. p. 28, 2013.

CARVALHO, C.C.R. de; FONSECA, M. M. R. da. ; Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 134–142, 2006.

CHATURVEDULA, V. S.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic Diterpenes from *Cassipourea madagascariensis* from the Madagascar Rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 69, p.287-289, 2006.

CHAVASCO, J. M.; PRADO E FELIPHE, B. H. M.; CERDEIRA, C. D.; LEANDRO, F. D.; COELHO, L. F. L.; SILVA, J. J. da; CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. T. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n.1, p.13-20, 2014.

CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. **Norma M7-A6**, 6 ed, v. 23, 2005.

COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim-annoni-2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 21 (3), p. 255. 263, 1986.

COHEN, M. L. Epidem iology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

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

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. 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.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2 ed, p.514, 2009.

FAVARETTO, A.; CANTRELL, C. L.; FRONCZEK, F. R.; DUKE, S. O.; WEDGE, D. E.; ALI, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M. New Phytotoxic Cassane-Like Diterpenoids from *Eragrostis plana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p.1973-1981, 2019.

FAVARETTO, A.; TONIAL, F.; BERTOL, C. D.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Antimicrobial activity of leaf and root extracts of tough lovegrass. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 4, p. 420-427, 2016.

FAVARETTO, A.; CHINI, S. O.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; SOBOTTKA, A. M.; BERTOL, C. D.; PEREZ, N. B. Pattern of allelochemical distribution in leaves and roots of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 11, p. 1119-1125, 2015.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; ZOCH, A. N.; CARNEIRO, C. M. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1168-1172, 2011.

FELIX, R. A. Z.; ONO, E. O.; ARAÚJO, F. P. Efeitos alelopáticos de extratos de *Amburana cearensis* na germinação de sementes de rabanete e alface. **Cultivando o Saber Cascavel**, v.3, n.1, p.18-31, 2010.

FERNANDES, L. A. V.; MIRANDA, D. L. C.; SAQUETTA, C. R. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (BERT) Kuntze. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 139-146, 2007.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. Edição especial, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B.; SOARES, G. L. G. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 43-50, 2008.

FIORENZA, M.; DOTTO, D. B.; BOLIGON, A. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; VESTENA, S. Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia, Série Botânica**, n. 71 (2), p. 193-200, 2016.

FILGUEIRAS, T. S.; CANTO-DOROW, T. S.; CARVALHO, M. L. S.; DÓREA, M. C.; FERREIRA, F. M.; MOTA, A. C.; OLIVEIRA, R. C. de; OLIVEIRA, R. P.; REIS, P. A.; RODRIGUES, R. S.; LONGUI-WAGNER, H. M.; SANTOS-GOLÇALVES, A. P.; SHIRASUNA, R. T.; SILVA, A. S.; SILVA, C.; VALLS, J. F. M.; VIANA, P. L.; WELKER, C. A. D.; ZANIN, A. **Poaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB193>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FOCHT, T. **Ecologia e dinâmica do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees), uma invasora dos campos sulinos: prevenção da sua expansão**. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 145, 2008.

FONTES, J. R. A.; SHIRATSUCHI, L. S.; NEVES, J. L.; JÚLIO, L. de; FILHO, J. S. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 1 ed, p. 48, 2013.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; PEREZ, N. B.; KALSING, A. Controle de capim-annoni (*Eragrostis plana*) com herbicidas pré-emergentes em associação com diferentes métodos de manejo do campo nativo. **Planta Daninha**, v.27, p.181-190, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-83582009000100023](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582009000100023)>. Acesso em: 15 jun. 2020.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. High resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & Technology**, n. 12, p. 328-338, 2001.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIMARÃES, P. Q. **Metodologia baseada em NIRS e quimiometria para a determinação de parâmetros de qualidade da quitosana para fins biomédicos**. Dissertação (Mestre em Química). Universidade Estadual da Paraíba, p. 77, 2017.

HENDGES, A. P. P. K. ; SANTOS, E. F. dos; TEIXEIRA, S.D.; SANTANA, F. S.; TREZZI, M. M.; BATISTA, A. N. L.; BATISTA, J. M.; LIMA, V. A. de; MARQUES, F. de A.; MAIA, B. H. L. N. S. Phytotoxic Neocassane Diterpenes from *Eragrostis plana*. **Journal of Natural Products**, v.83 , n. 12 , p. 3511-3518, 2020.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

INOUE M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 28, n.3, p.489-498, 2010.

KAWAKITA, K.; RODRIGUES, R. S.; FILGUEIRAS, T. S. Poaceae em uma planície de inundação no Brasil: listagem florística e novas ocorrências. **Hoehnea**, p. 203-216, 2016.

KLEIN, A. P. P. **Estudo fitoquímico das folhas de capimannoni-2 (*Eragrostis Plana* Nees) coletadas no inverno e verão**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, p. 105, 2015.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N. da; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, G.M.S.P.; SANTOS, A. S.; FILHO, A.P.da S. S. POTENCIAL ALELOPÁTICO DE CATEQUINAS DE *Tachigali myrmecophyla* (LEGUMINOSAE). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2 ed., p. 440, 1991.

- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de planta daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 7 ed., p. 383, 2014.
- MANTOVANI, D. ; PORCU, O. M. Avaliação fitoquímica do extrato de *Lippia Alba* para utilização como antioxidante natural em alimentos. **Revista Tecnológica**, v. 18, p. 69-74, 2009.
- MACIAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; OLIVERES-BASTIDAS, A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews** n. 7, p. 179-194, 2008.
- MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 6º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- MEDEIROS, R. B. de; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 13, n. 1-2, p. 105-114, 2007.
- MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils PF Colombian *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104 , n. 6, p. 878-884, 2009.
- MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO, B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 247-256, 2000.
- NISHIYA, K., KIMURA, T., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., LEE, S.R. Diterpenoids from *Eragrostis ferruginea*. **Phytochemistry**. n. 30, p. 2410-2411, 1991.
- OOTANI, M. 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.
- OLIVEIRA, J. S.; PEIXOTO, C. P.; POELKING, V. G. C.; ALMEIDA, A. T. Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizantha* e *Sorghum bicolor* com potencial alelopático para uso como herbicida natural. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 379-384, 2015.
- OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C.; SALES, G. W. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.2, p.511-523, 2016.
- PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZÉN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315-327, 2007.
- PARKER, T.; LIMER, E.; WATSON, A. D.; DEFERNEZ, M.; WILLIAMSON, D.;

KEMSLEY, E. K. 60 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 57, p. 147-158, 2014.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, Cengage Learning, 4 ed., p. 708, 2010.

PEREIRA, R. J. ; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PICCININI, F.; FRESCURA, V. D. S.; LAUNGHINGHOUSE I. V.; HAYWOOD, D.; PEREZ, N. B.; TEDESCO, S. B. Pollen viability of *Eragrostis plana* genotypes from different geographic populations in Rio Grande do Sul. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 8, n.15, p. 1316-1324, 2012.

PIEROZAN, M. K.; COSTA, R. J.; ANTUNES, O. A. C.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 57, p. 9716-9721, 2009.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; LOPES, B. M. POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Mimosa caesalpinhaefolia* Benth SOBRE SEMENTES DE *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p.130 - 136, 2001.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

QIAO, M.; YING, G-G.; SINGER, A. C.; ZHU, Y-G. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, v. 110, p. 160-172, 2018.

RAHMAN, A.UR.; AHMAD, V.U.  $^{13}\text{C}$ -RMN of Natural Products: Diterpenes. **Springer Science+Business Media, LLC** , University of Karachi – Pakistan, v. 2, p. 798, 1992.

REIS, J. C. L. Capimannoni-2: origem, morfologia, características, dissiminação. In: REUNIÃO REGIONAL DE AVALIAÇÃO DE PESQUISA COM ANNONI-2, 1991, Bagé. **Anais...Bagé**: EMBRAPA-CPPSUL, p. 5-23, 1993.

RICE, E. L. **Allelopathy**. New York: Academic Press. p. 422, 1984.

RIOS, J.L., RECIO, M.C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. **Journal of Ethno Pharmacology**. 100, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, N. C. **Alelopatia no manejo de plantas daninhas**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, p. 45, 2016.

RODRIGUES, J.N.; ANTON, C; GIOIELLI, L. A., Cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de milho. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.

ROSÁRIO, C. R.; KIPPER, L. M.; FERRÃO, M. 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. **Tecnológica**, v. 16, n. 1, p. 30-39, 2012.

SAAD, G.de A.; LÉDA, P. H. de O.; SÁ, I. M. de; SEIXLACK, A. C. de C. Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica. **Editora Guanabara Koogan**, 2 ed, p. 468, 2016.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84041998000200004>. Acesso em: 25 jun. 2020.

SCHNEIDER, A. A. A flora naturalizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil: herbáceas subespontâneas. **Biociências**, v. 15, n. 2, p. 257-268, 2007.

SEBASTIÃO, N'S. N.; FERNANDES, N.; VIEIRA, L.; MEDONÇA, A. J. G.; GASPARGASPAR, J. F.; MARTINS, C.; RUEFF, J.; DIAKANAMWA, C.; MENDONÇA, D. I. M. D. Three New Labdanes Isolated from *Eragrostis viscosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1940-1950, 2012.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Editora UFV, 1 ed. p. 367, 2007.

SILVA, F. A.; KOPP, W.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C. Otimização da produção de extrato bruto de mamona (*Ricinus communis* L.) contendo atividade lipolítica. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**, Florianópolis, SC, p. 8, 2014.

SILVA, M. G. F da. **Avaliação do potencial alelopático de raízes de capimannoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e estudo fitoquímico**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Pato Branco, p. 94, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6 ed. RJ: LTC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 1102, 2017.

SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. P. 83, 2008.

SOEIRO, B. T.; BOEN, T. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. 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, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio

e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SÚAREZ, M. L. S. **Estudio de productos antitumorales y toxinas polietéreas de origen marino**. Soportes Audiovisuales e Informáticos: serie tesis doctorales. Universidad de La Laguna, p.214, 1996/97.

TAM, N. T.; QUAN, T. D.; HAU, D. V.; ANH, N. T. H.; TRAN, T. T. T.; SA, N. H.; THIEN, D. D.; NHUNG, L. T. H.; PHONG, D. T.; ADORISIO, S.; DELFINO, D.V.; THUY, T.T. Anti-proliferative diterpenes from *Dacrycarpus imbricatus*. **Natural Product Research**. v. 23, p. 3357-3363, 2018.

TENÓRIO, M. A. L.dos S. **Análise quimiométrica do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (vell) bureau (bignoniaceae), com atividade inibidora da linfoproliferação, por ressonância magnética nuclear**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, p. 124, 2011.

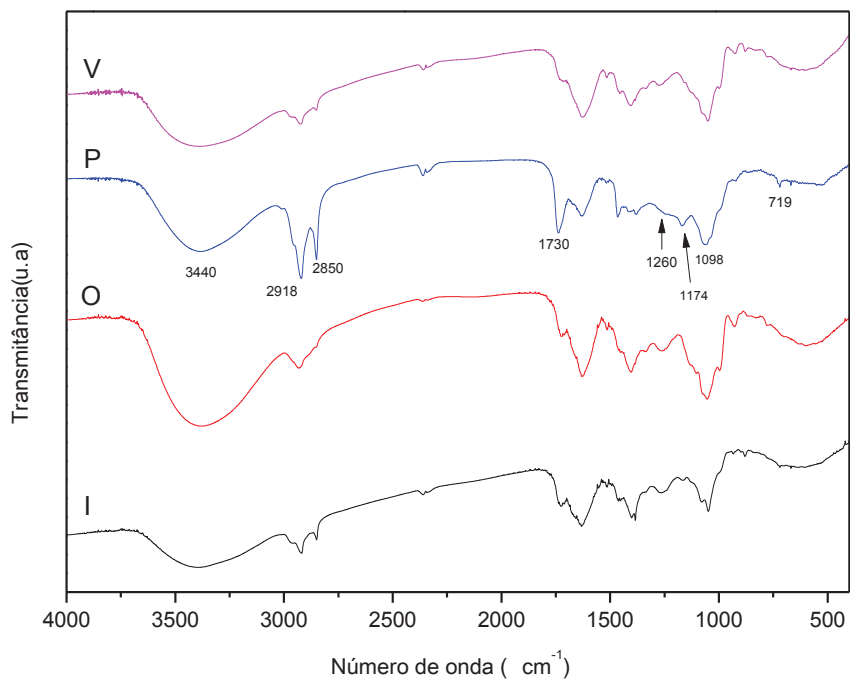
TREZZI, M. M., **Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 132, 2002.

XU, Gao-feng; ZHANG, Fu-dou; LI, Tian-lin; WU, Di; ZHANG, Yu-hua. Induced Effects of Exogenous Phenolic Acids on Allelopathy of a Wild Rice Accession (*Oryza longistaminata*, S37). **Rice Science**, v. 17(2), p.135-140, 2010.

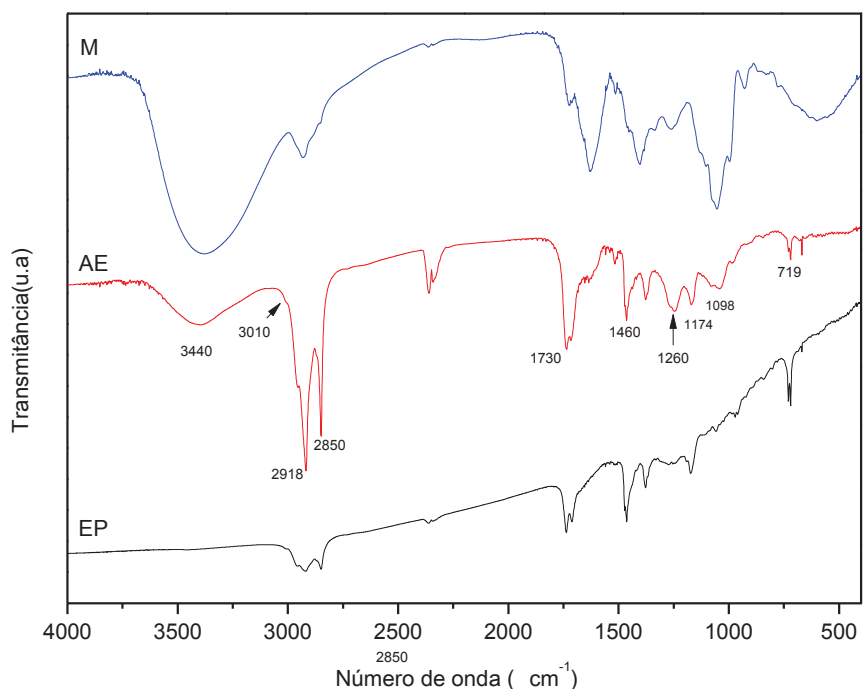
ZHANG, L.H. Quorum sensing and proactive host defense. **Trends in Plant Science**. 8: p. 238-244, 2003.

## APÊNDICE

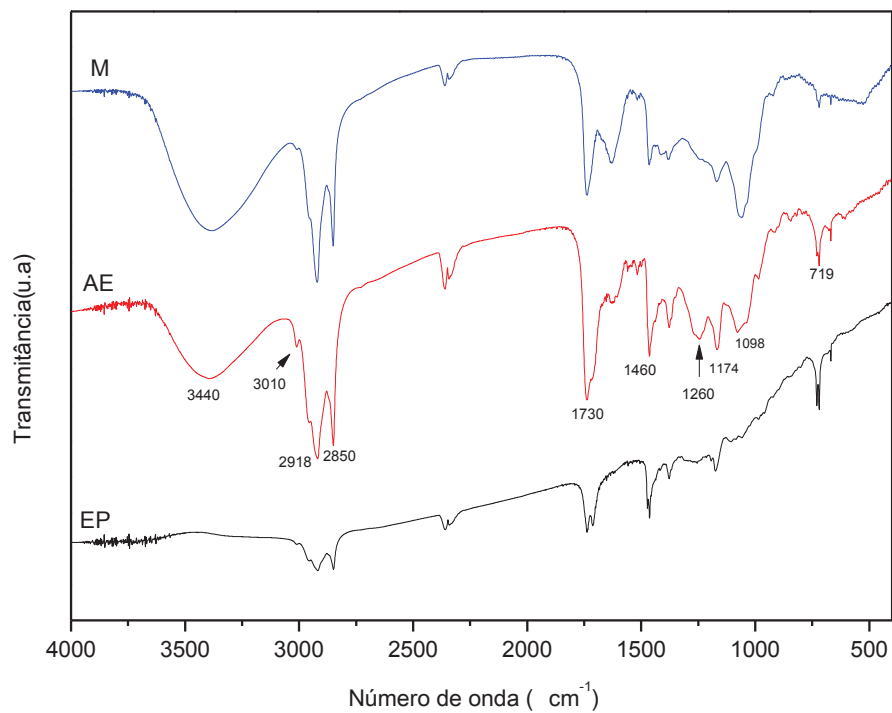
APÊNDICE 1 - Espectro no infravermelho dos extratos em **metanol** nas estações inverno (I), outono (O) primavera (P), e verão (V).



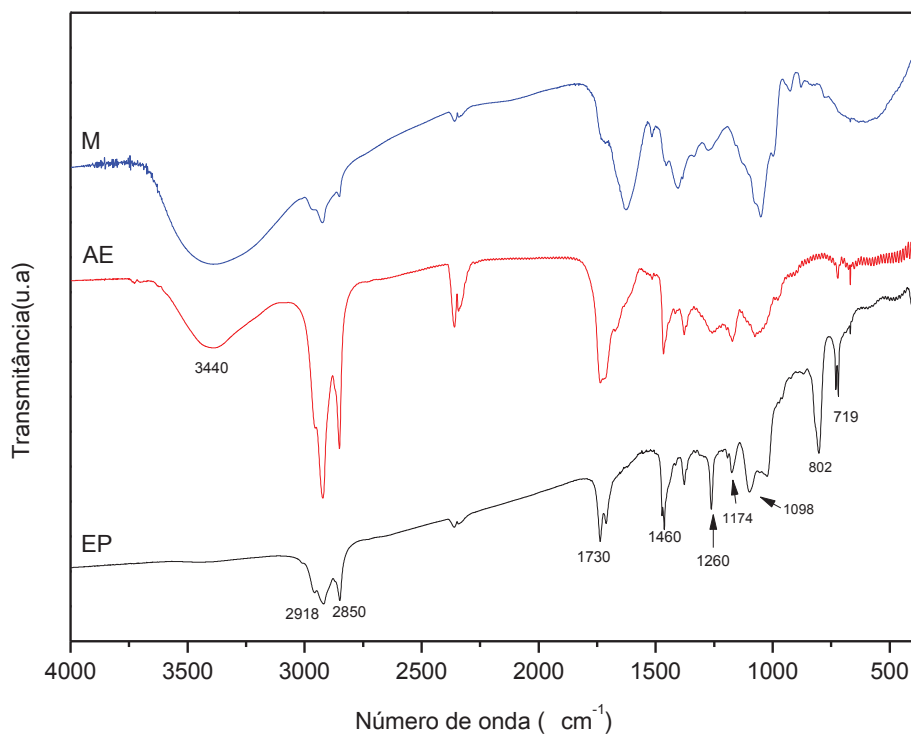
APÊNDICE 2 - Espectro no infravermelho dos extratos da parte aérea **outono** em éter de petróleo (EP), acetato de etila (AE) e metanol (M).



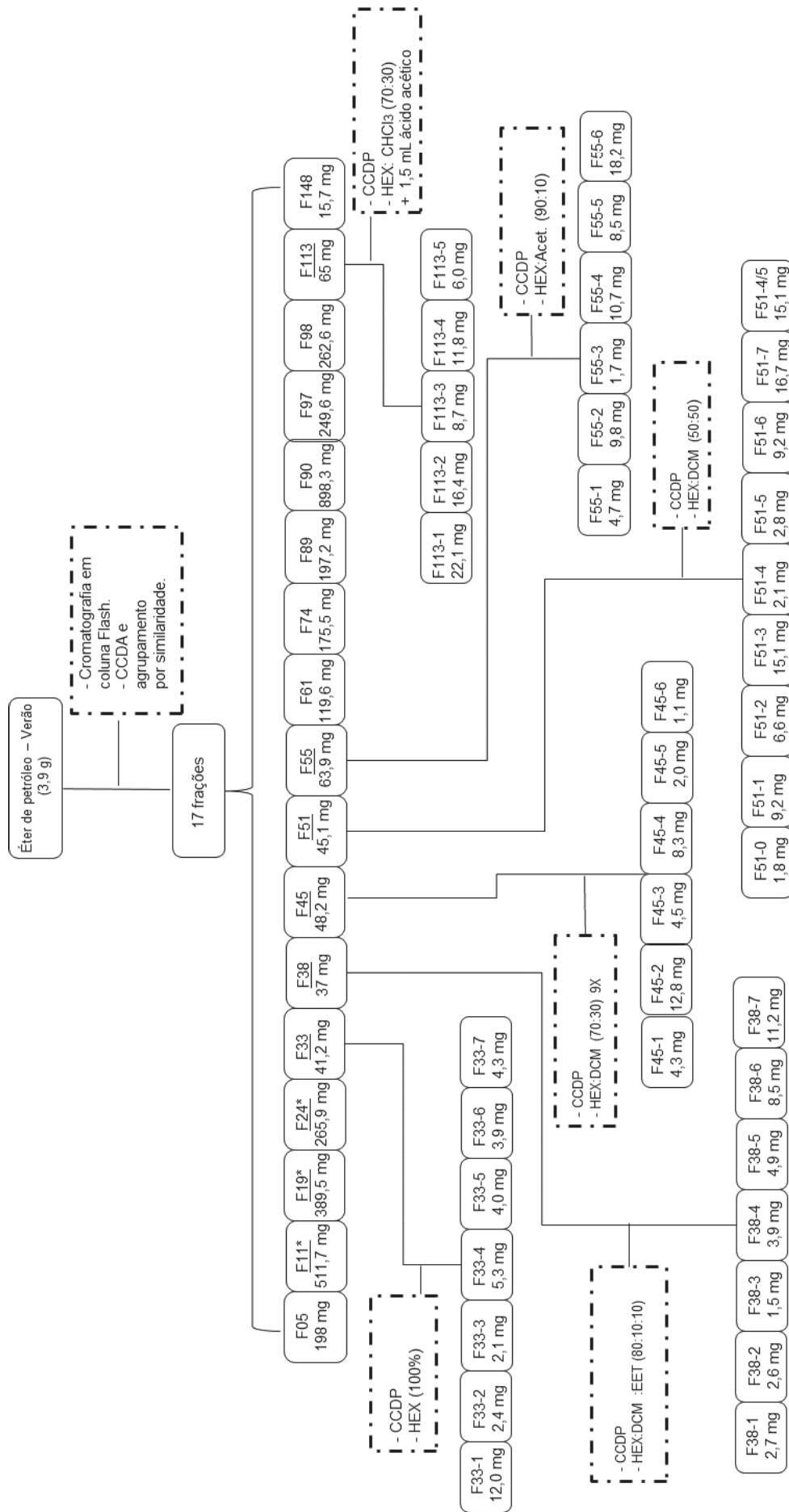
APÊNDICE 3 - Espectro no infravermelho dos extratos da parte aérea **primavera** em éter de petróleo (EP), acetato de etila (AE) e metanol (M).



APÊNDICE 4 - Espectro no infravermelho dos extratos da parte aérea **verão** em éter de petróleo (EP), acetato de etila (AE) e metanol (M).

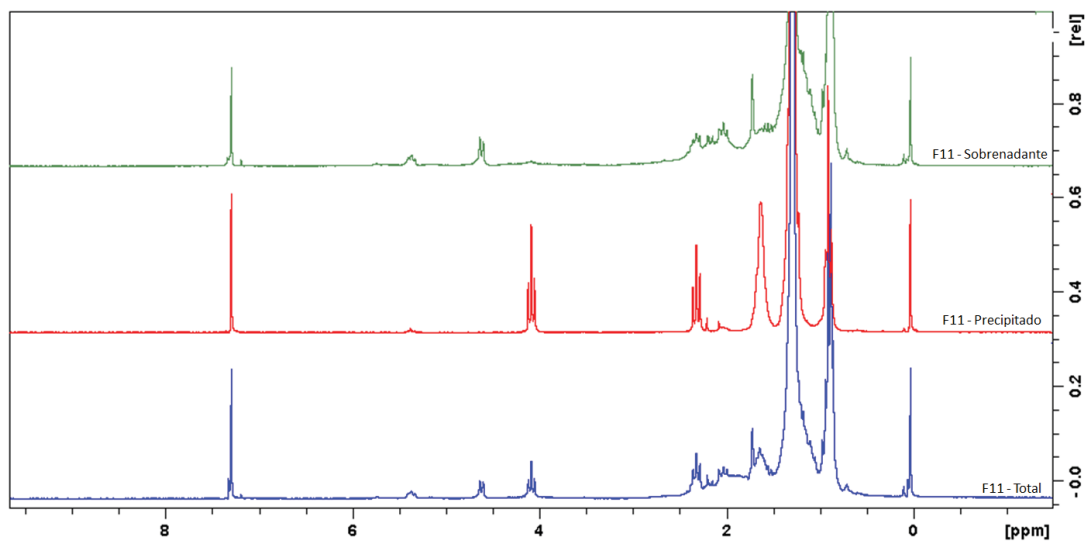


APÊNDICE 5 - Fluxograma da purificação do extrato em éter de petróleo verão

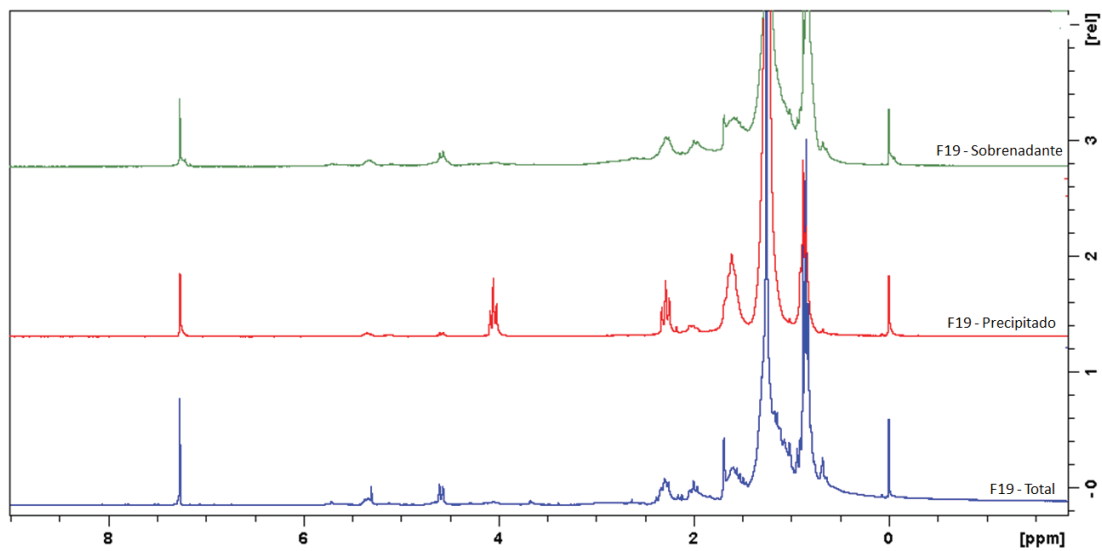


As frações sublinhadas foram purificadas e com asterisco originaram as substâncias identificadas.

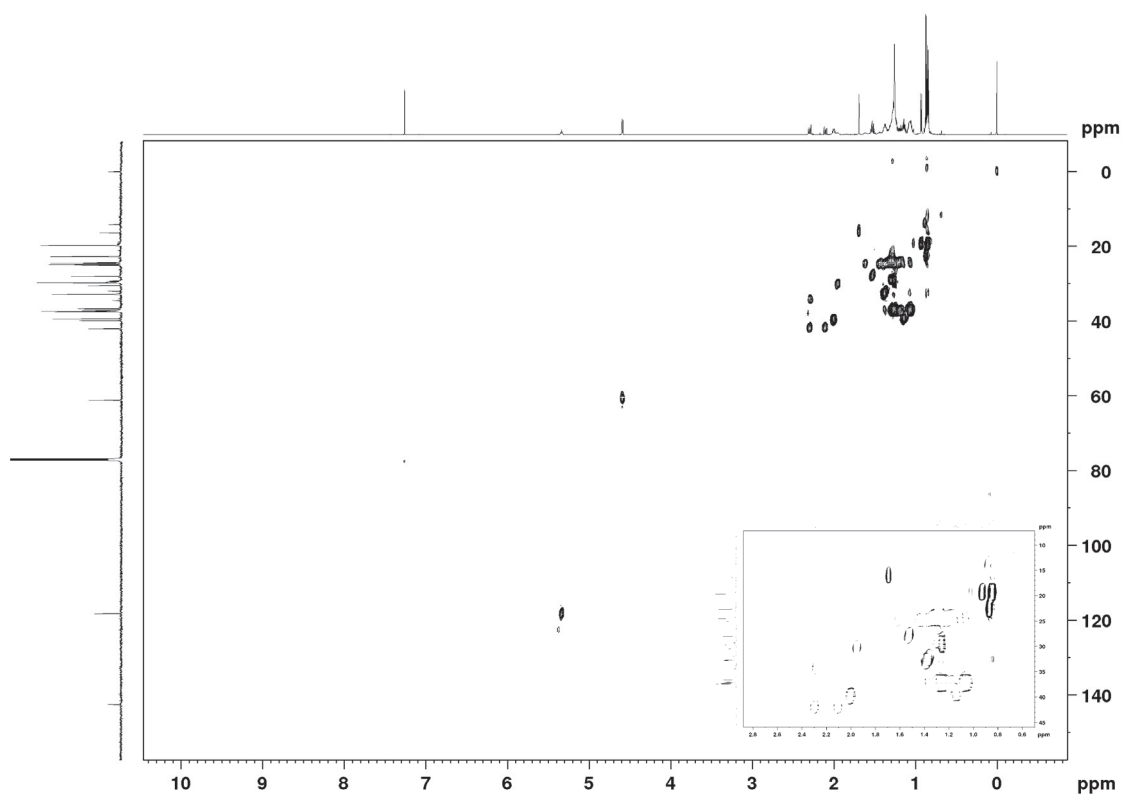
APÊNDICE 6 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da fração F11 após a última centrifugação a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



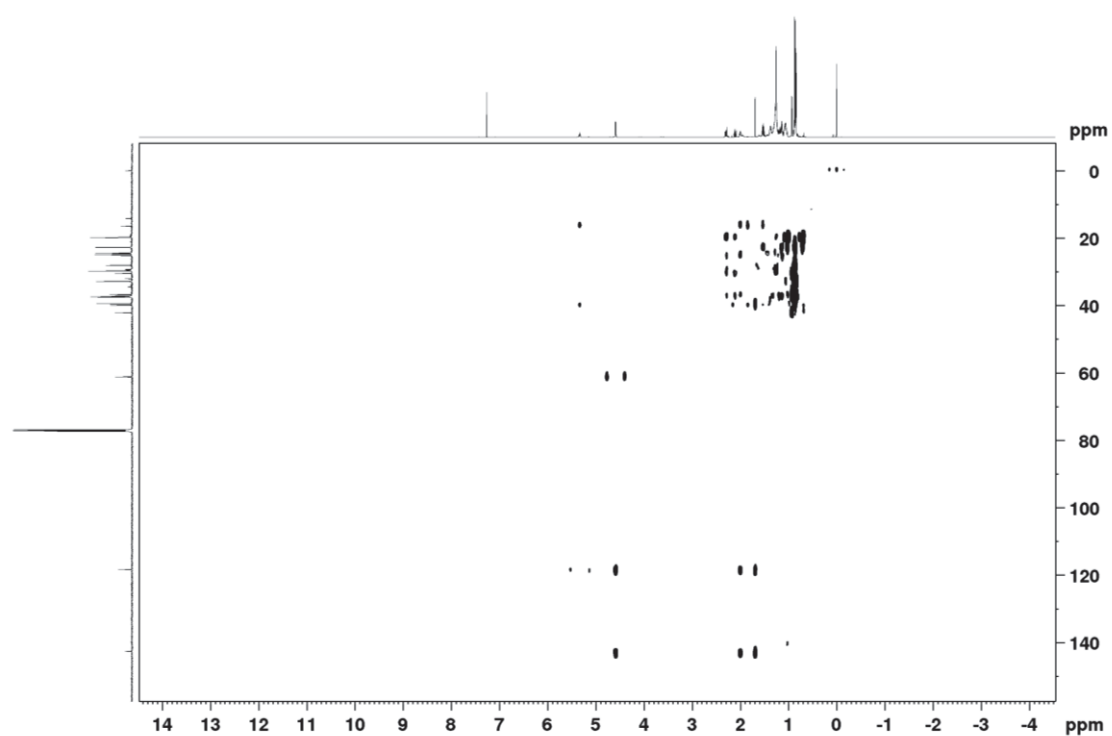
APÊNDICE 7 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da fração F19 após a última centrifugação a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



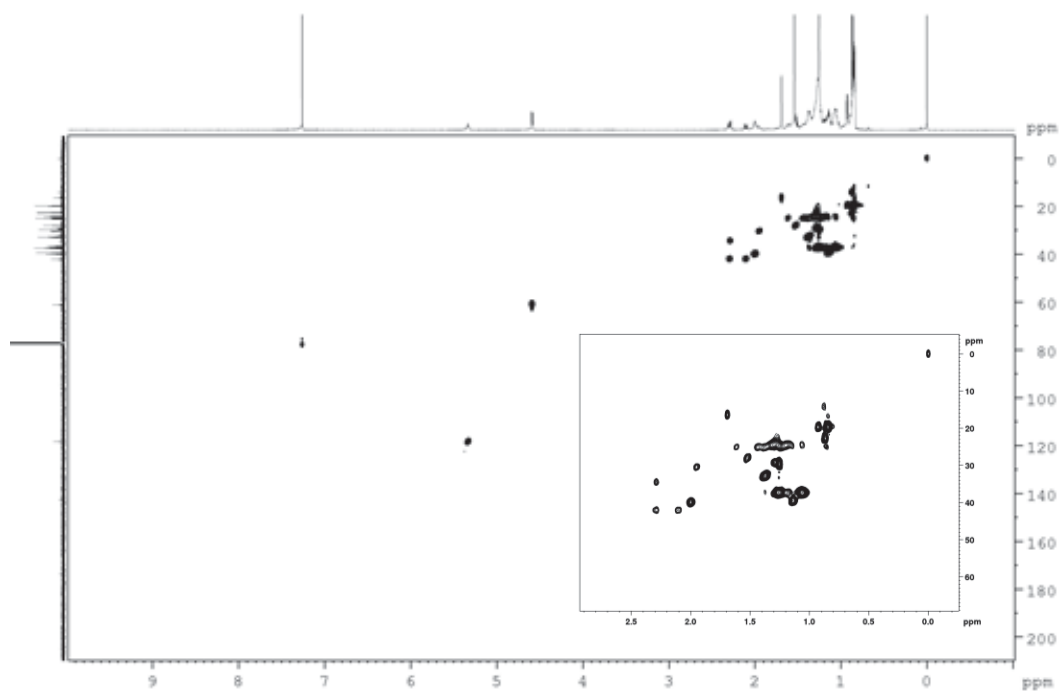
APÊNDICE 8 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 1



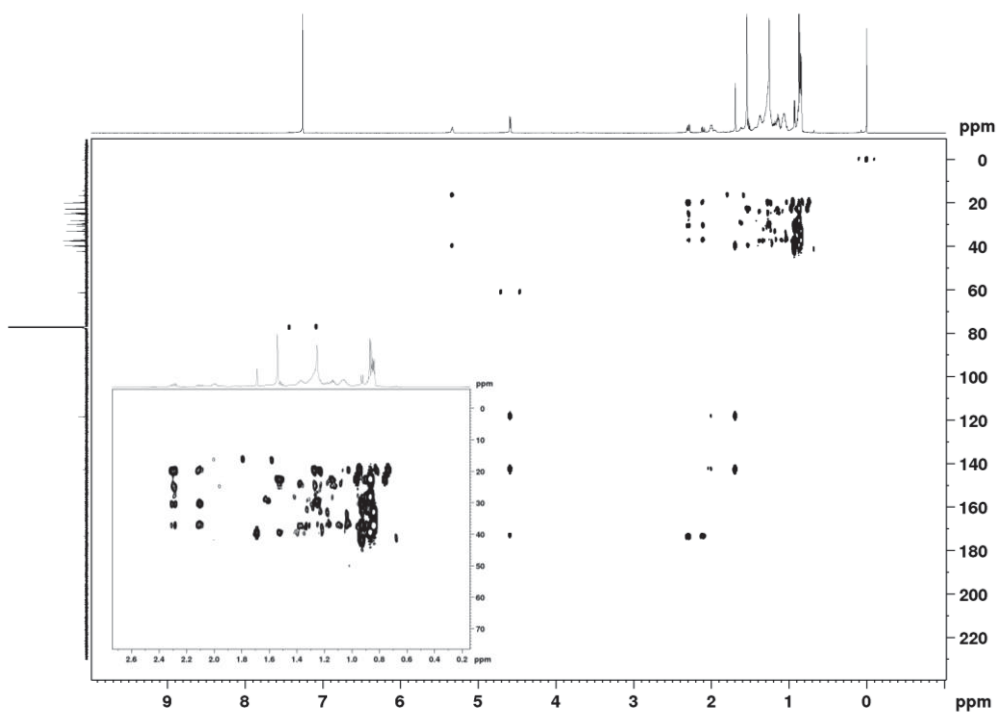
APÊNDICE 9 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 1

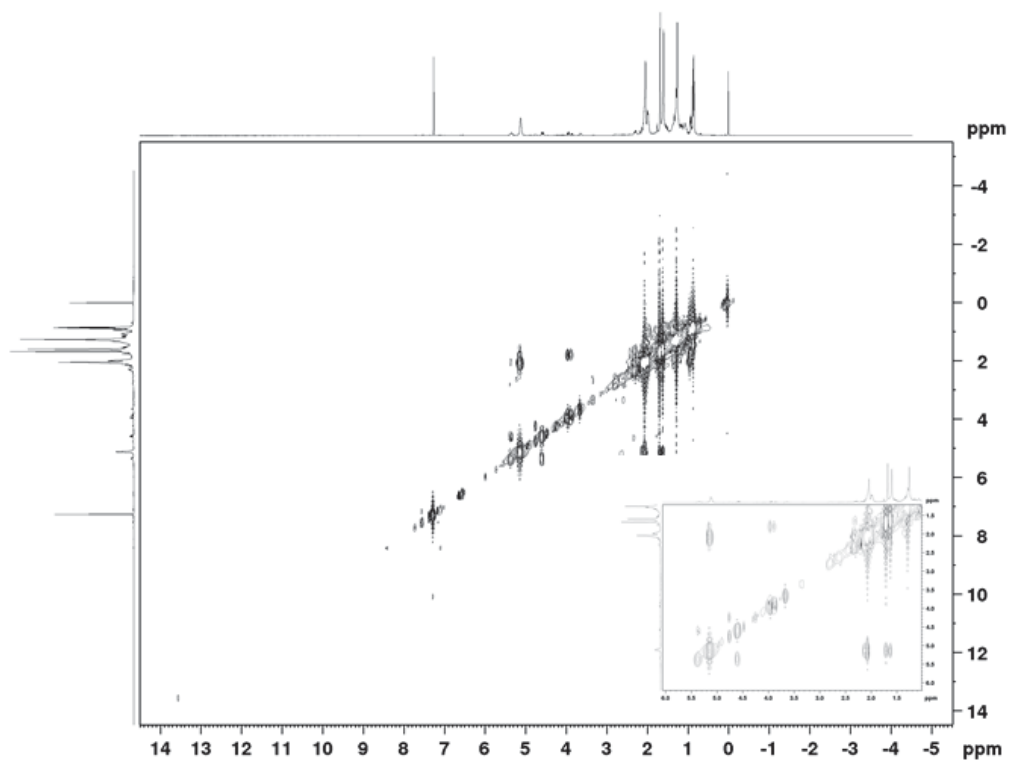
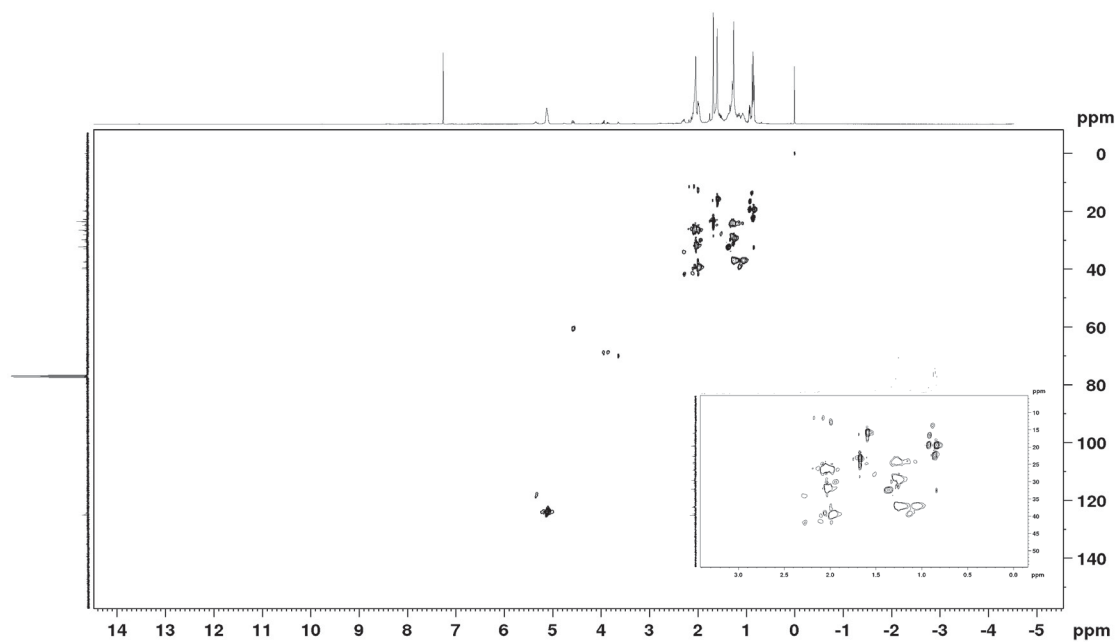


APÊNDICE 10 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 2.

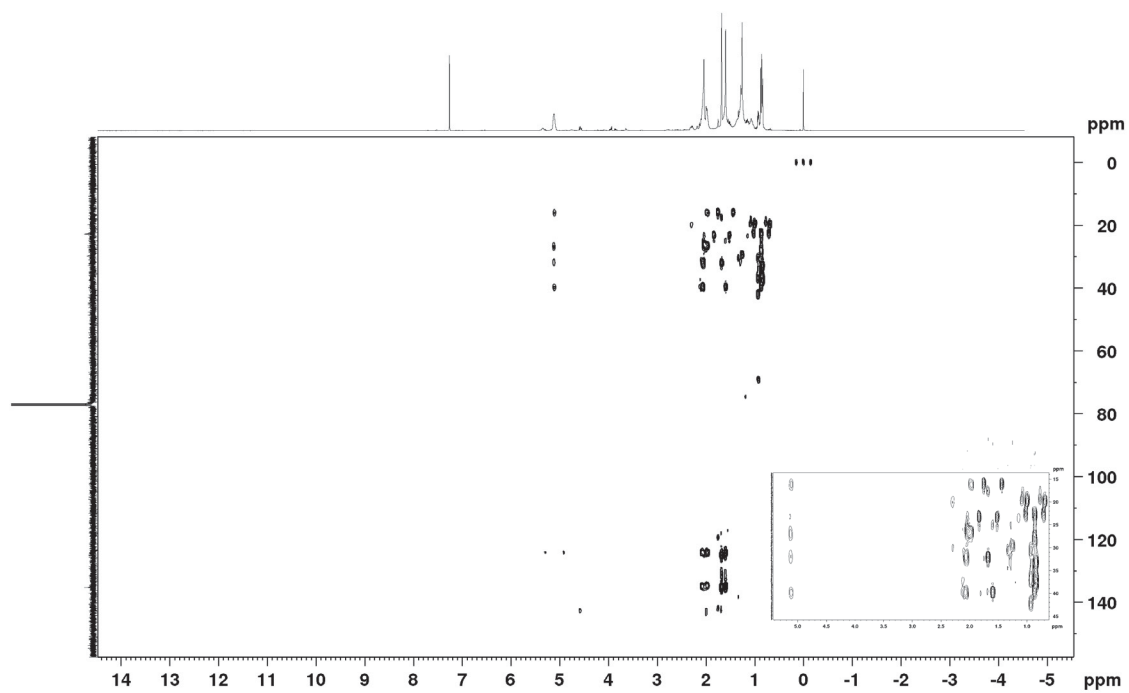


APÊNDICE 11- Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 2.

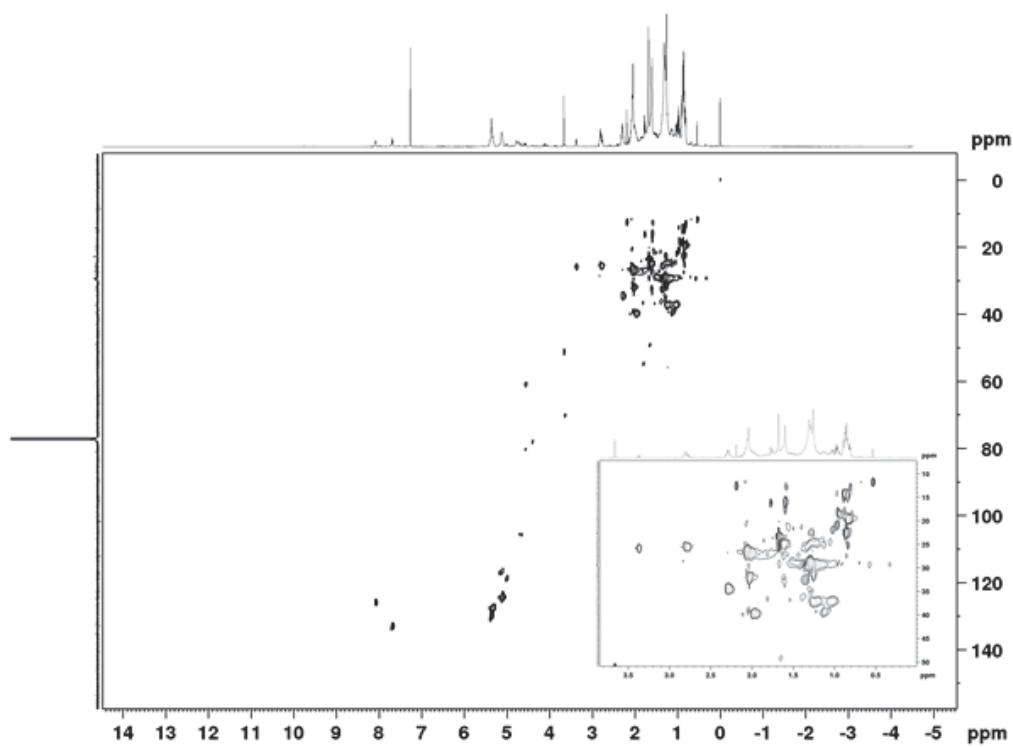


APÊNDICE 12 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância **3**.APÊNDICE 13 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância **3**.

APÊNDICE 14 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 3



APÊNDICE 15 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 4.



APÊNDICE 16 - Mapa de correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da Substância 4

