

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo do perfil químico de *Cyperus rotundus* e  
avaliação do seu potencial de absorção de metais”**

**Poliana Pereira de Souza\***

Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção  
do título de MESTRE EM QUÍMICA,  
área de concentração: QUÍMICA  
ORGÂNICA.

**Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

**\* bolsista: Vale e Fapespa**

**São Carlos – SP  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729e Souza, Poliana Pereira de  
Estudo do perfil químico de *Cyperus rotundus* e  
avaliação do seu potencial de absorção de metais /  
Poliana Pereira de Souza. -- São Carlos : UFSCar,  
2016.  
150 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Química orgânica. 2. *Cyperus rotundus*. 3.  
Ferramentas quimiométricas. I. Título.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

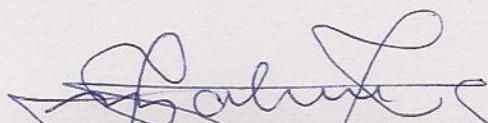
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

## Folha de Aprovação

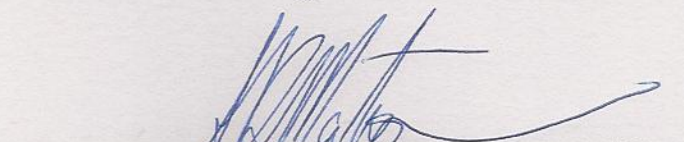
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Poliana Pereira de Souza, realizada em 27/07/2016:



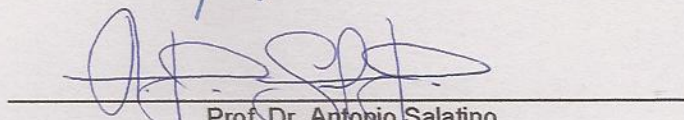
---

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva  
UFSCar



---

Profa. Dra. Andréia Pereira Matos  
UFSCar



---

Prof. Dr. Antonio Salatino  
USP

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

**Isaac Newton**



Dedico este trabalho à minha mãe Antonieta (*in memorian*), por ser a minha melhor amiga, doando quando em vida, tudo si em prol da minha formação pessoal e profissional, acolhendo-me sempre, nos seus braços protetores.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Dra. Maria F. das G. F. da Silva, por ter me aceitado como sua orientanda;

A todos os demais professores do DQ – UFSCar que colaboraram para a realização deste projeto;

Aos meus professores de graduação Marilene, Heloisy, Silmara e Joyce, os quais são minhas fontes de inspiração;

A todos os meus colegas de trabalho do laboratório do Laboratório de Produtos Naturais, em especial à Waléria, Eliane, Tatiane Albarici, Niculau, Barbara Sayuri, Buana, Renata e Ana Carolina por terem me ajudado com minhas análises e/ou em tantos momentos de dificuldades;

Às minhas amigas Edione e Thayana por sempre estarem comigo desde o início dessa jornada e por nunca desistirem de mim e do meu trabalho, quando ninguém acreditava, inclusive eu;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Sergio Thomasi, por sua disponibilidade e paciência e por me ajudar com algumas análises importantes e à Luciana Vizotto por sua amizade e pela realização de inúmeras análises no RMN – 600 MHz;

Ao Alex Virgilio do Laboratório GAIA – UFSCar por toda atenção e por ter me ajudado com as análises de determinação de metais;

A todos os membros da secretaria do DQ – UFSCar;

A todos os meus colegas dos DQ – UFSCar, pela torcida;

À toda a minha família, em especial à minha mãe adotiva Marlene Sá e minha irmã Natânia;

Ao meu eterno amigo Waldenir Bernini, por ser meu braço direito e fonte de aconchego;

Ao meu noivo Lucas por todo apoio, amor e companheirismo;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

À FAPESPA e à Vale pela bolsa concedida;

A todos, muito obrigada!

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> CN	Acetonitrila Deuterada
C.	<i>Cyperus</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DAD	<i>Diodo Arrange Detector</i>
DCM	Diclorometano
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
ESI	<i>Electonspray ionization</i>
eV	<i>Electron volt</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
MEOD	Metanol Deuterado
MHz	Mega hertz
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCs	<i>Principal Components</i>
ppm	partes por milhão
<i>m/z</i>	Relação massa/carga

RMN	Ressonância Magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
u.m.a.	Unidade de massa atômica
(1)	Planta contaminada por metais
(2)	Planta não contaminada por metais
UV	Ultravioleta
[ ]	Concentração
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
λ	Comprimento de onda μm micrômetro

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1.2.1.2 – Divisão da fitorremediação em fitorremediação direta e indireta.....	15
FLUXOGRAMA 3.5.1 – Obtenção dos extratos dos extratos etanólicos de <i>C. rotundus</i> .....	57
FLUXOGRAMA 3.5.2 – Metodologia utilizada para obtenção das frações de <i>C. rotundus</i> através de partições líquido-líquido dos extratos etanólicos.....	58

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.2.1.1.3 – Comparação entre os custos do tratamento de solos empregando diferentes técnicas de tratamento.....	10
FIGURA 1.2.1.2.6 – Mecanismos utilizados pelas plantas no processo de fitorremediação.....	18
FIGURA 1.5.1.1.1 – Flavonóides e estilbenos: ginkgetina (1), logusona A (2), quercetina-3-metiléter (3), 5,7,4',5'-tetrahidroxi-6,3'-diprenillflavanona (4), aureusidina (5), apegenina (6), logusol B (7) e pallidol (8). ....	27
FIGURA 1.5.1.1.2 – Terpenos: sesquiterpenos do tipo eudesmano (9) e (10), ciperolona (11).....	28
FIGURA 1.5.1.1.3 – Fenilpropanóides e ácidos fenólicos: ácido vanílico (12); ácido elágico(12); isoaragoside (a), chionoside A (b) e helioside C (c) (14). ....	29
FIGURA 1.5.1.1.4 – Quinonas: dihidrociperaquinona (15), ciperaquinona (16), hidroxiciperaquinona (17), scabiquinone (18), hidroxidietrichequinona (19) e alopecuquinone (20).....	30
FIGURA 1.5.1.1.5 – Cumarinas: pimpinelina (21); bergapteno (22), escopoletina (23). 30	
FIGURA 1.5.1.2 – <i>Cyperus rotundus</i> L.....	31

FIGURA 1.5.1.2.1 – Tubérculos de <i>Cyperus rotundus</i> L. ....	32
FIGURA 1.7– Esquema simplificado para uma análise de <i>fingerprinting</i> . ....	38
FIGURA 1.8.1 – Um exemplo simples de gráficos de (A) <i>scores</i> e (B) <i>loadings</i> . O gráfico de <i>scores</i> mostra dois grupos de amostras e uma anômala ( <i>outlier</i> ). No gráfico de <i>loadings</i> pode-se ver que a variável <i>a</i> é importante para a discriminação das amostras localizadas no canto direito superior do gráfico de <i>scores</i> ; as variáveis <i>d</i> , <i>e</i> e <i>f</i> são características para as amostras no canto inferior esquerdo; já as variáveis <i>b</i> e <i>c</i> estão próximas a origem do gráfico de <i>loadings</i> e, portanto, têm uma pequena influencia na discriminação.....	42
FIGURA 1.9.1 – Representação esquemática de HPLC-DAD-SPE-NMR adotada a partir do website da Bruker Biospin GmbH. ....	42
FIGURA 1.9.2 – Princípios de HPLC-SPE-RMN. Os compostos eluídos a partir da coluna cromatográfica são dirigidos para cartuchos de SPE individuais e em sequência eluídas na sonda de fluxo RMN. Em alternativa, o fluido SPE pode ser recolhido em microtubos de RMN. ....	43
FIGURA 3.4.2 – Teste de determinação de metais por ICP-AES.....	55
FIGURA 3.6.1.1 – Amostras das frações FAcOEt e FHid de <i>C. rotundus</i> , para análise de <i>fingerprint</i> por RMN. ....	61
FIGURA 3.6.1.2 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H da fração FAcOEtR de <i>C. rotundus</i> . Sequência com supressão do sinal da água NOESYGPPR1D, ns = 64. ....	62
FIGURA 3.6.1.3 – Regiões do espectro de RMN <sup>1</sup> H excluídas no tratamento quimiométrico. (a) Exclusão da região sem sinal da amostra (b) do sinal do solvente MeOD e (c) pré-saturação do sinal do HDO do solvente. ....	63
FIGURA 4.1.1 – Cromatograma HPLC-UV das frações líquido-líquido: a) FAcOEtR (1) e (2) b) FAcOEtPAV (1) e (2) e c) das FAcOEtPAR (1) e (2). ....	78
FIGURA 4.2.1.1.1 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN das frações FH sobrepostas de <i>C. rotundus</i> .....	79
FIGURA 4.2.1.1.2 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FHR de <i>C. rotundus</i> , região ampliada δ 8,0 a 2,5. ....	80
FIGURA 4.2.1.1.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FHPAV de <i>C. rotundus</i> , região ampliada δ 7,45 a 7,70. ....	81

FIGURA 4.2.1.1.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das FHPAR de <i>C. rotundus</i> , região ampliada δ 8,0 a 2,5.....	82
FIGURA 4.2.1.2.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FDCM sobrepostas de <i>C. rotundus</i> .....	84
FIGURA 4.2.1.2.2 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FDCMR de <i>C. rotundus</i> , região ampliada δ 2,8 – 1,0. ....	85
FIGURA 4.2.1.2.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FDCMPAV de <i>C. rotundus</i> ..	86
FIGURA 4.2.1.2.4 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FDCMPAR de <i>C. rotundus</i> .	87
FIGURA 4.2.1.3.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FAcOEt sobrepostas de <i>C. rotundus</i> .....	88
FIGURA 4.2.1.3.2 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FAcOEtR de <i>C. rotundus</i> ....	90
FIGURA 4.2.1.3.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FAcOEtR de <i>C. rotundus</i> , regiões ampliadas. ....	90
FIGURA 4.2.1.3.4 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtR de <i>C. rotundus</i> por <sup>1</sup> H RMN (99,74 % variância total).....	92
FIGURA 4.2.1.3.5 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtR de <i>C. rotundus</i> por <sup>1</sup> H RMN. ....	93
FIGURA 4.2.1.3.6 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> , regiões ampliadas. ....	94
FIGURA 4.2.1.3.7 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> por <sup>1</sup> H RMN (99,90 % variância total).....	95
FIGURA 4.2.1.3.8 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> por <sup>1</sup> H RMN. ....	96
FIGURA 4.2.1.3.9 – Sinais caracterizados por RMN 1D nas frações FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> .....	97
FIGURA 4.2.1.3.10 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H das frações FAcOEtPAR de <i>C. rotundus</i> .....	99
FIGURA 4.2.1.3.11 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAR de <i>C. rotundus</i> por <sup>1</sup> H RMN (99,96 % variância total).....	100



FIGURA 4.2.1.3.12 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAR de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN.....	101
FIGURA 4.2.1.4.1 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ das frações FHid (1) de <i>C. rotundus</i> . ...	102
FIGURA 4.2.1.4.2 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ das frações FHid (2) de <i>C. rotundus</i> . ...	103
FIGURA 4.2.1.4.3 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ das frações FHidR de <i>C. rotundus</i> . .....	104
FIGURA 4.2.1.4.4 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FHidR de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN (99,95 % variância total).....	105
FIGURA 4.2.1.4.5 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FHidR de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN. ....	106
FIGURA 4.2.1.4.6 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ das frações FHidPAV de <i>C. rotundus</i> . .	107
FIGURA 4.2.1.4.7 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FHidPAV de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN (99,19 % variância total).....	108
FIGURA 4.2.1.4.8 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FHidPAV de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN. ....	109
FIGURA 4.2.1.4.9 – Espectro de NMR $^1\text{H}$ das frações FHidPAR de <i>C. rotundus</i> ...	110
FIGURA 4.2.1.4.10 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) das frações FHidPAR de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN (99,90 % variância total).....	111
FIGURA 4.2.1.4.11 – Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) das frações FHidPAR de <i>C. rotundus</i> por $^1\text{H}$ RMN. ....	112
FIGURA 4.2.1.4.12 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ fração hidroalcóolica dos rizomas não contaminadas – FHidR (1) – de <i>C. rotundus</i> . ....	113
FIGURA 4.2.2.1 – Cromatograma DAD para o cromatograma do perfil químico de uma das frações FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> .....	114
FIGURA 4.2.2.2 – Cromatograma obtido por HPLC-UV-SPE-NMR das frações FAcOEtPAV (1) e (2), respectivamente, da espécie <i>C. rotundus</i> . ....	115
FIGURA 4.2.2.1.1 – Ácido <i>trans</i> -cafeico (P-1).....	116
FIGURA 4.2.2.1.2 – Ácido <i>trans</i> -ferúlico (P-2).....	116
FIGURA 4.2.2.1.3 – Ácido <i>p</i> -cumárico (P-5).....	116
FIGURA 4.2.2.1.4 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ do fenilpropanóide P-1 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz).....	118

FIGURA 4.2.2.1.5 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-1 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	119
FIGURA 4.2.2.1.6 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-1 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	119
FIGURA 4.2.2.1.7 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-1.....	120
FIGURA 4.2.2.1.8 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do fenilpropanóide P-2 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	122
FIGURA 4.2.2.1.9 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-2 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	123
FIGURA 4.2.1.1.10 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-2 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	123
FIGURA 4.2.2.1.11 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-5.....	124
FIGURA 4.2.2.1.12 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do fenilpropanóide P-5 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	126
FIGURA 4.2.2.1.13 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-5 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	127
FIGURA 4.2.1.1.14 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-5 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	127
FIGURA 4.2.2.1.15 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-5.....	128
FIGURA 4.2.2.2.1 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da flavona P-6 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).....	131
FIGURA 4.2.2.2.2 – Mapa de contorno HSQC da flavona P-6 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).132	
FIGURA 4.2.2.2.3 – Mapa de contorno HMBC da flavona P-6 (CD <sub>3</sub> CN, 600 MHz).132	
FIGURA 4.2.2.2.4 – Espectro de massas da flavona P-6.....	133
FIGURA 4.2.2.2.5 – Lutelina-7-O-β- glicuronídeo (P-6).....	133

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.2.1.1 – Relação entre contaminantes e espécies de microrganismos. ...	07
TABELA 1.2.1.1.3 – Vantagens e desvantagens da biorremediação. ....	11
TABELA 1.2.1.2.1 – Alvos da fitorremediação.....	12
TABELA 1.2.1.2.2 – Valores despendidos no mercado referente à fitorremediação durante o ano de 1999 em diversos países.....	13
TABELA 1.2.1.2.3 – Relação técnicas de fitorremediação x contaminantes. ....	14
TABELA 1.2.1.2.7.1 – Custo da extração de metais por fitorremediação comparado a outras possíveis alternativas tecnológicas. ....	19
TABELA 1.2.1.2.7.2 – Vantagens e desvantagens da fitorremediação. ....	20
TABELA 1.5.1.2.2 – Compostos representantes das principais classes de compostos isolados a partir de <i>C. rotundus</i> .....	34
TABELA 3.3 – Coleta do material botânico. ....	53
TABELA 3.4.1 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão de amostras de <i>C. rotundus</i> .....	54
TABELA 3.4.2. – Os parâmetros instrumentais empregados nas determinações de metais em amostras de <i>C. rotundus</i> .....	56
TABELA 3.5.2 – Massas das frações dos extratos etanólicos de <i>C. rotundus</i> .....59	
TABELA 3.6.1 – Concentrações das amostras para análise de <i>fingerprint</i> e quimiometria por RMN.....	60
TABELA 3.6.2.1 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H <sub>2</sub> O; linha B: ACN) das frações FAcOEtR (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> . ....	65
TABELA 3.6.2.2 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H <sub>2</sub> O; linha B: ACN) das frações FAcOEtPAV (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> .....	66
TABELA 3.6.2.3 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H <sub>2</sub> O; linha B: ACN) das frações, FAcOEtPAR (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> .....	66
TABELA 3.6.3 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H <sub>2</sub> O; linha B: ACN) das frações FAcOEtPAV (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> .....	67

TABELA 3.6.4 – Parâmetros para obtenção dos espectros de massas dos compostos extraídos das FAcOEtPAV de <i>C. rotundus</i> .....	70
TABELA 4.1.1 – Testes de determinação de metais nos rizomas (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> , realizados por ICP-AES.....	74
TABELA 4.1.2 – Testes de determinação de metais nas partes aéreas vegetativas (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> , realizados por ICP-AES.....	75
TABELA 4.1.3 – Testes de determinação de metais nas partes aéreas reprodutivas (1) e (2) de <i>C. rotundus</i> , realizados por ICP-AES.....	76
TABELA 4.2.1 – Metabólitos determinados nas diferentes frações de <i>C. rotundus</i> .....	113
TABELA 4.2.2.1.1 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o fenilpropanóide P-1 em comparação com a literatura. ....	117
TABELA 4.2.2.1.2 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o fenilpropanóide P-2 em comparação com a literatura. ....	121
TABELA 4.2.2.1.3 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o fenilpropanóide P-5 em comparação com a literatura. ....	125
TABELA 4.2.2.2 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da flavona P6. ....	130

## RESUMO

“ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE *Cyperus rotundus* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE ABSORÇÃO DE METAIS”. O presente trabalho descreve o estudo comparativo da variação dos perfis químicos de plantas da espécie *Cyperus rotundus* – em que uma foi coletada na área de rejeito da empresa VALE na Mina do Sossego em Canaã dos Carajás (área contaminada por metais), frente à mesma espécie coletada em uma área adjacente à Mina do Sossego (área não contaminada por metais pesados) – através do desenvolvimento de métodos analíticos como HPLC-UV, RMN, LC-UVSPE-NMR, LC-MS/MS, bem como através do uso de ferramentas quimiométricas (PCA). As metodologias estatísticas e análises quimiométricas associadas aos dados gerados por RMN permitiram, através da obtenção de perfis *fingerprints*, a discriminação entre as plantas contaminada e não contaminada e a caracterização de alguns compostos que contribuíram de forma significativa para tal discriminação. Também foram realizadas análises por ICP-AES, visando à determinação das concentrações de metais nos diferentes tecidos das plantas. Ao analisar as variações dos perfis químicos das plantas de *Cyperus rotundus* através de *fingerprints* e dos dados obtidos a partir das HPLC-UV-SPE-NMR e LC-MS/MS, foi possível detectar a variação principalmente quanto a ácidos fenilpropanóides, ácidos graxos, carboidratos e compostos aromáticos, dentre outros, encontrados ora na planta contaminada, ora na planta não contaminada, ora em ambas, porém com concentrações diferentes. Também foi observado que em grande parte das amostras, os espectros apresentaram picos bem mais intensos e definidos para as amostras contaminadas, evidenciando, portanto, que estes compostos podem estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta diante de uma situação de estresse oxidativo causado pela contaminação por metais. Os resultados das análises de determinação de metais por ICP-AES, mostraram que o elemento Cu apresentou concentrações muito mais elevadas nas partes aéreas vegetativas de plantas contaminadas (921 mg/kg) em relação a plantas não contaminadas (3,7 mg/kg), em função deste metal ser o principal produto resultante da mineração local. Verificou-se que praticamente todas as concentrações de metais são consideravelmente maiores nas plantas contaminadas em relação às não contaminadas, sugerindo, portanto, o comportamento hiperacumulador da espécie *Cyperus rotundus*.

## ABSTRACT

“STUDY OF THE CHEMICAL PROFILE OF *Cyperus rotundus* AND EVALUATION OF ITS METAL ABSORPTION POTENTIAL”. The following work describes the comparative study of the variation between chemical profiles of plants of the *Cyperus rotundus* species – where one was collected at Vale S.A.’s dumping ground in Canaã dos Carajás city, Sossego Mine (an area contaminated by heavy metals), and compared with another of the same species collected at an adjacent area (non-contaminated by heavy metals) – through the development of analytical methods such as HPLC-UV, NMR, LC-UVSPE-NMR, LC-MS/MS, as well as through the use of chemometric tools (PCA). Statistical methodologies and chemometric analyses associated with data generated by NMR allowed, through fingerprint profiles, the discrimination between the contaminated and non-contaminated plants and the characterization of some compounds that contributed significantly to such discrimination. ICP-AES analyses were also made, in order to determine metal concentrations in different plant tissues. When analyzing the variation between chemical profiles of plants of the *Cyperus rotundus* species through *fingerprints* and data obtained from HPLC-UV-SPE-NMR and LC-MS/MS, it was possible to detect variations regarding mainly phenylpropanoid acids, fatty acids, carbohydrates and aromatic compounds, among others, which were found sometimes in the contaminated plant, sometimes in the non-contaminated plant, sometimes in both, although at different concentrations. It was also observed that in most samples spectra showed much more intense and well-defined peaks for the contaminated, thus highlighting that these compounds can be involved in the defense mechanism of the plant in a situation of oxidative stress caused by metal contamination. The results of the metal determination analyzes by ICP-AES showed much higher concentrations of the Cu element in the vegetative aerial parts of contaminated plants (921 mg/kg) in relation to the non-contaminated (3.7 mg/kg), due to this metal being the main resulting product of the local mining site. It was found that practically all metal concentrations are considerably larger in the contaminated plants when compared with the non-contaminated, therefore suggesting the hyperaccumulating behavior of the *Cyperus rotundus* species.

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO .....	01
1.1 – MINA DO SOSSEGO: PRODUÇÃO DE COBRE.....	01
1.2 – REMEDIAÇÃO.....	02
<b>1.2.1 – Técnicas de remediação.....</b>	<b>04</b>
1.2.1.1 – <i>Biorremediação</i> .....	05
1.2.1.1.1 – <i>Bioaumento</i> .....	08
1.2.1.1.2 – <i>Biestímulo</i> .....	09
1.2.1.1.3 – <i>Vantagens e desvantagens da biorremediação</i> ....	09
1.2.1.2 – <i>Fitorremediação</i> .....	11
1.2.1.2.1 – <i>Fitoestabilização</i> .....	15
1.2.1.2.2 – <i>Fitoestimulação/Rizodegradação</i> .....	15
1.2.1.2.3 – <i>Fitovolatilização</i> .....	16
1.2.1.2.4 – <i>Rizofiltração</i> .....	16
1.2.1.2.5 – <i>Fitotransformação/Fitodegradação</i> .....	16
1.2.1.2.6 – <i>Fitoextração</i> .....	17
1.2.1.2.7 – <i>Vantagens e desvantagens da fitorremediação</i> ....	19
1.2.1.2.8 – <i>Critérios para implementação da fitorremediação</i> .	21
1.3 – METAIS PESADOS.....	21
1.4 – REMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS.....	23
1.5 – FAMÍLIA CYPERACEAE .....	24
<b>1.5.1 – O Gênero <i>Cyperus</i></b> .....	<b>25</b>
1.5.1.1 – <i>Estudos químicos do gênero Cyperus</i> .....	26
1.5.1.1.1 – <i>Flavonóides e estilbenos</i> .....	26
1.5.1.1.2 – <i>Terpenos</i> .....	28
1.5.1.1.3 – <i>Fenilpropanóides e ácidos fenólicos</i> .....	28
1.5.1.1.4 – <i>Quinonas</i> .....	29



1.5.1.1.5 – <i>Cumarinas</i> .....	30
1.5.1.2 – <i>Cyperus rotundus</i> .....	31
1.5.1.2.1 – <i>Morfologia de C. rotundus</i> .....	32
1.5.1.2.2 – <i>Estudos químicos de C. rotundus</i> .....	33
1.6 – ICP-AES .....	37
1.7 – <i>FINGERPRINTING</i> .....	37
1.8 – QUIMIOMETRIA.....	39
<b>1.8.1 – PCA</b> .....	40
1.9 – LC-UV-SPE-NMR .....	42
1.10 – HPLC-MS .....	43
2 – OBJETIVOS.....	47
2.1 – OBJETIVOS GERAIS.....	47
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	49
3.1 – MATERIAIS .....	49
<b>3.1.1 – Eluentes</b> .....	49
<b>3.1.2 – Coluna</b> .....	49
<b>3.1.3 – Filtro</b> .....	50
<b>3.1.4 – Micropipetas, tubos e ponteiros</b> .....	50
3.2 – EQUIPAMENTOS .....	50
<b>3.2.1 – Evaporadores rotativos</b> .....	50
<b>3.2.2 – Balanças Analíticas</b> .....	50
<b>3.2.3 – Cromatógrafos</b> .....	51
<b>3.2.4 – Purificadores de água</b> .....	51
<b>3.2.5 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	51
<b>3.2.6 – Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP – AES)</b> ..	52
<b>3.2.7– Forno de micro-ondas</b> .....	52
<b>3.2.8 – Moinhos</b> .....	52

<b>3.2.9 – Dispersadores/Homogeneizadores</b> .....	52
<b>3.2.10 – Centrífuga</b> .....	52
<b>3.2.11 – Bombas</b> .....	52
<b>3.2.12 – Agitador para tubos e banho de ultrassom</b> .....	53
3.3 – COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	53
3.4 – METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	54
<b>3.4.1 – Preparo de amostras: digestão assistida por radiação micro-ondas e solução de ácido nítrico diluída</b> .....	54
<b>3.4.2 – Determinação de metais por ICP-AES</b> .....	54
3.5 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO QUÍMICO DE <i>C. rotundus</i> .....	56
<b>3.5.1 – Preparação das Amostras</b> .....	56
<b>3.5.2 – Fracionamento dos Extratos</b> .....	57
3.6 – METODOLOGIA UTILIZADA PARA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DOS PERFIS QUÍMICOS.....	60
<b>3.6.1 – Análise dos perfis químicos de <i>C. rotundus</i> através das obtenções dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (<i>fingerprint</i>) e análises quimiométricas dos dados</b> .....	60
<b>3.6.2 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt por HPLC</b> .....	64
<b>3.6.3 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR</b> .....	67
<b>3.6.4 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt através da técnica HPLC-MS</b> .....	68
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
4.1 – DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-AES .....	73
4.2 – ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE <i>C. rotundus</i> .....	79
<b>4.2.1 – Análise dos perfis químicos de <i>C. rotundus</i> através da técnica de RMN</b> .....	79
4.2.1.1 – <i>Frações hexânicas (FH)</i> .....	79

4.2.1.2 – Frações diclorometano (FDCM) .....	83
4.2.1.3 – Frações acetato de etila (FACOEt) .....	88
4.2.1.4 – Frações hidroalcólicas (FHid).....	101
<b>4.2.2 – Determinação de compostos encontrados na fração FAEPA (2) de C. rotundus por LC-SPE-NMR.....</b>	<b>114</b>
4.2.2.1 – Determinação estrutural de P-1, P-2 e P-5.....	116
4.2.2.2 – Determinação estrutural de P-6.....	128
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	135
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139

# ***INTRODUÇÃO***

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – MINA DO SOSSEGO: PRODUÇÃO DE COBRE

O cobre por ser um excelente condutor tem uma ampla utilização nos vários setores da indústria (MENDES & VIEIRA, 2010). O Brasil destaca-se como o décimo quinto maior produtor de Minério de Cobre, com produção em 2011 de 400 mil toneladas. A produção mundial de Cobre é estimada em 16,1 mil toneladas (2011), sendo o Chile o maior produtor mundial, com 33,66 % do total, seguido pelo Peru, com 7,58 %, China com 7,5 % e EUA com 6,96 % (IBRAM, 2012).

As reservas totais de minério de cobre do país, formadas principalmente por minerais sulfetados distribuem-se por oito estados. São eles: Minas Gerais (0,02 %), Mato Grosso (0,05 %), São Paulo (0,10 %), Rio Grande do Sul (0,19 %), Alagoas (2,95 %), Bahia (3,79 %), Goiás (7,92 %), Pará (84,99 %) (MME, 2009; IBRAM, 2012).

De acordo com dados coletados no ano de 2009, a Mina do Sossego (área de rejeito da empresa VALE), localizada no distrito cuprífero de Carajás no município de Marabá, no Estado do Pará, é a segunda maior reserva de cobre brasileira, perfazendo uma quantidade total de 1.568.067.455 t de minério com 12.589.105 t de cobre contido, perdendo apenas para o depósito de Salobo com 1.242.845.000 t de minério e teores de 0,72 % de cobre (MENDES & VIEIRA, 2010; SHIMIZU, 2012). O início da exploração deu-se em 2004 e representou um grande marco para a indústria de cobre, por ser o primeiro dentre vários depósitos desse metal em desenvolvimento na região a entrar em operação, cuja capacidade instalada era de 140 mil toneladas por ano de cobre concentrado. Trata-se de um depósito com recursos da ordem de 245 milhões de toneladas de minério, sendo 1,1 % cobre (OLIVEIRA et al., 2000; SHIMIZU, 2012).

Áreas de rejeito são aquelas com substrato totalmente desestruturado e impróprio para o desenvolvimento adequado dos organismos locais, uma vez que apresentam baixas concentrações de nutrientes e altas concentrações de metais (ANDREAZZA, 2009). Neste contexto, muitos têm sido os esforços para integrar conhecimentos que facilitem a remediação destes meios.

A atividade mineradora e processamento de minérios sempre tiveram um papel importante no desenvolvimento da maioria das sociedades e civilizações. Entretanto, causam impactos que comprometem o funcionamento equilibrado dos ecossistemas e, da saúde (inclusive de futuras gerações). Os principais problemas advindos da mineração podem ser englobados em quatro modalidades: poluição da água, poluição do ar, poluição do solo e poluição sonora (ruídos e vibrações). Um exemplo clássico dos impactos da industrialização de metais no ambiente e na vida das pessoas é a cidade de Santo Amaro (situada no Recôncavo Sul da Bahia), que possui a maior poluição urbana de chumbo do mundo (MENDES & VIEIRA, 2010; ASSUNÇÃO, 2012).

## 1.2 – REMEDIAÇÃO

Por meio de emissões gasosas não controladas, disponibilização inadequada de rejeitos industriais que causam a contaminação de águas subterrâneas, dentre diversas outras formas de poluição, a atividade industrial tornou-se uma das principais responsáveis pela degradação ambiental (BRITO et al., 2004), em que ocorre o acúmulo da produção e acúmulo de volume de resíduos sólidos, incluindo estéreis de mineração e rejeitos do processamento industrial que por sua vez, causam sérios problemas ambientais (SILVA, 2006).

Segundo o manual da CETESB (2007) classifica-se como contaminada área, terreno, local, instalação, edificação ou benfeitoria que após investigação e realização de avaliação de risco, foram observadas quantidades ou concentrações de matéria que causem ou possam causar danos à saúde humana. Uma área poderá ser considerada contaminada sem a obrigatoriedade de realização de avaliação de risco à saúde humana, quando existir um bem de relevante interesse ambiental a ser protegido.

Há uma série de definições para o termo remediação. De acordo com BITAR (1997), remediação consiste em práticas de contenção química; como por exemplo, a implementação de medidas de tratamento que se destinam a “eliminar, neutralizar, imobilizar, confinar ou transformar os contaminantes presentes no ambiente e, assim, alcançar a estabilidade química do mesmo”.

De acordo com o Decreto nº 59.263 de julho de 2013, as medidas de remediação são o conjunto de técnicas aplicadas em áreas contaminadas, divididas em: técnicas de tratamento, quando destinadas à remoção ou redução da massa de contaminantes e técnicas de contenção ou isolamento, quando destinadas a prevenir a migração dos contaminantes (SÃO PAULO, 2013).

Atualmente, existem inúmeras técnicas disponíveis para a recuperação de águas subterrâneas e solos contaminados. A seleção da técnica apropriada constitui um processo um tanto complexo, que envolve desde considerações detalhadas das características do sítio contaminado, dos fatores de deterioração, além de atender a legislação ambiental vigente; bem como dos tipos de poluentes a estudos da viabilidade técnica-econômica de aplicação das várias alternativas para o local específico (LEITE et al., 2005; DYMINSKI, 2006; TAVARES, 2009).

Segundo LEITE et al. (2005) as propriedades biológicas, físicas e físico-químicas do solo, são alteradas devido a aplicação de muitos tratamentos extremamente drásticos, o que ocorre em função do longo período de tempo de permanência dos contaminantes no solo contaminado.

De acordo com o Manual da CETESB (2013) a investigação para remediação compreende as seguintes etapas:

- Elaboração dos objetivos precedentes a remediação;
- Investigações iniciais;
- Investigações complementares;
- Estudo de viabilidade;
- Definição de zonas de remediação;
- Seleção de técnicas/processos de remediação apropriados;
- Formulação dos cenários de remediação;
- Avaliação técnica dos cenários de remediação através da execução de estudos em escala de bancada, modelo físico e piloto de campo e de combinações de tecnologias – estimativa de custos – análise de custo – benefício – plano de medidas indicadas, com possíveis modificações das metas da remediação;
- Fixação do objetivo da remediação;
- Plano de medidas harmonizadas.



Em todo o mundo, a tendência atual é de dar preferência às técnicas de remediação *in situ*, uma vez que apresentam baixos custos e não provocam contaminações secundárias, quando comparado a remediação *off situ*, na qual ocorre o transporte do material contaminado até o sítio de tratamento (LEITE et al., 2005; TAVARES, 2009).

### 1.2.1 – Técnicas de remediação

A finalidade da investigação para remediação é oferecer subsídios para a concepção e detalhamento de um projeto de remediação, que seja legalmente cabível, tecnicamente adequado, e economicamente viável, para cada situação de contaminação, objetivando prevenir danos presentes ou futuros ao meio ambiente, à saúde humana e segurança pública (CETESB, 2013).

Segundo MAXIMIANO e MORAES (2014), as tecnologias de remediação podem ser classificadas de acordo com o local de sua aplicação de três maneiras distintas:

- *On site* (na área aonde ocorre à contaminação), sem a remoção física do sítio de contaminação (*in situ*);
- *On site* (na área aonde ocorre à contaminação), com a remoção física do sítio de contaminação (*ex situ*);
- *Off site* (fora da área onde ocorre a contaminação).

De acordo com EUGRIS (2013) citado por MAXIMIANO e MORAES (2014) além da classificação da remediação conforme o local de aplicação, esta, também pode ser classificada de acordo com o tipo de tratamento, tais como:

- Tratamentos biológicos: compreendem a degradação de contaminantes orgânicos ou inorgânicos por microrganismos ou plantas, através da mineralização ou da biotransformação (DYMINSKI, 2006);
- Tratamentos físico-químicos: baseiam-se no princípio tecnológico da transferência de um contaminante do solo para um aceitador de fase líquida ou gasosa. Assim, os principais produtos obtidos serão o solo tratado e os contaminantes concentrados. Os tipos de contaminantes definirão o processo específico de tratamento (TUTIDA & FOGAÇA, 2012).

- Tratamentos térmicos: nestes, uma fonte de calor é fornecida ao solo contaminado a fim de aumentar a volatilização e conseqüentemente, realizar a separação dos contaminantes, sua destruição ou imobilização pela queima dos mesmos. Quando realizado *in situ*, este tipo de tratamento requer um curto período de tempo para a realização da limpeza do sítio contaminado, porém, como uma de suas desvantagens, temos o alto custo desta técnica associado às grandes quantidades de energia que são requeridas, bem como equipamentos onerosos (PÉREZ, 2011).

- Tratamentos de solidificação/estabilização: nesta tecnologia os contaminantes são fisicamente ligados ou presos dentro de uma massa estabilizada (solidificação), ou são induzidas reações químicas entre o agente de estabilização e contaminantes para que sua mobilidade seja reduzida (estabilização) (MAXIMIANO & MORAES 2014).

A seguir serão apresentadas apenas técnicas remediadoras classificadas como tratamentos biológicos com ênfase na fitorremediação de metais, contaminantes estes, que estão presentes no material contaminado em estudo.

#### 1.2.1.1 – Biorremediação

O tratamento do petróleo derramado pelo navio Exxon Valdez no Alasca, no ano de 1989, destacou-se com o maior projeto de biorremediação da história, em que foram adicionadas toneladas de fertilizantes, ao longo dos 100 km de litoral contaminado, promovendo assim, a estimulação do crescimento de microrganismos nativos, tais como, aqueles capazes de degradar hidrocarbonetos (TAVARES, 2009).

A biorremediação ou remediação biológica consiste na técnica de remediação que envolve a utilização de organismos vivos como vegetais e microrganismos nativos ou cultivados, para degradar ou imobilizar contaminantes em águas subterrâneas e solos contaminados. Tratando-se de biorremediação, geralmente, as bactérias são os microrganismos utilizados, bem como fungos filamentosos e leveduras, ou suas enzimas. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, por conseguinte, são tidas como elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. A importância das bactérias dá-se em

função de seus efeitos bioquímicos, por destruírem ou transformarem os contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos nocivos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993 citado por ANDRADE et al., 2010).

Os microrganismos são parte dos processos de detoxificação e estão presentes na natureza. Aos mesmos é fornecido carbono através dos contaminantes sendo necessário o fornecimento de nutrientes tais como, nitrogênio e fósforo, bem como nutrientes específicos para cada tipo de contaminante, além da disponibilização de um agente oxidante. Em alguns casos, microrganismos associados degradam contaminantes orgânicos, a este processo dá-se o nome de co-metabolismo (PICCHI, 2011).

A biorremediação pode ser executada tanto *on site* quanto *off site*. Para fazer-se cumprir o potencial biorremediador de microrganismos nativos do solo, na biorremediação *in situ* injetam-se nutrientes como nitrogênio e fósforo, diretamente na água subterrânea (TAVARES, 2009).

Embora haja técnicas físico-químicas indicadas como meio de descontaminação, a biorremediação vem sendo cada vez pesquisada e indicada pela comunidade científica para tratamento de sítios contaminados, bem como locais de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção. Esta tecnologia é tem uma boa aceitação por ser considerada ecologicamente correta e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (GAYLARDE et al., 2005).

Atualmente, a biorremediação apresenta crescimento acelerado, sobretudo associado a outras áreas, como a engenharia genética, utilizada para desenvolver linhagens de microrganismos capazes de lidar com poluentes específicos (TAVARES, 2009).

No Brasil há um crescimento constante de estudos da biorremediação de solos contaminados com óleo, visando à redução de impactos ambientais causados pelo despejo do mesmo. Sabe-se que este é composto de uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos (n-alcanos), alicíclicos e aromáticos (HPAs). Não somente os solos têm recebido esse destaque, mas também a descoberta de que certas bactérias que vivem nos sedimentos marinhos, inclusive nas areias das praias, podem degradar os componentes do petróleo abrindo a possibilidade de usar

métodos biológicos no tratamento dos derrames também em ambientes marinhos (CRAPEZ et al., 2002).

Conforme citado anteriormente, para cada tipo de contaminante há diferentes espécies de microrganismos adequadas para aplicação da técnica biorremediadora, conforme mostrados na **TABELA 1.2.1.1**.

TABELA 1.2.1.1 – Relação entre contaminantes e espécies de microrganismos

<b>Contaminante</b>	<b>Espécie utilizada</b>
Anéis aromáticos (combustíveis e resíduos industriais)	<i>Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Arthrobacter, Penicillum, Aspergillus, Fusarium, Phanerocheate</i>
Cádmio (Cd)	<i>Staphyococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella, Phodococcus, Aspergillus, Saccharomyces cerevisiae</i>
Chumbo (Pb)	<i>Bacillus</i>
Cobre (Cu)	<i>Escherichia, Pseudomonas, Bacillus</i>
Cromo (Cr)	<i>Alcaligenes, Pseudomonas</i>
Enxofre (S)	<i>Thiobacillus</i>
Derivados do petróleo	<i>Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Penicillum, Cunninghamella</i>
Zinco (Zn)	<i>Rhodococcus, Bacillus</i>

Fonte: (TUTIDA & FOGAÇA, 2012).

Moléculas “recalcitrantes” (moléculas orgânicas de difícil degradação) podem ter diferentes origens, tais como naturais, sintetizadas pelo metabolismo biológico, ou sintéticas, produzidas por tecnologias industriais modernas e estranhas ao ambiente natural, por este motivo são denominadas “xenobióticas” (*xenos do grego = estrangeiro*). Estas moléculas xenobióticas, introduzidas no ambiente desde o início do século XX, engloba muitos tipos de compostos, aplicados na indústria química e de materiais, como corantes, polímeros, agrotóxicos, plásticos, e fármacos, podendo ser tóxicas a sistemas biológicos e/ou recalcitrantes. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e a modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica (GAYLARDE et al., 2005).

Por estas razões, atualmente, há uma crescente preocupação em desenvolver biotecnologias de descontaminação de ambientes poluídos por

xenobióticos. Neste contexto destaca-se a biorremediação que geralmente utilizam microrganismos com capacidade de biodegradar xenobióticos, resultando em produtos de degradação com estrutura menos recalcitrante em relação à molécula original, ou na mineralização do xenobiótico, produzindo compostos químicos simples, como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ . Ocorre a utilização de microrganismos não exógenos (não nativos ou alóctones) quando há insuficiência de microrganismos endógenos (nativos ou autóctones). A não viabilização da inserção de microrganismos endógenos pode se dar devido algumas restrições locais, por causa da possibilidade de alterar a dinâmica do ecossistema local (GAYLARDE et al., 2005; PICCHI, 2011).

Para que o processo de biorremediação aconteça de forma eficaz é fundamental o estabelecimento de condições ambientais e o uso da técnica adequada (REIS, 2009).

Segundo ALEXANDER (1999) as técnicas mais empregadas na biodegradação de petróleo e seus derivados são: o aumento da microbiota do solo através da adição de microrganismos endógenos ou exógenos (Bioaumento e/ou Bioenriquecimento) e adição de oxigênio e fontes de nutrientes (Bioestimulo).

#### 1.2.1.1.1 – *Bioaumento*

A inoculação com uma concentração maior de microrganismos degradadores torna-se uma estratégia interessante em situações em que a população microbiana degradadora dos sítios contaminados é diminuta ou é incapaz de degradar misturas complexas de hidrocarbonetos, como por exemplo, o óleo cru. Neste contexto, destaca-se o bioaumento: tecnologia que consiste na inoculação de microrganismos com a capacidade específica para biotransformação de ambientes contaminados. Esta estratégia denomina-se bioaumento, quando os microrganismos inoculados são endógenos (extraídos do próprio solo contaminado, crescidos *in vitro* e re-introduzidos no ambiente em maior concentração); ou de bioenriquecimento, quando os microrganismos inoculados são exógenos (microrganismos não nativos introduzido no ambiente contaminado). No entanto, para ambos os casos, alguns autores adotam o termo bioaumento (PROVIDENTI et al., 1993; ROMANTSCHUK et al., 2000).

### *1.2.1.1.2 – Bioestímulo*

O bioestímulo é uma estratégia de remediação que consiste na correção das condições nutricionais (nitrogênio, fósforo, potássio), de pH, umidade e aeração do solo, visando aumentar a atividade microbiana da população endógena das áreas contaminadas. É uma das estratégias mais adotada em processos de recuperação de áreas impactadas (BOOPATHY, 2000; REIS, 2009).

Conforme relatado anteriormente, dois nutrientes essenciais ao crescimento celular são o nitrogênio e o fósforo, os quais devem estar balanceados, propiciando uma boa proporção em relação ao teor de carbono. Geralmente, ocorre o aumento da quantidade de carbono em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, tal aumento faz com que estes nutrientes necessários para o crescimento ótimo microbiano estejam presentes em quantidades inferiores. Desta maneira, frequentemente faz-se necessário à correção das concentrações de nitrogênio e fósforo utilizando fontes externas como sais inorgânicos (amônio, nitratos e fosfatos) ou fertilizantes utilizados na agricultura, como ureia (COULON et al., 2007; YU et al., 2005).

De acordo com RIEGER et al. (2002) e LEO et al. (2014) o bioestímulo pode usado de forma geral ou específica, no último caso tem como objetivo o favorecimento de um grupo de microrganismos de interesse. O conhecimento prévio da microbiota local é um fator determinante na eficiência da suplementação específica.

### *1.2.1.1.3 – Vantagens e desvantagens da biorremediação*

Segundo BOOPATH (2000), o sucesso da biorremediação se dá pela ocorrência da degradação e depende de fatores ambientais propícios e da microbiota adequada à tal degradação. Essa microbiota é constituída predominantemente por bactérias e fungos com capacidade metabólica e fisiológica de degradação do contaminante. Referente ao custo (**FIGURA 1.2.1.1.3**) e ao impacto ambiental da aplicação da tecnologia, a biorremediação apresenta uma série de vantagens sobre as técnicas convencionais de tratamento tais como deposição em aterro e incineração, por exemplo.

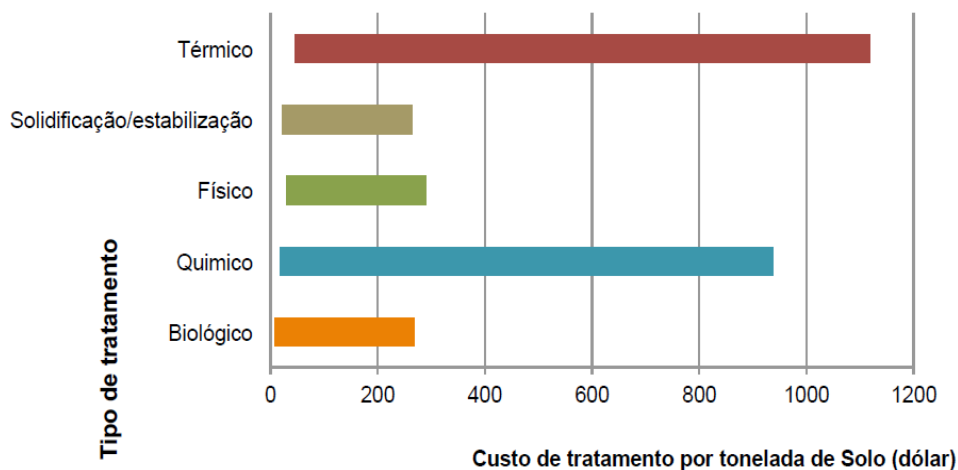


FIGURA 1.2.1.1.3 – Comparação entre os custos do tratamento de solos empregando diferentes técnicas de tratamento.

Fonte: Elaborado pelos autores com dados de JUWARKAR, SINGH & MUDHOO (2010).

A biorremediação é ecologicamente correta, uma vez que não altera o equilíbrio dos ecossistemas de maneira expressiva, objetivando somente à biodegradação dos compostos poluentes, portanto a redução da concentração e/ou toxicidade (SILVA, 2007).

Na **TABELA 1.2.1.1.3**, foram listadas algumas vantagens e desvantagens da tecnologia de biorremediação.



TABELA 1.2.1.1.3 – Vantagens e desvantagens da biorremediação.

<b>Biorremediação</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
A aplicação envolve o uso de equipamentos de fácil obtenção, instalação e operação.	Pode requisitar monitoramento contínuo por tempos longos e/ou manutenção do sítio submetido à biorremediação.
Em atividades <i>in situ</i> , a biorremediação ocasiona distúrbios mínimos ao meio ambiente.	A técnica não é eficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, tornando-os indisponíveis à biodegradação.
Em condições adequadas de operação, apresenta custos inferiores quando comparados a outras técnicas.	É menos eficiente em curtos períodos de tempo quando comparada às outras técnicas de remediação.
Associada à outras técnicas, como a SVE (do inglês, “ <i>Soil Vapor Extraction</i> ”), acelera o processo de descontaminação.	Contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas podem ser tóxicos aos microrganismos e/ou não biodegradáveis, tornando inviável a utilização da técnica.
Na maior parte dos casos, essa técnica não produz compostos tóxicos, que devem ser dispostos e tratados em outro local.	A taxa de biodegradação pode ser alterada por propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, bem como as condições climáticas.
É muito eficiente na biodegradação de petróleo e seus derivados em solos permeáveis.	Há dificuldade de utilização em solos argilosos ou com baixa permeabilidade.

Fonte: Andrade et al., 2010.

### 1.2.1.2 – Fitorremediação

As plantas são dotadas de muitas habilidades e adaptam-se a ambientes extremamente diversos, de forma tão eficaz que há poucos lugares completamente desprovidos das suas presenças, sendo que algumas espécies apresentam a capacidade de interagir simbioticamente com numerosos organismos, facilitando sua adaptação em solos ríspidos tais como salinos, ácidos, pobres e ricos

em nutrientes ou excessivamente contaminado com elementos químicos como metais pesados (TAVARES, 2009).

A absorção de contaminantes por plantas tornou-se um fato conhecido, haja vista a grande quantidade desses compostos envolvidos na produção de inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros. Portanto, a posse de informações referentes aos mecanismos de degradação destes compostos, torna-se fundamental para o emprego seguro desta técnica (CRUVINEL, 2009).

A fitorremediação é uma técnica de biorremediação que consiste no uso de plantas e sua microbiota na remediação *in situ* de solos contaminados, lamas, sedimentos e águas subterrâneas através de remoção de contaminantes, degradação, ou confinamento. Sua aplicação pode ser realizada também pela associação com outras técnicas de remediação. A fitorremediação pode ser aplicada para limpar pesticidas, solventes, metais, explosivos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, lixiviados dos aterros e petróleo bruto (**TABELA 1.2.1.2.1**), além de contribuir para melhoria das características físico-químicas e biológicas destas áreas contaminadas (EPA, 1999; TAVARES, 2009). O sucesso da fitorremediação depende da ocorrência de plantas tolerantes aos contaminantes e capazes de remover, estabilizar ou imobilizar tais contaminantes (ASSUNÇÃO, 2012).

TABELA 1.2.1.2.1 – Alvos da fitorremediação.

<b>Compostos Orgânicos</b>	<b>Compostos Inorgânicos</b>
Solventes clorados: Tricloroetano, tetracloroetano, etc;	Metais: Pb, Zn, Cd, Co, Cu, Ni, Hg, Se;
Explosivos: Trinitrotolueno, ciclotrimetilenotrinitramina, etc;	Elementos radioativos – U, Cs, Sr;
Hidrocarbonetos de petróleo;	Outros: As, Na, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .
Preservativos de madeira;	
Pesticidas: atrazina, bentazona, compostos clorados e nitroaromáticos.	

Fonte: ARAÚJO, 2000.

Esta definição inclui todos os processos adulterados por plantas, sejam eles, biológicos, químicos ou físicos e que ajudam na captação, no sequestro, e degradação dos contaminantes, seja por plantas ou por organismos de vida livre que constituem rizosfera das mesmas. Fitorremediação desfruta-se das capacidades de absorção seletiva e exclusiva dos sistemas radiculares de plantas, juntamente à translocação, bioacumulação e capacidades de armazenamento/degradação de contaminantes de todo o corpo da planta (HINCHMAN et al., 1995).

A utilização desta tecnologia em países desenvolvidos vem crescendo gradativamente, em função da sua grande viabilidade técnica e/ou econômica (**TABELA 1.2.1.2.2**) (ANDRADE et al. 2007).

TABELA 1.2.1.2.2 – Valores despendidos no mercado referente à fitorremediação durante o ano de 1999 em diversos países.

<b>País</b>	<b>Total estimado em milhões de US\$</b>
EUA	30 – 49
Europa	2 – 5
Canadá	1 – 2
Outros	1 – 2
<b>Total no mundo</b>	<b>34 – 58</b>

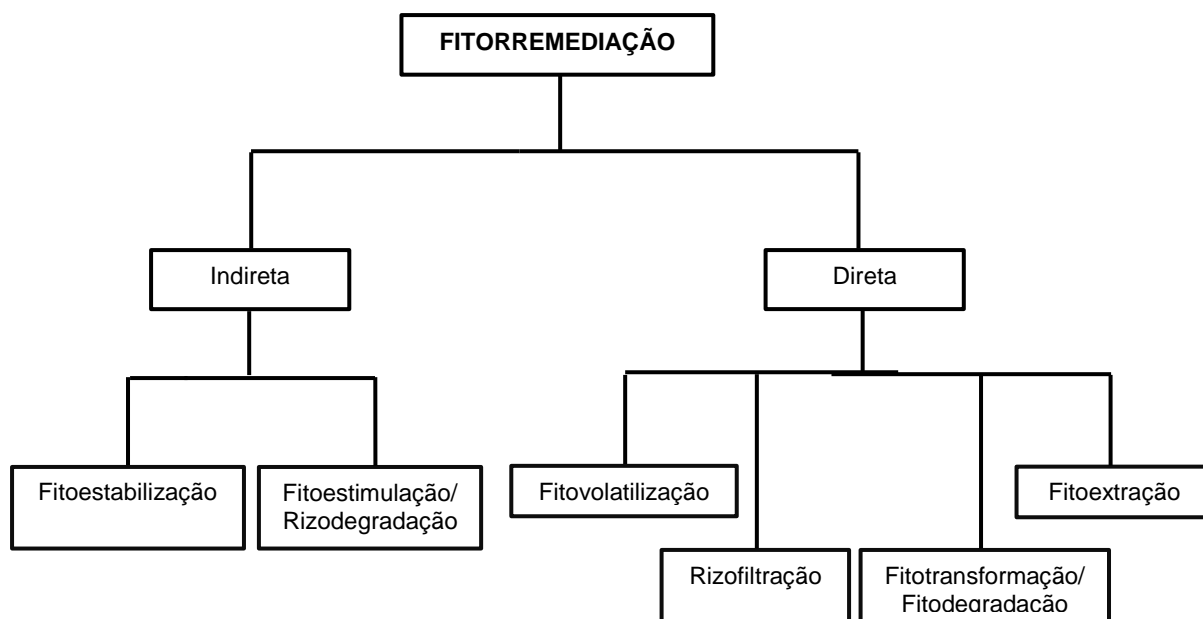
Fonte: GLASS, 1999 citado por ANDRADE et al. (2007).

A fitorremediação pode ser classificada em várias modalidades, cada uma com características distintas especializadas em determinado tipo de contaminante ou na remediação de meios específicos, conforme mostrado na **TABELA 1.2.1.2.3** (MEJÍA et al., 2014). Portanto, a fitorremediação a pode ser classificada como direta e indireta. Na fitorremediação direta, através da mineralização dos compostos, os mesmos são absorvidos e acumulados ou metabolizada nos tecidos. Na forma indireta, os vegetais extraem contaminantes das águas subterrâneas, reduzindo assim, a fonte de contaminação ou a presença de plantas propicia um meio favorável ao aumento da atividade microbiana, que acaba por degradar ou participar das etapas de degradação do contaminante (DIAS, 2000).

TABELA 1.2.1.2.3 – Relação técnicas de fitorremediação x contaminantes.

Técnica de fitorremediação	Contaminante	
	Tipo	Exemplos
Fitodegradação	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Preservativos de madeira, TCE e Bifenilos policlorados (PCBs).
Fitoestabilização	Inorgânicos	Metais (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn).
Fitoextração	Inorgânicos	Metais (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn) e Radionuclídeos (Sr, Cs, Pu e U).
Rizofiltração	Inorgânicos	Metais (Pb, Cd, Cu, Ni, Zn e Cr) e Radionuclídeos (U, Cs e Sr).
Fitovolatilização	Orgânicos Inorgânicos	TCE, Metais (Se e Hg).
Rizodegradação	Orgânicos	Hidrocarbonetos, nitroaromáticos, PCP, TCE, PCBs.

Nos mecanismos fitorremediadores classificados como indiretos estão a fitoestabilização e fitoestimulação/rizodegradação. Nos diretos estão a fitovolatilização, rizofiltração, fitotransformação e fitoextração. **(FLUXOGRAMA 1.2.1.2)** (MEJÍA et al., 2014).



FLUXOGRAMA 1.2.1.2 – Divisão da fitorremediação em fitorremediação direta e indireta.  
 FONTE: (MEJÍA et al., 2014)

### 1.2.1.2.1 – Fitoestabilização

A fitoestabilização é um mecanismo referente à capacidade que algumas plantas possuem em sequestrar ou imobilizar contaminantes, absorvendo-os através das suas raízes e posteriormente liberando uma substância química que os converte em uma forma menos nociva. Este método, portanto, reduz a mobilidade e migração de contaminantes presentes no solo (BALCOM et al., 2011).

### 1.2.1.2.2 – Fitoestimulação/Rizodegradação

A fitoestimulação ou rizodegradação é uma técnica que explora o efeito estimulante proporcionado pelas raízes aos processos microbiais e as alterações físico-químicas na rizosfera (VIANA et al., 2007). Há casos em que micróbios no solo quebram os contaminantes a um estado de menor toxicidade. Em outros casos, estes micróbios podem destruir por completo o contaminante. As zonas das raízes de certas plantas criam um ambiente que auxiliam este processo. Por esta razão, a fitoestimulação também é chamada de degradação assistida por planta (BALCOM et al., 2011).

Devido à distribuição espacial variável dos nutrientes nesta zona, a comunidade microbiana é heterogênea, embora as *Pseudomonas sp.* sejam os organismos predominantes associados às raízes (LIMA, 2010).

#### 1.2.1.2.3 – *Fitovolatilização*

A fitovolatilização é um processo em que a planta remove contaminantes provenientes dos solos e realiza a conversão destes em formas voláteis, para posterior liberação na atmosfera (EPA, 1999).

A volatilização pode ocorrer de duas maneiras: pela biodegradação do contaminante na rizosfera ou após a passagem deste na própria planta. No caso da absorção do poluente, este poderá passar por uma série de reações metabólicas internas e posteriormente através do processo de respiração das plantas os poluentes podem ser transformados em gases (volatilizados) e liberados. Deve-se ter o cuidado na utilização desta técnica para que as plantas não liberem na atmosfera altas concentrações de poluentes. (LAMBERT et al., 2012).

#### 1.2.1.2.4 – *Rizofiltração*

A rizofiltração é a técnica de fitorremediação que consiste na adsorção e precipitação dos contaminantes nas raízes ou a absorção dos mesmos quando se encontram em solução. É uma técnica aplicada principalmente em águas contaminadas com metais, em que estes são separados do sítio contaminado através da retenção, imobilização ou acumulação nas raízes (MEJÍA, 2014).

#### 1.2.1.2.5 – *Fitotransformação/Fitodegradação*

A fitotransformação ou fitodegradação é uma técnica em as plantas retiram e quebram as moléculas dos contaminantes (tornando-os menos nocivos) através da liberação de enzimas e processos metabólicos, tais como a oxidação e redução fotossintéticas. Nesta técnica, os poluentes orgânicos são degradados e incorporados na planta ou decompostos no solo (BALCOM et al., 2011). Dentre

estas enzimas que atuam na fitotransformação destacam-se as nitroredutases, que atuam na degradação de nitroaromáticos; desalogenases, que degradam solventes clorados e lacases, que degradam pesticidas e agrotóxicos (LIMA, 2010).

#### 1.2.1.2.6 – *Fitoextração*

Segundo BALCOM et al. (2011) e ASSUNÇÃO, (2012) na fitoextração as plantas absorvem os contaminantes, principalmente metais, através de suas raízes, posteriormente, translocam este contaminantes para suas partes aéreas, onde são acumulados em grandes quantidades. Depois, estas plantas podem ser colhidas e dispostas em aterros sanitários ou ainda recicladas, a fim de que sejam recuperados os metais nelas presentes. A estas plantas é atribuído o termo Hiperacumuladoras.

Um dos fatores condicionantes do potencial hiperacumulador destas plantas é o crescimento da biomassa acima do solo, sendo este potencial muitas vezes prejudicado por plantas que apresentam pouco rendimento da biomassa e crescimento lento, como é o caso aqui relatado (SALT et al., 1995; EBBS et al., 1996).

Plantas hiperacumuladoras são capazes de concentrar níveis elevados de metais em sua biomassa, que seriam tóxicos a outras espécies cultivadas sob as mesmas condições (KHAN, et al., 2000). Mais de 450 espécies já foram identificadas como hiperacumuladoras de metais e semi-metais (zinco, níquel, manganês, cobre, cobalto e cádmio, Arsênio) e não-metais (Selênio), sendo em maior número as hiperacumuladoras de níquel (SILVA, 2012).

Pode-se avaliar a eficiência das plantas acumuladoras e hiperacumuladoras utilizadas na fitoextração através da análise dos fatores de bioacumulação (FB), razão entre a concentração do metal na biomassa da planta e do meio contaminado; e de translocação (FT), razão entre os teores do contaminante na parte aérea e na raiz. As plantas que apresentam  $FB > 1,00$  e  $FT > 1,00$  e alta concentração do contaminante são plantas com bom potencial de uso em técnicas de fitoextração (ASSUNÇÃO, 2012).

Visando aumentar a eficácia da fitorremediação, em alguns casos já ocorre o uso de plantas transgênicas. Neste caso, a descontaminação de águas e solos poluídos é realizada pela alteração no metabolismo das plantas que permite absorver substâncias poluentes a um nível não alcançado por plantas não modificadas geneticamente. Um exemplo é na absorção de metais (como arsênio, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, mercúrio, níquel, lítio, selênio, zinco). As plantas podem, então, ser removidas do lugar para possibilitar um trabalho de purificação e reutilização do metal pesado absorvido (BENEDITO & FIGUEIRA, 2005).

A **FIGURA 1.2.1.2.6** mostra os principais mecanismos utilizados pelas plantas no processo de fitorremediação.

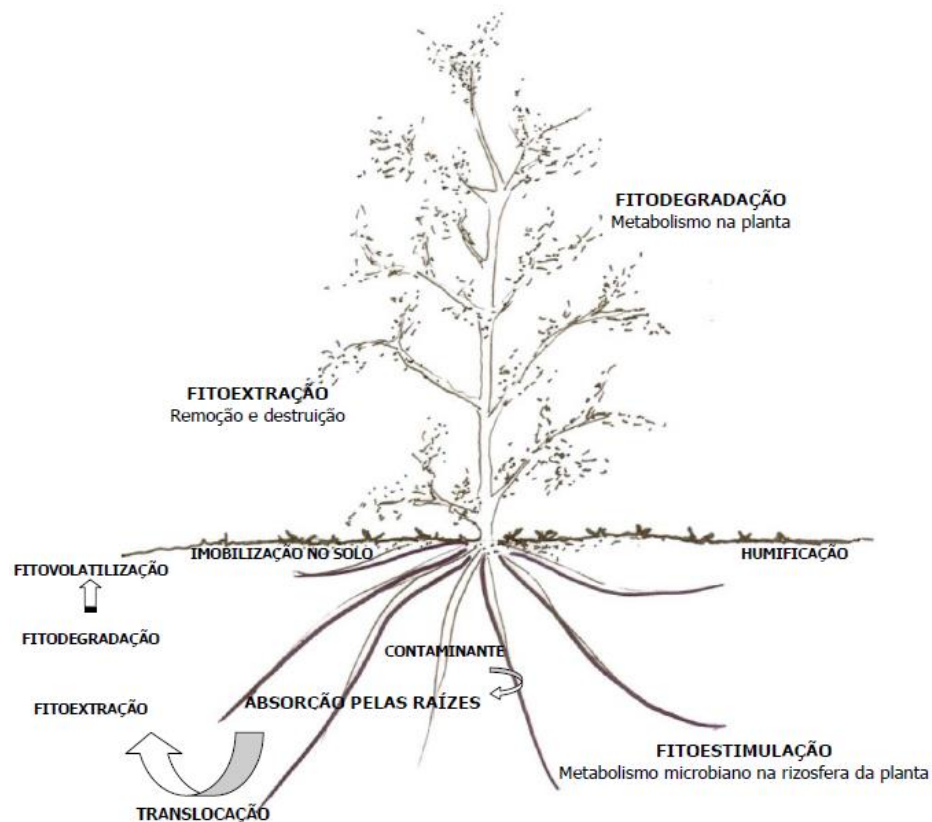


FIGURA 1.2.1.2.6 – Mecanismos utilizados pelas plantas no processo de fitorremediação.  
Fonte : TAVARES (2009).



### 1.2.1.2.7 – Vantagens e desvantagens da fitorremediação

A fitorremediação ao que tudo indica, mostra-se como uma técnica promissora para recuperar locais contaminados por metais pesados, e apresenta muitas vantagens quando comparada a outras técnicas de remediação, tais como a possibilidade de aplicação em áreas extensas, baixo custo (**TABELA 1.2.1.2.7.1**), e reduz a erosão e lixiviação dos contaminantes. Sua aplicação é indicada em áreas nas quais as técnicas de engenharia não sejam economicamente viáveis (águas contaminadas, solo e o subsolo). Portanto, a mesma requer que mais estudos sejam realizados, bem como, testes em novas plantas, principalmente nas de clima tropical, para que estas possam ser eficientemente cultivadas em áreas contaminadas no Brasil (ZEITOUNI, 2003; CRUVINEL, 2009).

TABELA 1.2.1.2.7.1 – Custo da extração de metais por fitorremediação comparado a outras possíveis alternativas tecnológicas.

<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Custo por m<sup>3</sup> (dólares)</b>	<b>Tempo requerido (meses)</b>	<b>Fatores adicionais que aumentam o custo</b>	<b>Subprodutos</b>
Fixação	90 – 200	6 – 9	Escavação/Transporte Monitoramento	Lixiviado
Disposição em aterro	100 – 400	6 – 9	Monitoramento	Lixiviado
Extração por lixiviação do solo	250 – 500	8 – 12	No mínimo 5.000 m <sup>3</sup> /ha a serem quimicamente	Resíduos a serem dispostos
Fitorremediação (fitoextração)	15 – 40	18 – 60	Tempo em que o solo terá de ficar sem uso	Resíduos a serem dispostos

Fonte: SCHNOOR (1997).

De acordo com as literaturas consultadas, a **TABELA 1.2.1.2.7.2** reúne uma série de vantagens e desvantagens da tecnologia da fitorremediação.

TABELA 1.2.1.2.7.2 – Vantagens e desvantagens da fitorremediação.

<b>Fitorremediação</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
O investimento em capital e o custo de operação são baixos, uma vez que usa como fonte de energia a luz solar.	É dependente das condições necessárias ao crescimento das plantas (clima, geologia, altitude, temperatura).
Baixo impacto ambiental (alternativa considerada limpa).	O tempo necessário para a limpeza de determinado local pode ser maior que o das outras tecnologias de descontaminação.
Pode ser associada a outras técnicas de descontaminação.	O sucesso depende da tolerância da planta ao contaminante. Concentrações muito altas podem prejudicar o metabolismo das plantas hiperacumuladoras ou até mesmo mata-las.
Plantas são facilmente controláveis se comparada a microrganismos.	Os contaminantes podem encontrar-se em concentrações muito elevadas a ponto de não permitir o desenvolvimento das plantas.
As plantas ajudam no controle do processo erosivo, eólico e hídrico.	Apresenta resultados mais satisfatórios se for aplicada à superfície do solo ou às águas existentes a pouca profundidade.
Caso requerido, o metal pode ser recuperado pela simples incineração da planta.	Podem ser produzidos metabólitos mais tóxicos que os compostos iniciais, por exemplo, na fitovolatilização estes contaminantes podem ser liberados para a atmosfera.
Aplica-se a áreas extensas, aonde outras tecnologias não alcançariam.	A planta precisa apresentar uma boa biomassa vegetal, quando ocorre a fitoextração de poluentes não metabolizáveis, seguida de uma disposição apropriada após sua remoção.
Evita contaminação e o transporte dos meios contaminados, reduzindo, portanto o risco de propagação da contaminação.	Muitas plantas utilizadas atualmente para a fitorremediação são transgênicas, criando um impasse, uma vez que no Brasil, ainda não há uma legislação sobre o assunto.
Aplica-se a grande variedade de poluentes, podendo remediar diversos contaminantes simultaneamente, incluindo metais, pesticidas e hidrocarbonetos.	

### 1.2.1.2.8 – Critérios para implementação da fitorremediação

Para que fatores negativos não interfiram no processo de fitorremediação, faz-se necessário que as plantas apresentem uma série de pré-requisitos, estes pré-requisitos podem ser usados como indicadores de seleção.

Segundo, PIRES et al. (2003) alguns dos pré-requisitos para a planta ser selecionada como fitorremediadora são:

- capacidade de absorção, concentração e/ou metabolização bem como, tolerância ao contaminante;
- altas taxas de crescimento e produção de biomassa;
- sistema radicular denso e profundo;
- elevada capacidade transpiratória;
- fácil colheita, uma vez que em alguns casos faz-se necessária a remoção da planta da área contaminada;
- taxa de exsudação radicular elevada;
- alta resistência a pragas e doenças;
- fácil aquisição ou multiplicação de propágulos;
- fácil controle ou erradicação;
- capacidade de se desenvolver adequadamente em diferentes ambientes; e
- ocorrência natural em áreas poluídas (tal fator é importante na identificação, todavia não é pré-requisito).

## 1.3 – METAIS PESADOS

De acordo com MAZZUCO (2008) foi noticiado na mídia a contaminação de adultos, crianças, lotes e vivendas residenciais, com metais pesados, especialmente por chumbo e mercúrio. Contudo, a maior parte da população não tem informações precisas sobre os riscos e as consequências causadas da contaminação por esses metais para a saúde humana.

A presença de metais pesados nos solos pode ter origem natural, depende do material de origem e do grau de intemperização que esse material sofreu ou da ação antrópica, que é a principal razão do aumento constante na concentração de metais pesados em solos agrícolas. Sabe-se que o solo é

considerado uns dos meios mais promissores para reciclagem de diversos resíduos, a fim de promover melhoria nas suas condições físicas, bem como fornecer nutrientes às plantas, todavia, frequentemente, também apresentam altos teores de metais pesados. Esse problema, contudo, não ocorre apenas com os resíduos, visto que fertilizantes, corretivos, defensivos e outros produtos usados na agricultura também podem conter esses elementos (BORGES, 2007).

Embora o termo “metais pesados” seja de definição dúbia, é utilizado principalmente na literatura científica referindo-se a um grupo de elementos largamente associados à poluição, contaminação e toxicidade. Conceitualmente, metais pesados são definidos como elementos que possuem densidade superior a  $6 \text{ g.cm}^{-3}$ , ou ainda, aceito por alguns autores  $5 \text{ g.cm}^{-3}$  ou que possuem número atômico superior a 20. Essa definição engloba qualquer elemento tóxico às plantas e animais e inclui, também, alguns ametais, como o arsênio (As) e o selênio (Se) (BOECHAT, 2014).

Segundo GOYER (1996) todos os metais pesados e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, são capazes de causar efeito tóxico a sistemas biológicos. O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo e está ligada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição.

De modo geral, normas sobre metais pesados quase sempre se referem a quantidades ou teores máximos permitidos. A simples determinação do teor total de metais é um meio impreciso de quantificar o potencial de risco ao ambiente e à saúde humana. Embora totalmente conservador, na ausência de alternativas, “teores totais” são defendidos pelas agências de proteção ambiental. Entretanto, a análise do potencial de risco e da toxicidade de metais em solos requer a avaliação da proporção de metal que é móvel e, provavelmente, biodisponibilidade (SOARES, 2004).

Portanto, é necessária a busca por técnicas que viabilizam a redução do teor de metais nos sítios contaminados de modo que estes possam ser reaproveitados, neste contexto, destaca-se a fitoextração, como via de recuperação destes meios. Assim, intensificaram-se as pesquisas na remediação de áreas contaminadas por metais pesados nas últimas décadas, como aquelas de

disposição de resíduos de mineração, indústrias e mesmo da utilização de resíduos orgânicos na agricultura (ANDRADE, 2010).

#### 1.4 – REMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS

Desde os fins do século XVIII, a contaminação por metais pesados e outros elementos considerados tóxicos para o homem e o meio ambiente vem gerado preocupações e demandando estudos em busca de tecnologias eficazes e de custos menos elevados de modo a reduzir este impacto (ANDRADE, 2010).

A iniciativa de remediar áreas contaminadas por metais pesados, dentre outros procedimentos passa pela análise inicial de risco à população e pela capacidade do solo em responder aos processos empregados. A biorremediação apresenta-se como uma alternativa promissora nas áreas contaminadas, uma vez que é vista como uma tecnologia de baixo custo, associada ao uso de plantas e/ou microrganismos, presentes nas áreas a serem remediadas, sendo, portanto, adaptados aos fatores edafoclimáticos da região a qual está inserida. (BOECHAT, 2014).

A importância da seleção e a identificação de bactérias e plantas resistentes e capazes de biorremover metais pesados em amostras ambientais, possibilita utilizar as características intrínsecas a estas, em parceria com a técnica de fitorremediação, por exemplo, promovendo o crescimento das plantas e solubilização dos metais pesados, além disso, viabiliza a remoção dos metais, por meio de diferentes mecanismos nas diferentes etapas do processo de remediação (GERMAINE et al., 2013).

Muitas espécies de plantas têm sucesso no processo de absorção de contaminantes, tais como metais pesados. Na fitoextração a remoção de metais é feita utilizando a capacidade de absorção de metais tidos como essenciais para o crescimento das plantas (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo e Ni). Alguns metais (Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se, Hg) com funções biológicas desconhecidas também podem ser acumulados (CHO-RUK et al., 2006). Para o sucesso da fitorremediação é necessário que as espécies selecionadas sejam capazes de se estabelecer nas condições do ambiente proposto e a concentração do poluente deve estar dentro

dos limites tolerados pela planta de forma a não comprometer o tratamento da área (TAVARES, 2009).

Segundo ASSUNÇÃO (2012) há muitos fatores que influenciam o comportamento da planta frente ao contaminante, tais como, espécie vegetal, tipo de metal, órgão de acúmulo e estratégias de tolerância e resistência. Atualmente, ainda sabe-se pouco a respeito da existência de plantas tolerantes a metais, embora se reconheça a participação de mecanismos como: acúmulo nos tricomas, translocação para as folhas mais velhas, exsudação de substâncias contendo metais quelatados (quelação realizada pelas fitoquelatinas), ligações de metais às paredes celulares, alterações das estruturas de membranas e permeabilidade, restrição de compostos intracelulares sequestrados do metal e ativação das bombas transportadoras de íons metálicos para os vacúolos.

Fitoquelatinas são pequenos polipeptídeos, ricos em cisteína e que se ligam a metais pesados com estrutura geral  $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{Gli}$  ( $n = 2-11$ ). Estas estão presentes não apenas em plantas, bem como em fungos e outros organismos. A enzima responsável pela catalisação da sua síntese é a fitoquelatina sintase (YADAV, 2010).

As fitoquelatinas formam complexos com íons metálicos tóxicos no citosol, em seguida, eles são transportados para o vacúolo. Assim, as plantas são protegidas do efeito deletério dos metais pesados. (SALT et al. 1995).

A partir de informações obtidas por meio de revisão bibliográfica e de especialista locais optou-se por trabalhar com a espécie *Cyperus rotundus* pertencente à Família Cyperaceae. De acordo com SUBHASHINI e SWAMY (2013) em experimentos realizados com esta espécie foi verificado que ela acumulou 16.35 mg/kg de cádmio em 60 dias, partindo de uma concentração inicial de 0,52 mg/kg. Estes níveis de acumulação de cádmio nesta planta indicaram que *C. rotundus* é uma boa acumuladora de cádmio, bem como de outros metais.

## 1.5 – FAMÍLIA CYPERACEAE

Cyperaceae é uma família que de maneira superficial assemelha-se a gramíneas ou juncos e inclui plantas que crescem principalmente em locais

pantanosos, embora, possa ser encontrada em todos os tipos de solo, esta família é classificada como monocotiledônea e compreende 109 gêneros e aproximadamente 5.500 espécies, estas espécies são largamente distribuídas na Ásia tropical e América do Sul tropical. Espécies pertencentes à família Cyperaceae são fontes importantes de constituintes com atividade biológica (MUASYA et al., 2009; MOHAMED et al., 2015).

Apesar de serem associadas a lugares úmidos, espécies desta família tem a habilidade de adaptar-se a diversas condições ambientais. Vários *habitats* semiáridos nos quais ocorrem longos períodos de seca, contam com a presença de espécies desta família os quais sobrevivem graças a bainhas suculentas capazes de armazenar água. Outras espécies ultrapassaram o problema da baixa humidade, e tornam-se anuais, conseguindo assim, completar o seu ciclo de vida em um ou dois meses; outras ainda tornaram-se decíduas, sobrevivendo na forma de rizomas ou cormos. Alguns gêneros são pioneiros na colonização de dunas costeiras (MACHADO, 2007).

Dentre alguns benefícios oferecidos por espécies da família Cyperaceae, está sua contribuição para o controle da erosão e a purificação da água nas áreas pantanosas e ribeirinhas. Quando erradicadas, todo o ecossistema sofre drásticas alterações, como desaparecendo zonas de nidificação e de proteção de mamíferos e animais aquáticos (MACHADO, 2007).

A Cyperaceae é uma família rica em metabólitos secundários nos quais estão inclusos ácidos fenólicos, sesquiterpenos, flavonoides, taninos, alcalóides e cumarinas (AWAAD et al., 2012).

### **1.5.1 – O Gênero *Cyperus***

Em várias sociedades industrializadas, a prescrição de drogas de origem vegetal constitui um elemento na manutenção de saúde. Plantas medicinais são um importante componente de investigação na indústria farmacêutica. Tal pesquisa se concentra no uso direto e isolamento de constituintes medicinais ativos, ou sobre o desenvolvimento de fármacos semissintéticos, ou ainda no rastreio de

produtos naturais ativos para produzir compostos sintéticos farmacologicamente ativos (HOAREAU & DASILVA, 1999).

O gênero *Cyperus* pertencente à família Cyperaceae compreende espécies amplamente usadas na medicina tradicional em todo o mundo para o tratamento de muitas doenças, principalmente em países asiáticos como Paquistão, Índia e China (BHAGWAT et al., 2009; SINGH et al.; 2012).

*Cyperus* é conhecido em chinês como "Xiang Xiang fu ou Fuzi" que significa perfumado, normalmente espécies do gênero são utilizadas em fragrâncias fortes e agradáveis (perfumes e incensos) e algumas na culinária (YANG, 2002 Apud ZAFAR et al., 2011). Este gênero inclui cerca de 600 espécies, algumas das quais são utilizados na medicina popular, uma das mais importantes é a *C. rotundus* Linn (MOHAMED et al., 2015).

#### 1.5.1.1 – Estudos químicos do gênero *Cyperus*

Foram publicadas duas revisões sobre a fitoquímica do gênero *Cyperus*, entre os grupos encontrados com mais frequência no gênero estão flavonóides, cumarinas, cromonas, estilbenos, fenilpropanóides, quinonas, ácidos fenólicos, terpenos, benzodihidrofuranos e iridóides (MOHAMED et al., 2015; MOHAMED, 2015).

##### 1.5.1.1.1 – Flavonóides e estilbenos

Flavonóides e estilbenos são produtos de uma unidade de partida cinamoil-coenzima A, com extensão da cadeia usando três moléculas de malonil-CoA. A priori, o prolongamento da cadeia 4-hidroxicinamoil-CoA com três moléculas de malonil-CoA gera um policetídeo que pode ser dobrado de diferentes maneiras. Estas permitem a ocorrência de reações de aldol ou Claisen, gerando anéis aromáticos. Assim, estilbenos ou chalconas são os produtos finais formados. Ambas as estruturas ilustram bem os diferentes padrões de oxigenação característica nos dois anéis aromáticos derivados a partir do caminho do acetato ou chiquimato. A partir das chalconas, todos os demais derivados flavonoídicos são formados (DEWICK, 2002).



Estilbenos possuem uma estrutura C6-C2-C6, sistema de ligações duplas conjugadas e na maioria dos casos quando se trata de compostos isolados a partir de fontes naturais, apresentam configuração *trans* (E) (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006 apud SANTANA, 2011).

As classes de flavonoides mais abundantes no gênero *Cyperus* são as flavonas, flavonol, flavanonas e auronas, conforme mostradas na **FIGURA 1.5.1.1.1**; bem como os estilbenos mais abundantes (MOHAMED et al., 2015).

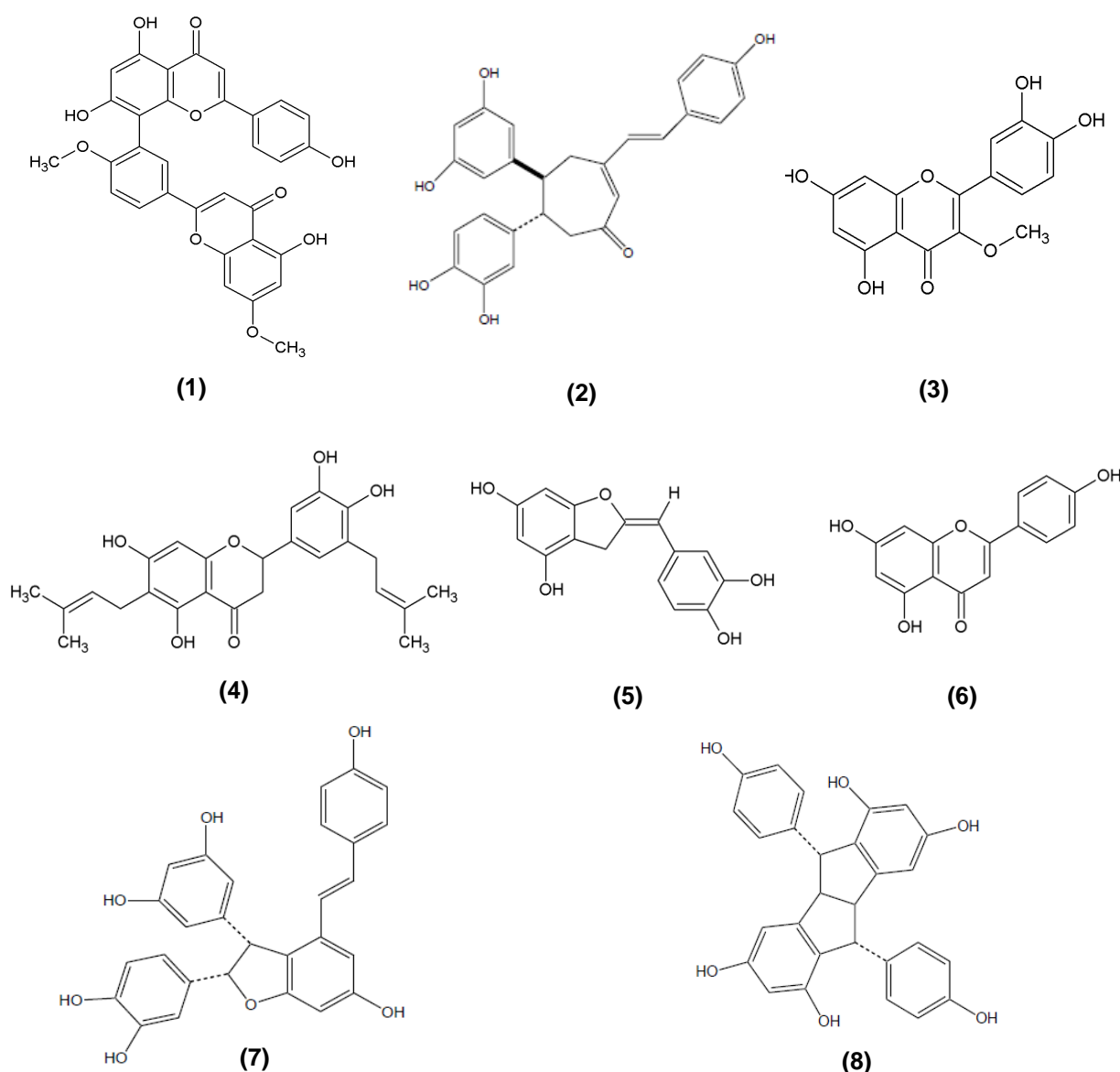


FIGURA 1.5.1.1.1 - Flavonóides e estilbenos: ginkgetina (1), logusona A (2), quercetina-3-metiléter (3), 5,7,4',5'-tetrahidroxi-6,3'-diprenilflavanona (4), aureusidina (5), apegenina (6), logusol B (7) e pallidol (8).

### 1.5.1.1.2 – Terpenos

Os terpenos são uma ampla e diversa classe de metabólitos formados pela condensação de unidades de difosfato de dimetilalila. Sua estrutura típica contém esqueleto de carbono representado por  $(C_5)_n$ . Sua classificação se dá em função do número de unidades de carbono, assim, os terpenos são classificados em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (DEWICK, 2002).

Segundo MEENA (2010) em estudos fitoquímicos dos óleos essenciais da espécie *Cyperus rotundus* foram encontrados como compostos majoritários além de alcalóides, terpenos do tipo mono e sequisterpenos. De acordo com OHIRA et al. (1998) foi relatada a presença de sesquiterpenos na espécie conforme mostrado na **FIGURA 1.5.1.1.2**.

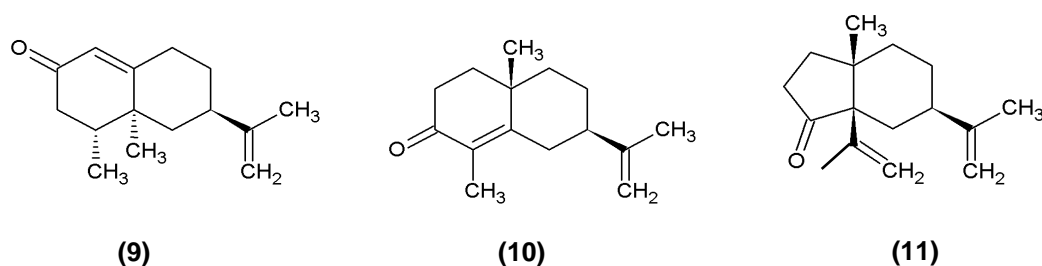


FIGURA 1.5.1.1.2 – Terpenos: sesquiterpenos do tipo eudesmano (9) e (10), Ciperolona (11).

### 1.5.1.1.3 – Fenilpropanóides e ácidos fenólicos

A sequência reductiva a partir de um ácido cinâmico apropriado para o álcool correspondente de cinamil é utilizado para a produção de diversos derivados fenilpropanóides. Quanto aos ácidos fenólicos, estes são produtos naturais estruturalmente simples, porém o que é surpreendente para essa classe de compostos é a quantidade de caminhos diferentes que podem levar à biosíntese dos mesmos. Os caminhos biossintéticos para o mesmo composto podem ser bastante diferentes de acordo com o organismo, e por vezes pode existir mais de um percurso em um único organismo (DEWIK, 2002).

Uma série de ácidos fenólicos tais como os mostrados na **FIGURA 1.5.1.1.3**: ácido vanílico (12); ácido elágico (12); isoaragoside (a), chionoside A (b) e



1999; ALLAN et al., 1969; ALLAN et al. 1978), conforme mostrado na **FIGURA 1.5.1.1.4.**

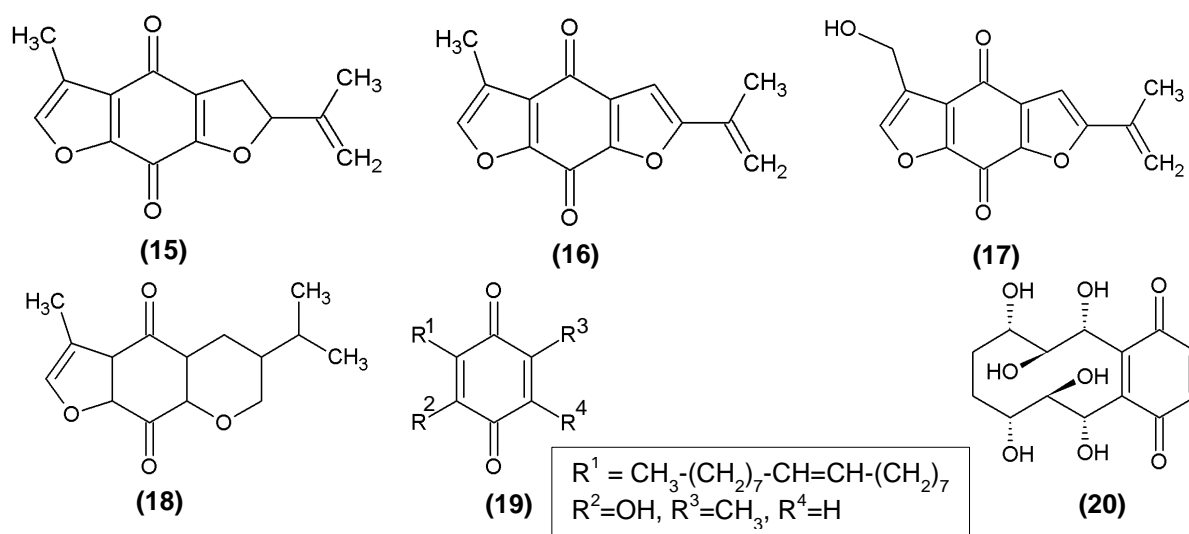


FIGURA 1.5.1.1.4 – Quinonas: dihidrociperquinona (15), ciperquinona (16), hidroxiciperquinona (17), scalbiquinone (18), hidroxidietrichequinona (19) e alopecuquinone (20).

#### 1.5.1.1.5 – Cumarinas

A hidroxilação de ácidos cinâmicos *orto* à cadeia lateral é uma etapa crucial na formação de um grupo de lactonas derivadas do ácido cinâmico, as cumarinas, estas, são largamente distribuídas nas plantas, tanto na forma livre quanto na forma glicosilada (DEWIK, 2002).

As cumarias pimpinellina (21), bergapteno (22) e escopoletina (23), foram identificadas em *Cyperus papyrus*, *Cyperus alopecuroides* e *Cyperus incompletus*, repectivamente (ANTONIO et al., 1993; AWAAD et al., 2012), conforme mostrado na **FIGURA 1.5.1.1.5.**

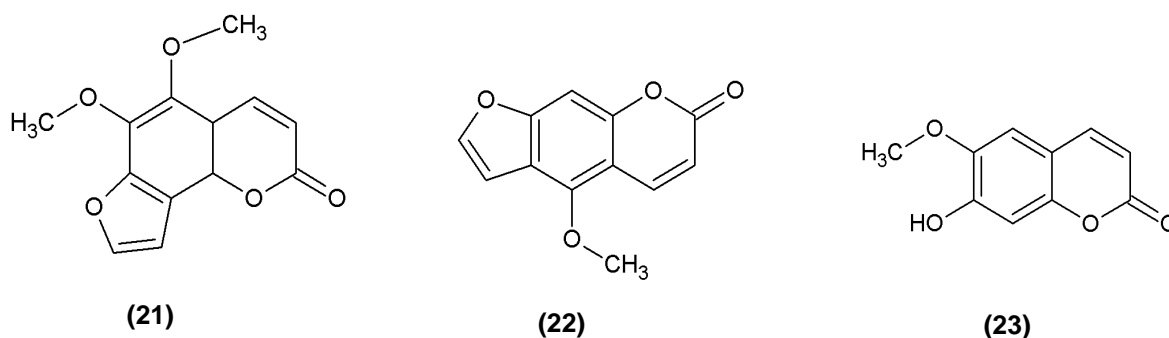


FIGURA 1.5.1.1.5 – Cumarinas: pimpinellina (21); bergapteno (22), escopoletina (23).

### 1.5.1.2 – *Cyperus rotundus*

*C. rotundus* Linn. (**FIGURA 1.5.1.2**) é uma planta da família Cyperaceae. Esta planta também é conhecida como tiririca, capim-tiririca ou *nutgrass* (Inglês), *motha* (Hindi) ou *musta* (Sânscrito). A esta erva tem sido dado especial reconhecimento na Ayurveda, devido a seus benefícios terapêuticos multifacetados para cura várias doenças (SINGH et al., 2012).



FIGURA 1.5.1.2 – *Cyperus rotundus* L.  
Fonte: PEERZADA et al. (2015)

*C. rotundus* apresenta rota fotossintética C4, por esta razão é altamente eficiente na assimilação do CO<sub>2</sub> atmosférico e, conseqüentemente, na sua conversão em carboidrato. No entanto, para que as espécies C4 realizem com eficiência a fotossíntese, elas necessitam desenvolver-se em condições de alta temperatura e luminosidade, uma vez que esta rota é altamente eficiente em regiões quentes. Assim, *C. rotundus* é pouco competitiva em condições de baixa temperatura e/ou intensidade luminosa, à seca ou com alto nível de salinidade. Quando na presença de condições ambientais favoráveis (temperatura elevada e intensa luminosidade), estabelece-se rapidamente devido ao intenso crescimento vegetativo (SILVA, 2001; JAKELAITIS et al., 2003).

### 1.5.1.2.1 – Morfologia de *C. rotundus*

*C. rotundus* é uma planta perene, reproduz-se por sementes, embora menos de 5% destas formadas sejam viáveis. Deste modo, a principal via de multiplicação são os tubérculos (**FIGURA 1.5.1.2.1**) e bulbos subterrâneos. Em baixas temperaturas, o seu desenvolvimento e multiplicação se dão com lentidão, conforme relatado anteriormente, enquanto que em temperaturas elevadas apresenta boa tolerância, segundo relatos, não é conhecida outra espécie vegetal que tolere temperaturas mais altas que *C. rotundus* (PASTRE, 2006).



FIGURA 1.5.1.2.1 – Tubérculos de *Cyperus rotundus* L.  
Fonte: FANTI, (2008).

Essa espécie possui uma grande capacidade de sobrevivência em condições adversas, quer sejam em períodos prolongados de seca, quer sejam em inundação de terrenos. Seus tubérculos perdem a viabilidade se dessecados e o número de tubérculos inviáveis na área pode ser reduzido, caso haja o revolvimento do solo em época seca. A parte aérea é sensível a sombreamentos, podendo até mesmo ser eliminada sob condições de sombreamento prolongado (PASTRE, 2006).

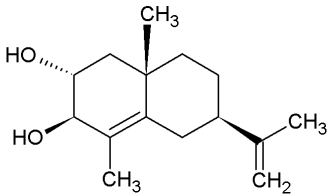
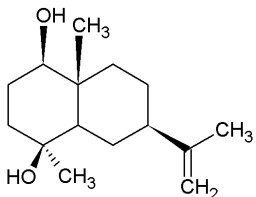
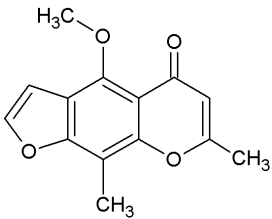
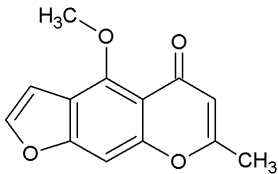
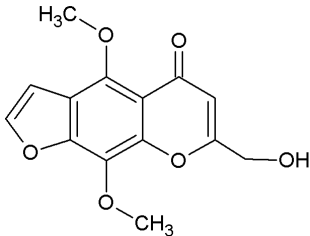
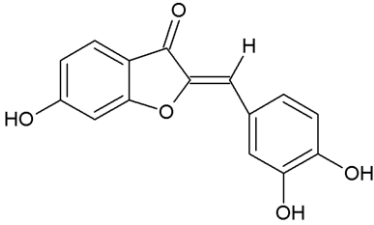
Em condições climáticas brasileiras, *C. rotundus* apresenta-se como uma planta herbácea com porte entre 15-50 cm. Pelo intenso desenvolvimento de cadeias de pseudo-tubérculos no solo formam-se clones de tamanhos consideráveis. Dos bulbos basais e tubérculos de *C. rotundus* são formados extensos sistemas de rizomas que se desenvolvem horizontalmente e verticalmente podendo se aprofundar em até 40 cm (PASTRE, 2006).

Esta espécie é uma planta medicinal tradicional largamente utilizada como analgésico, sedativo, antiespasmódico, anti-malária, contra doenças do estômago e para aliviar a diarreia. Estudos realizados em animais e seres humanos têm comprovado essas atividades farmacológicas. Os turbéculos de *C. rotundus* podem ser usados para o tratamento da dismenorreia e irregularidades menstruais. A infusão pode ser usada contra dores, febre, diarreia, disenteria e outros problemas intestinais incluindo anti-inflamatório, antidiarreico, antidiabético, antitérmicos, entre outras (MEENA, 2010; SINGH et al., 2012).

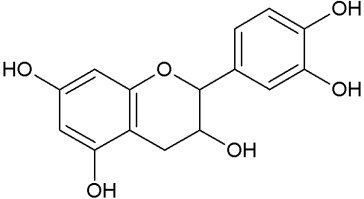
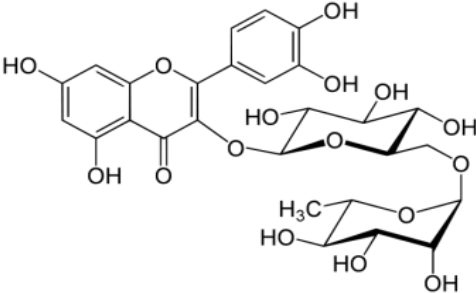
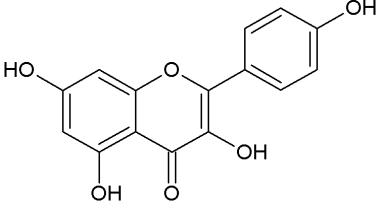
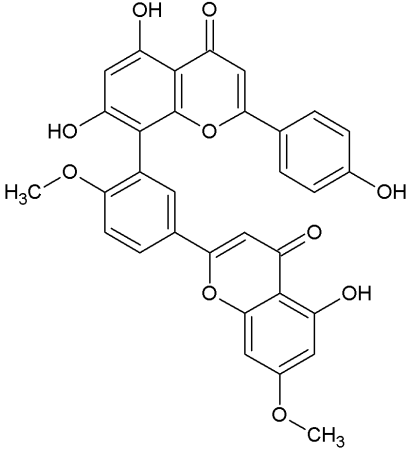
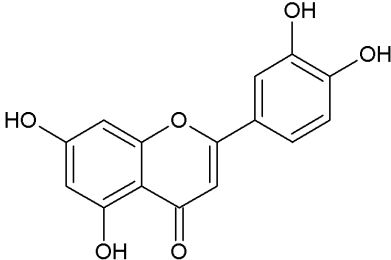
#### 1.5.1.2.2 – Estudos químicos de *C. rotundus*

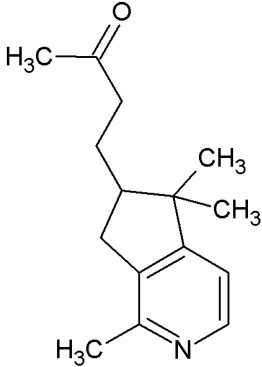
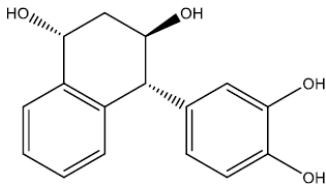
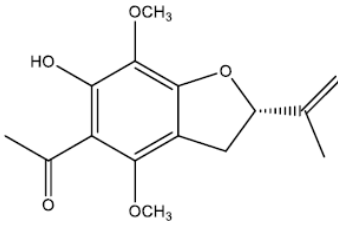
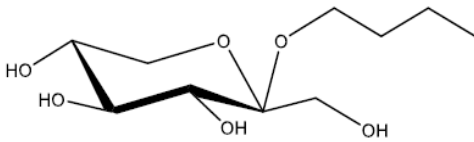
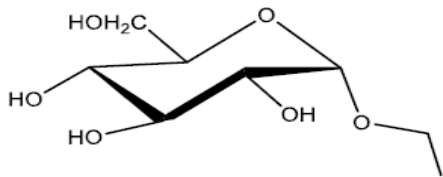
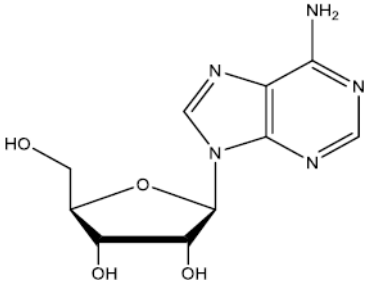
Além de compostos relatados como sendo comum em espécies do gênero *Cyperus*, como flavonoides, cumarinas, estilbenos, fenilpropanóides e ácidos fenólicos, estudos fitoquímicos de *Cyperus rotundus* mostraram que ela apresenta cromonas, alcalóides, iridóides, benzodihidrofuranos, esteróis e taninos (JEONG et al., 2000; SAYED et al., 2007; KILANI et al., 2008; AL-DAODY et al., 2010; ZHOU & YIN, 2012; JAHAN et al., 2013; ZHOU & FU; KUMAR et al., 2014; MOHAMED et al., 2015; KIM et al., 2013; KRISHNA & RENU, 2013; MOHAMED, 2015). Alguns desses compostos estão apresentados na **TABELA 1.5.1.2.2**.

TABELA 1.5.1.2.2 – Compostos representantes das principais classes de compostos isolados a partir de *C. rotundus*.

Composto	Estrutura	Parte da planta
Britanlina E		Rizomas
1 $\beta$ ,4 $\beta$ -dihidroieudesma-11-eno		Rizomas
Khellina		Partes aéreas
Visnagina		Partes aéreas
Ammiol		Partes aéreas
Sulferetina		Raízes



<p>Catequina</p>		<p>Raízes e Partes aéreas</p>
<p>Rutina</p>		<p>Rizomas</p>
<p>Kaempferol</p>		<p>Tubérculos e partes aéreas</p>
<p>Ginkgetina</p>		<p>Rizomas</p>
<p>Luteolina</p>		<p>Rizomas e partes aéreas</p>

<p>Rotundino A</p>		<p>Rizomas</p>
<p>1<math>\alpha</math>,3<math>\beta</math>-Dihydroxy-4<math>\alpha</math>-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin</p>		<p>Rizomas</p>
<p>1-[2,3-Dihidro-6-hidroxi-4,7-dimethoxi-2S-(prop-1-en-2-il)benzofuran-5-il]etanona</p>		<p>Rizomas</p>
<p><i>n</i>-Butil-<math>\beta</math>-D-fructopiranosido</p>		<p>Partes aéreas</p>
<p>Etil-<math>\beta</math>-D-glucopiranosido</p>		<p>Partes aéreas</p>
<p>Uridina</p>		<p>Partes aéreas</p>

## 1.6 – ICP-AES

Nos últimos 30 anos, um dos mais importantes desenvolvimentos na espectrometria atômica analítica foi a utilização da pressão atmosférica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP) como fonte de excitação para vaporização e espectrometria de emissão atômica (ICP-OES) e como uma fonte de vaporização e ionização por espectrometria de massa inorgânica (ICP-MS) (MONTASER & GOLIGHTLY, 1993).

Ambas as técnicas, comercializadas em 1974 e 1983, respectivamente, revolucionaram o campo de análise de traços de elementos ao longo dos últimos 20 anos. Desde 1983 até os dias atuais estima-se que mais de 17.000 sistemas de Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), (ICP-AES, do inglês “*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*”) tenham sido instalados (MONTASER & GOLIGHTLY, 1993; THOMAS, 2001). Na atualidade, ICP-AES é uma técnica multielementar bem estabelecida, mostrando-se uma alternativa interessante na análise de rotina de combustíveis devido ao menor custo (quando comparado ao ICP-MS) e robustez (KIRKBRIGHT et al., 1972).

ICP-AES é a mensura da luz emitida pelos elementos de uma amostra introduzida em uma fonte de ICP. Uma vez medidas as intensidades de emissões, estas são então, comparadas com as intensidades conhecidas de concentrações dos padrões objetivando a obtenção das concentrações elementares na amostra desconhecida. (PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, 2004).

## 1.7 – FINGERPRINTING

Uma série de fatores pode influenciar na variação da composição química das plantas, tais como, tipo de solo, efeitos sazonais, incidência solar, presença de insetos, entre outros. Assim, com a finalidade de gerar resultados mais confiáveis que viessem abranger tamanha variabilidade e com probabilidade de erro reduzida, técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para obter informações de um conjunto de metabólitos característicos de uma dada espécie e compor um perfil químico chamado *fingerprint* ou “impressão digital” química (ASSIS, 2014).

O *fingerprinting* pode ser definido como uma abordagem de triagem imparcial e global de um conjunto de amostras em que um grande e diferente número de metabólitos é avaliado, a finalidade do *fingerprinting* é comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos com base em padrões metabólicos ou "impressões digitais" que podem apresentar alterações em resposta a uma doença, exposição a uma toxina, perturbações genéticas ou ambientais, sem que haja a intenção de identificar cada metabólito detectado, podendo ainda identificar substâncias discriminantes ou marcadores (DETTMER et al., 2007; CABRAL, 2010). Um esquema geral de uma análise de *fingerprinting* é mostrado na **FIGURA 1.7**.

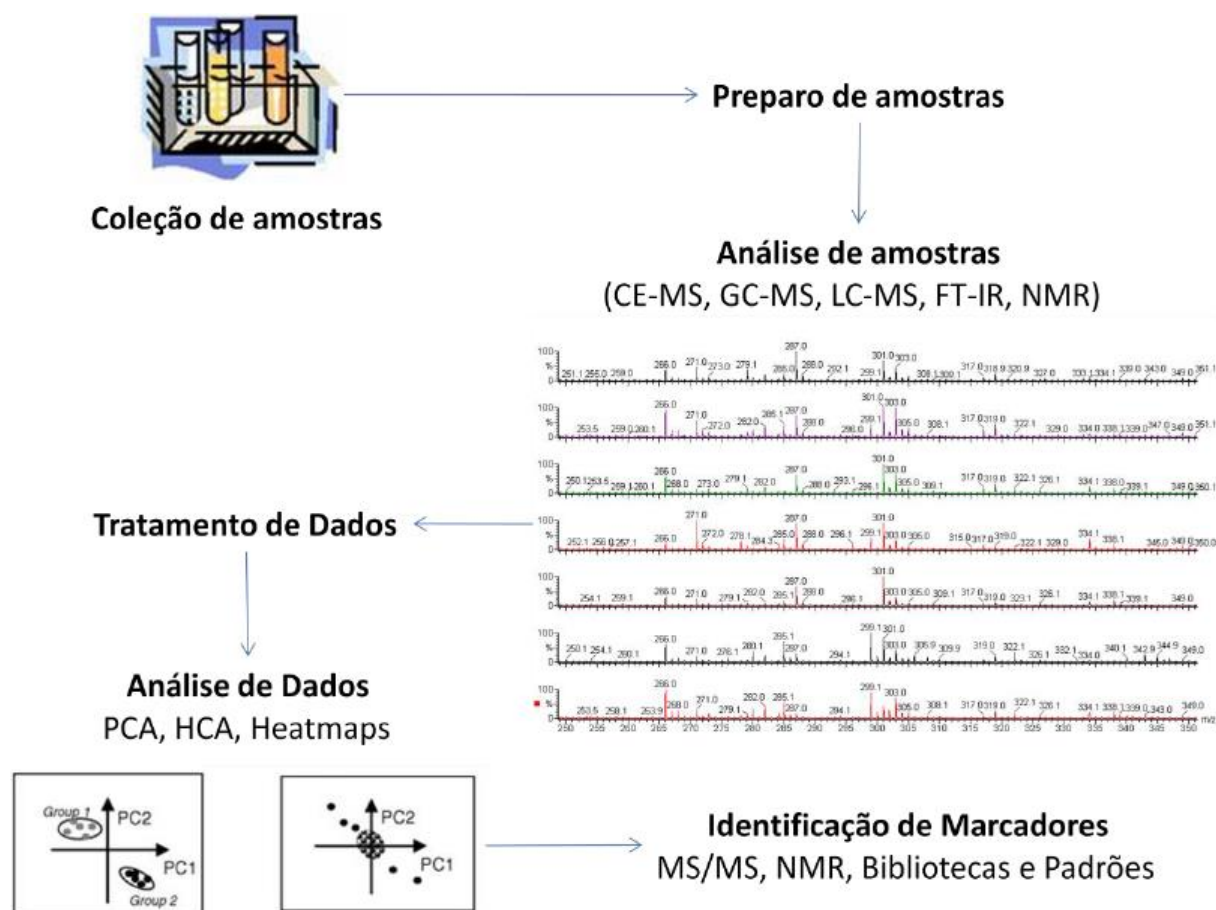


FIGURA1.7 – Esquema simplificado para uma análise de *fingerprinting*.  
 FONTE: CABRAL, 2010.

Perfis (*"fingerprints"*) podem ser utilizados visando à comparação entre diferentes tipos de amostras, em que informações relevantes como, por exemplo, a presença ou ausência de determinadas substâncias e/ou diferenças muito pequenas

podem ser detectadas (BRADLEY et al., 1998). Em muitos casos, a avaliação de perfis é feita através de uma análise visual direta, por comparação entre um perfil proveniente de uma amostra padrão e de uma amostra alvo. Com o desenvolvimento de técnicas quimiométricas, atualmente as análises dos perfis são realizadas através de tratamento matemático e estatístico, simplificando a visualização e interpretação dos resultados de amostras complexas (LIRA, 2010).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a obtenção de *fingerprints* de uma matriz, neste contexto uma das opções é a utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (LIRA, 2010; ASSIS, 2014).

A ressonância magnética nuclear é uma das principais ferramentas utilizadas para elucidação estrutural de compostos orgânicos e organometálicos, sua importância consiste nas suas mais variadas aplicações, esta técnica oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado (PAVIA et al., 2010; SILVA, 2010).

## 1.8 – QUIMIOMETRIA

O número de variáveis que podem ser medidas para uma única amostra é uma característica muito interessante dos instrumentos modernos. Quando o número de amostras a ser analisado é grande, a elevada quantidade de informações contida em um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tem a interpretação visual de seus respectivos dados dificultada. Neste contexto, métodos quimiométricos têm ganhado cada vez mais destaque e vêm sendo aplicados com sucesso em dados espectrais. Assim, a quimiometria surgiu como uma nova e mais sofisticada ferramenta para tratar e extrair informações relevantes dos dados, apresentando-os de forma mais simplificada. Portanto, diz-se que a quimiometria através da aplicação de modelos matemáticos e estatísticos, tem como especialidade a análise de dados químicos cuja natureza seja multivariada (TAVARES, 2007; DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2003 apud BOFFO, 2009; BELLETE, 2013).

Deste modo, um grande número de variáveis está envolvido na extração de informações dos resultados em um experimento químico. Em muitos casos faz-se necessário tomar a decisão sobre quais variáveis são importantes para

o estudo em questão, haja vista que a grande maioria das variáveis contém informações pouco relevantes à interpretação dos dados em termos químicos, esta decisão é feita de modo intuitivo (subjetivo), baseada na experiência do profissional. É possível a obtenção da redução de variáveis através de critérios objetivos e isso é realizado por meio da análise de componentes principais (PCA, do inglês "*Principal Component Analysis*"), em que é permitida a construção de gráficos bidimensionais contendo o maior número de informações estatísticas possíveis. Outra possibilidade é a construção de agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades utilizando todas as variáveis disponíveis, através da técnica de análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês "*Hierarchical Cluster Analysis*"), na HCA, os resultados são apresentados em forma de dendrogramas. Os grupos com menor distância (maior similaridade) são ligados em um novo grupo até que permaneça apenas um. Os grupos podem ser ligados através do método de conexão simples, conexão completa ou conexão incremental. Os dendrogramas possibilitam a visualização das diferentes ligações, em que o comprimento dos ramos é proporcional à distância entre os grupos ligados (TAVARES, 2007; BELLETE, 2013).

### **1.8.1 – PCA**

A Análise dos Componentes é uma análise exploratória que tem como finalidade básica reduzir dados a partir de combinações lineares das variáveis originais (SENA et al., 2000). Na PCA, a representação dos dados originais é feita por novas variáveis (ou eixos) e estas são chamadas de componentes principais (*Principal Components – PCs*), estes são ortogonais entre si e ordenados em termos da quantidade de variância explicada pelos dados, normalmente as primeiras PCs explicam a maior parte dessas variâncias totais e podem ser usadas para representar estes dados. Já a segunda PC independe da primeira e esta contém o máximo da quantidade de variação não explicada por ela. Há uma relação entre o número de componentes principais que pode existir e o número de variáveis do conjunto, valor este, que não pode ser ultrapassado (SENA et al., 2000; PARREIRA, 2003; BOFFO, 2009).

Na análise por PCA podem ser gerados dois tipos de gráficos, sendo eles gráficos de *scores* e *loading* (**FIGURA 1.8.1**), nos quais os dados são projetados em eixos que correspondem às PCs. Faz-se necessário a compreensão de que os *scores* fornecem a composição das CPs em relação aos objetos (amostras) enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis (SENA et al., 2000; JALALI-HERAVI et al., 2004).

Haja vista que as PCs são ortogonais, através dos gráficos de *scores* (**FIGURA 1.8.1A**) é possível examinar as relações entre as amostras. As distâncias entre elas implicam em aproximações das distâncias no espaço multivariado; fazendo com que grupos (*clusters*) de amostras similares possam ser detectados visualmente. Cada ponto corresponde a uma variável no gráfico de *loadings* (**FIGURA 1.8.1B**), nestes são mostradas as similaridades e as correlações entre tais variáveis. O gráfico também evidencia quais variáveis são responsáveis pelas posições relativas das amostras no gráfico de *scores*. Variáveis cujos valores de *loadings* são pequenos estão localizados perto da origem e têm em média pouca influência sobre a estrutura dos dados. Em contrapartida, uma variável com valores elevados de *loadings* para uma PC deslocará a amostra para a região correspondente a esta PC no gráfico de *scores*. Portanto, esses gráficos apresentam informações úteis sobre tendências subjacentes e características da estrutura dos dados, tais como, agrupamentos de amostras ou variáveis e caracterização dos chamados *outliers* (amostras mal comportadas, que não se encaixam no modelo). O estudo conjunto de *scores* e *loadings* possibilita estimar a influência de cada variável em cada amostra (SENA et al., 2000; JALALI-HERAVI et al., 2004).

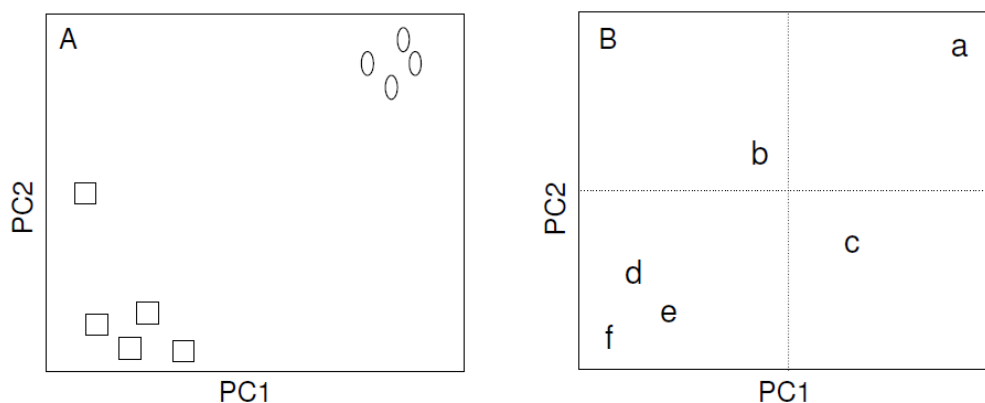


FIGURA 1.8.1 – Um exemplo simples de gráficos de (A) *scores* e (B) *loadings*. O gráfico de *scores* mostra dois grupos de amostras e uma anômala (*outlier*). No gráfico de *loadings* pode-se ver que a variável **a** é importante para a discriminação das amostras localizadas no canto direito superior do gráfico de *scores*; as variáveis **d**, **e** e **f** são características para as amostras no canto inferior esquerdo; já as variáveis **b** e **c** estão próximas a origem do gráfico de *loadings* e, portanto, têm uma pequena influência na discriminação.

FONTE: BOFFO, 2009.

## 1.9 – HPLC-UV-SPE-NMR

A técnica de HPLC-SPE-NMR (**FIGURA 1.9.1**) mostrou ser útil para a identificação de alguns constituintes naturais e metabólitos de fármacos. Dentre muitas das vantagens oferecidas por esta técnica em detrimento das técnicas HPLC-NMR convencionais, destacam-se: (i) múltiplos aprisionamento pelo cartucho de SPE para aumentar a quantidade de amostra e, conseqüentemente, a sensibilidade; (ii) a secagem do cartucho usando um gás inerte ( $N_2$ ), para reduzir os efeitos de solvente/tampão nos dados de RMN para evitar a decomposição de compostos aprisionados que são instáveis ao oxigênio; e (iii) simplificar os espectros de RMN usando um único solvente (*d*-solvente) (LEE et al., 2007).

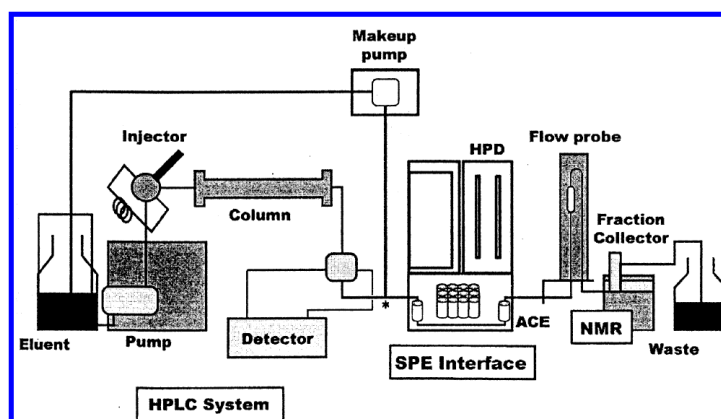


FIGURA 1.9.1 – Representação esquemática de HPLC-DAD-SPE-NMR adotada a partir do website da Bruker Biospin GmbH.



Os sistemas modernos HPLC-SPE-NMR são operados em um modo totalmente automatizado. Uma vez realizada a separação cromatográfica geralmente numa coluna de HPLC de fase reversa utilizando solventes não-deuterados, os picos de interesse são direcionados para pequenos cartuchos de SPE (geralmente 2 x 10 mm) com um solvente capaz de reter a substância a ser analisada. São fornecidas em uma variedade de maneiras as funções de parar e iniciar sinais para o aprisionamento por SPE, incluindo limites de absorção ultravioleta em vários comprimentos de onda (*threshold*), sinal de MS (nível total de corrente de íons ou nível do cromatograma de íons extraídos), ou tempo de retenção cromatográfica. Alternativamente, a captura pode ser acionada manualmente. Também é possível a fixação de compostos por SPE por intervalos de tempo (*time-slice*) e pode ser utilizado para assegurar que as faixas de cromatogramas com picos não aparentes, fracos, que não absorvem no UV ou são pouco ionizáveis sejam capturados. Um fluxo de composição de água é adicionado pós-coluna com a fase móvel para diminuir a força eluotrópica, facilitando, portanto, o processo de extração em fase sólida. Subsequentemente, os cartuchos de SPE contendo analitos de picos de HPLC individuais são secos usando gás nitrogênio pressurizado, depois os compostos são eluídos com um pequeno volume de solvente deuterado para análise por RMN (KESTING et al., 2011), conforme mostrado na **FIGURA 1.10.2**.

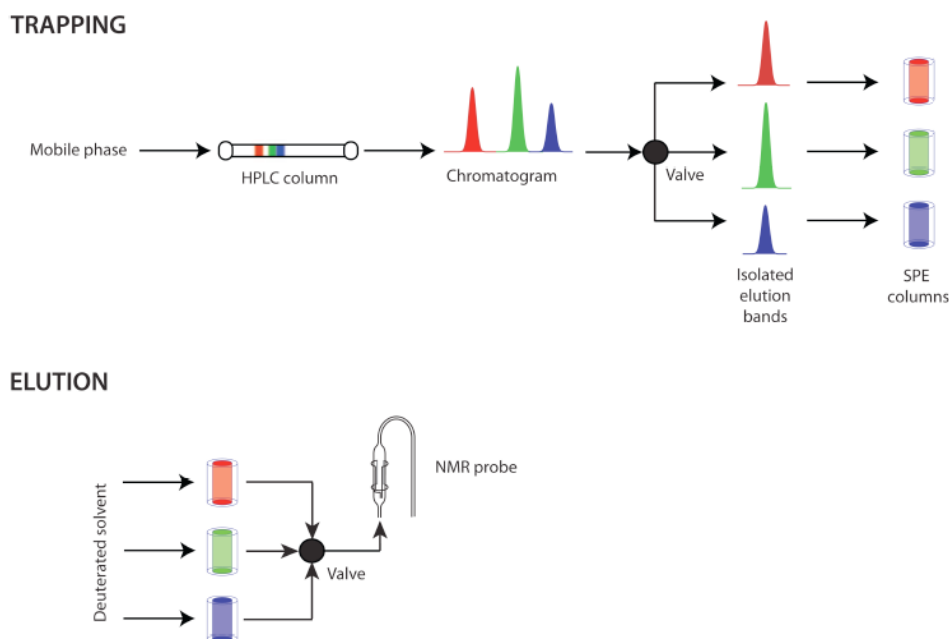


FIGURA 1.9.2 – Princípios de HPLC-SPE-RMN. Os compostos eluídos a partir da coluna cromatográfica são dirigidos para cartuchos de SPE individuais e em sequência eluídos na sonda de fluxo RMN. Em alternativa, o fluido SPE pode ser recolhido em microtubos de RMN. Fonte KESTING et al., 2011.

## 1.10 – HPLC-MS

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência combinada com a espectrometria de massas na análise e caracterização de produtos naturais tem sido reconhecida como um importante progresso. Com razão, embora seja de alto custo, o uso de um espectrômetro de massa (MS) com um detector de HPLC fornece excelente sensibilidade e seletividade para a análise de produtos naturais em matrizes biológicas complexas. Além disso, a detecção obtida no espectrômetro de massas fornece *online* informações estruturais importantes (íons fragmentos, fórmula molecular, etc.) que são cruciais para desreplicação e rápida caracterização em uma variedade de produtos naturais (HERDERICH et al., 1997; WOLFENDER, 2009).

Para a análise de compostos polares, um dos métodos de escolha é HPLC combinado com espectrometria de massas (HERDERICH et al., 1997), este foi um dos motivos da utilização deste equipamento, dentre outros, para o desenvolvimento desta pesquisa.

# ***OBJETIVOS***



## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVOS GERAIS

Realizar análises da variação do perfil químico e da capacidade na absorção de metais da espécie vegetal *C. rotundus* (popularmente conhecida como Tiririca), coletada na área de rejeito da empresa VALE na Mina do Sossego em Canaã dos Carajás (área contaminada por metais) frente à mesma espécie vegetal coletada em uma área adjacente à Mina do Sossego (área não contaminada por metais).

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a variação entre os perfis químicos das plantas contaminada e não contaminada da espécie *C. rotundus*, através da obtenção de *fingerprints* por RMN aliados a métodos quimiométricos;
- Desenvolver condições para análises de componentes de *C. rotundus* (HPLC-UV-MS e HPLC-UV-SPE-NMR) para determinações estruturais;
- Realizar teste de determinação de metais na espécie estudada a fim de avaliar seu potencial na absorção de metais, através do desenvolvimento das condições para análises por ICP-AES;
- Buscar maiores informações a respeito da influência de absorção de metais pesados sobre o perfil químico de *C. rotundus*.

***PROCEDIMENTO  
EXPERIMENTAL***

### 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A moagem das amostras vegetais, a preparação dos extratos vegetais, identificação das substâncias e estudos analíticos da variação do perfil químico foram realizados nos laboratórios de pesquisa dos grupos de Produtos Naturais e Ressonância Magnética Nuclear; os experimentos de determinação de metais foram realizados no laboratório do Grupo de Análise Instrumental Aplicado, todos os laboratórios pertencentes ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

#### 3.1 – MATERIAIS

##### 3.1.1 – Eluentes

- Água ultrapura, obtida no Ultrapurificador de Água Master System REV 1,0 (Gehaka);
- Solventes deuterados (Acros Organics, Aldrich Chemical Company e Merck), para obtenção de espectros de RMN;
- Solventes grau HPLC (Merck, J. T. Baker, Panreac), para realização de análises cromatográficas, em cromatografia líquida de alta eficiência e técnicas de extração analítica;
- Solventes grau massas (J.T. Baker e Panreac) para realização de análises espectroscópicas de massas acopladas a HPLC;
- Solventes comerciais destilados no Departamento de Química (DQ) da UFSCar, para obtenção dos extratos e frações.
- Soluções estoque monoelementares contendo  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  de Al, Fe, Cr, Cu, Zn, As, Cd e Pb.
- $\text{HNO}_3$  65 % sub-destilado a partir de um sistema Distillacid (Berghof, Alemanha).
- $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m.m<sup>-1</sup> (Synth, Brasil).

##### 3.1.2 – Coluna

Coluna para HPLC, HPLC-SPE-NMR e HPLC-MS:

- Coluna Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,60 mm, partículas de 5 µm).

### **3.1.3 – Filtro**

- Filtro de Seringa (PVDF), polar e não polar de 15 mm x 0,20 µm (Chromafil®).

### **3.1.4 – Micropipetas, tubos e ponteiras**

- Micropipetas da marca Eppendorf de 5- 10 µL, 10- 100 µL e 100- 1000 µL;
- Micropipeta Autoclavada da marca Boeco de 1000 µL;
- Tubos de RMN Boro Eco 7 polegadas - 178 mm x 5 mm (Deutero);
- Microtubo tipo *Eppendorf* graduado neutro 1,5 mL Lote 23082014B;
- Ponteira para pipeta automática 100-1000 µL Lote 232931-S (Sorenson BioScience).

## **3.2 – EQUIPAMENTOS**

### **3.2.1 – Evaporadores rotativos**

- BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo ThermoFlex-900 mantido a 7 °C;
- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo ThermoFlex-900 mantido a 7 °C;
- BUCHI, rotavapor R-205 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo ThermoFlex-900 mantido a 7 °C.

### **3.2.2 – Balanças Analíticas**

- A&D Company limited, modelo GH-202;
- Bel Engineering, modelo Mark 210A;
- Mettler, modelo AE-240;
- Bioprecisa, modelo FA-2104N.



### 3.2.3 – Cromatógrafos

Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência:

- Agilent Technologies 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador interno no módulo da bomba, amostrador automático G1329B e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A.
  - Software utilizado para processamento dos dados: EZCrom Ellite – Open Lab;
- Agilent 1260 acoplado ao espectrômetro de massas, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, injetor automático G1367B e detector de arranjo de diodos (DAD) G1315D, forno de coluna G1316A.
  - Software utilizado para processamento dos dados: Analyst 1.5.1.
- Agilent 1200 acoplado ao NMR, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A.
  - Software utilizado para processamento dos dados: HyStar v. 3.2 (Bruker BioSpin GmbH).

### 3.2.4 – Purificadores de água

- Ultrapurificador de Água Master System REV 1,0 (Gehaka)
- Ultrapurificador de água Milli-Q Plus Total Water System (Millipore, Bedford, EUA), com resistividade de 18,2 MΩcm.

### 3.2.5 – Ressonância Magnética Nuclear

- Bruker Avance III – 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do  $^1\text{H}$ ) equipado com a sonda PABBI (5 mm) com uma unidade de ajuste automático da sintonia - ATMA (*Automatic Tuning and Matching*), bobina de gradiente de campo em z e amostrador automático (*SampleXpress*).
- Bruker Avance III - 14,1 T (600 MHz para frequência do RMN  $^1\text{H}$ ), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ) de 5 mm com ATMA® (*Automatic Tuning Matching*) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA®, gradiente de campo em z, unidade de temperatura

variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit® e unidade LC-SPE acoplada.

### **3.2.6 – Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP – AES)**

- Espectrômetro ICP-AES (iCAP 6000 series, Thermo Scientific, Waltham, EUA) com configuração axial.

### **3.2.7 – Forno de micro-ondas**

- Forno de micro-ondas com cavidade (Ethos 1600, Milestone, Sorisole, Itália) equipado com frascos de politetrafluoretileno (PTFE) com capacidade de 45 mL.

### **3.2.8 – Moinhos**

- Moinho de facas tipo Willye – Tecnal;
- Moinho Analítico básico ® (IKA) A 11.

### **3.2.9 – Dispersadores/Homogeneizadores**

- T 10 ULTRA-TURRAX® (IKA);
- T 25 ULTRA-TURRAX® (IKA).

### **3.2.10 – Centrífuga**

- Centrífuga marca Eppendorf, modelo 5810 R com sistema de refrigeração (Kältemittel: R134a; refrigerant: CF, CH e F).

### **3.2.11 – Bombas**

- Bomba de Vácuo e compressor de ar marca Primatec, modelo BBV-131 tipo 2VC.

### 3.2.12 – Agitador para tubos e banho de ultrassom

- Agitador para tubos tipo Vortex QL-901 (Biomixer);
- Banho de ultrassom com temporizador *UltraCleaner 750* (Unique).

### 3.3 – COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi coletado em novembro de 2013, pelo Prof. MSc. Fernando Kidelmar Dantas de Oliveira, na área de rejeito da Empresa Vale S. A. na região de Carajás – PA, chamada de Mina do Sossego. A planta coletada na Mina do Sossego (área contaminada por metais) foi intitulada como *Cyperus rotundus* (1) e a planta coletada de uma área adjacente à Mina do Sossego (área não contaminada por metais) foi intitulada como *Cyperus rotundus* (2). E estas, foram separadas em rizomas, parte aérea vegetativa e parte aérea reprodutiva. Os dados referentes à coleta estão representados na **TABELA 3.3**.

TABELA 3.3 – Coleta do material botânico

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Partes vegetais</b>	<b>Local e data da coleta</b>
<b><i>C. rotundus</i> (1)</b>	Rizoma (104,91 g)	Mina do Sossego (Vale S.A)
	Parte aérea vegetativa (31,80 g)	Novembro de 2013
	Parte aérea reprodutiva (10,55 g)	
<b><i>C. rotundus</i> (2)</b>	Rizoma (38,97g)	Área adjacente a Mina do Sossego
	Parte aérea vegetativa (35,76 g)	Novembro de 2013
	Parte aérea reprodutiva (14,49 g)	

## 3.4 – METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

### 3.4.1 – Preparo de amostras: digestão assistida por radiação micro-ondas e solução de ácido nítrico diluída

Os frascos e vidrarias utilizados foram previamente descontaminados em banho de HNO<sub>3</sub> 10 % v/v por 24h e posteriormente rinsados com água deionizada e secos em capela de fluxo laminar antes do uso.

Seis amostras de *C. rotundus* foram moídas utilizando moinho de analítico (item 3.2.1), e estas consistiam em: rizomas (1) e (2), partes aéreas vegetativas (1) e (2) e partes aéreas reprodutivas (1) e (2). Para a digestão das amostras, 200 mg foram pesados com exatidão em balança analítica. Em seguida, adicionados 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m.m<sup>-1</sup> e 2 mL de água destilada. Os frascos foram tampados e levados à digestão em micro-ondas com cavidade, todas as digestões foram realizadas em triplicatas. Após o resfriamento, os digeridos foram transferidos e levados a um volume final de 20 mL.

O programa de aquecimento empregado está apresentado na **TABELA**

#### 3.4.1.

TABELA 3.4.1 – Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado na digestão de amostras de *C. rotundus*.

<b>Etapa</b>	<b>Potência (volts)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Temperatura máxima (°C)</b>
1 (rampa)	1000	20	200
2 (patamar)	1000	15	200
3 (resfriamento)	0	20	–

### 3.4.2 – Determinação de metais por ICP-AES

Alíquotas de soluções estoque individuais contendo 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Al, Fe, Cr, Cu, Zn, As, Cd e Pb foram adequadamente diluídas, para preparação das curvas analíticas nas concentrações de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 50 mg. L<sup>-1</sup>, para posterior análise por ICP-AES (**FIGURA 3.4.2**).

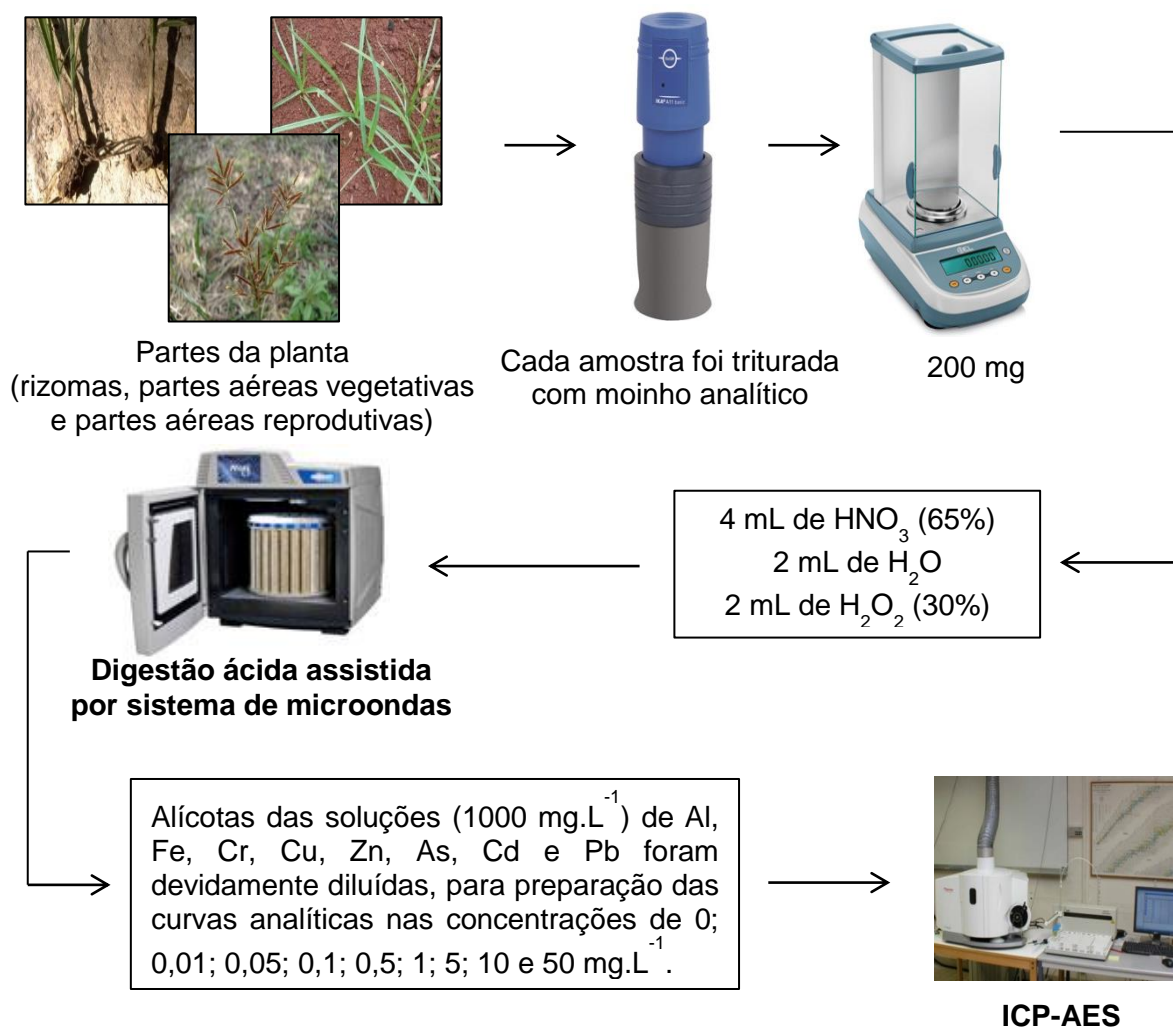


FIGURA 3.4.2 – Teste de determinação de metais por ICP-AES.

Os parâmetros instrumentais para as determinações das concentrações de metais estão apresentados na **TABELA 3.4.2**. O teste foi realizado com base em análises estatísticas em que para o tratamento dos dados obtidos foram feitos cálculos de desvio-padrão.

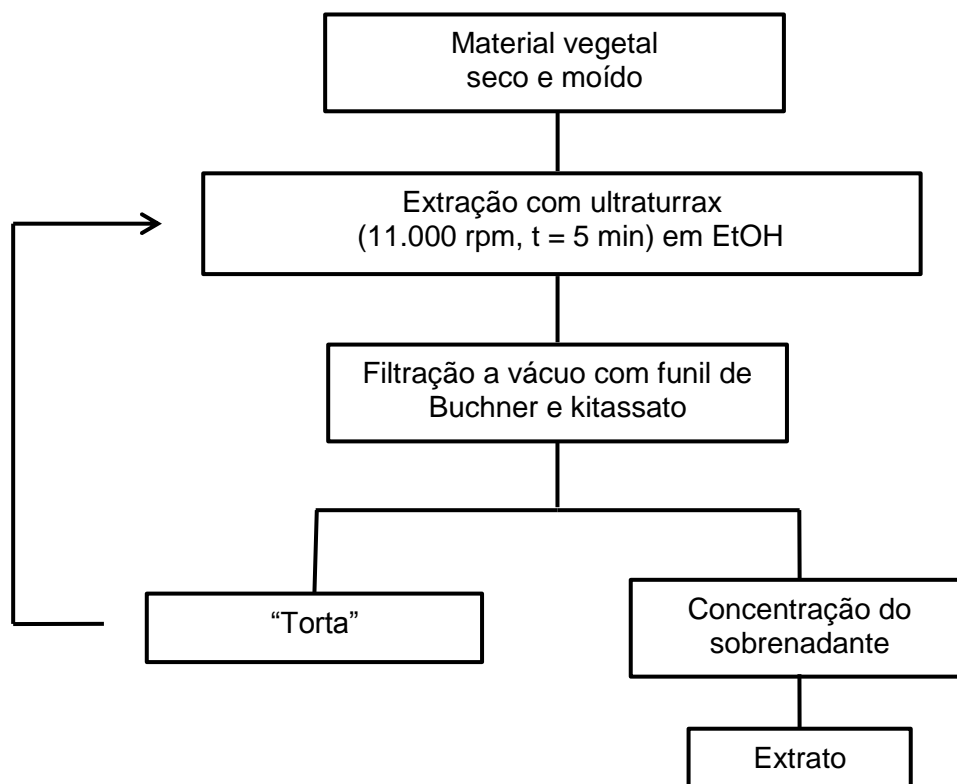
TABELA 3.4.2. – Os parâmetros instrumentais empregados nas determinações de metais em amostras de *C. rotundus*.

<b>Parâmetros instrumentais</b>	<b>Valores</b>
Potência de radiofrequência (kW)	1,15
Vazão do gás do plasma (L.min <sup>-1</sup> )	12
Vazão do gás auxiliar (L.min <sup>-1</sup> ) 1,5	0,5
Vazão do gás de nebulização (L.min <sup>-1</sup> )	0,7
Modo de visão	axial
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Linhas de emissão (nm)	
Al	308,215; 396,152
Fe	240,488; 259,940
Cr	283,563; 357,869
Cu	224,700; 324,754
Zn	202, 548; 481,053
As	189,042; 193,759
Cd	214,438; 226,502
Pb	216,999; 220,353

### 3.5 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO QUÍMICO DE *C. rotundus*

#### 3.5.1 – Preparação das Amostras

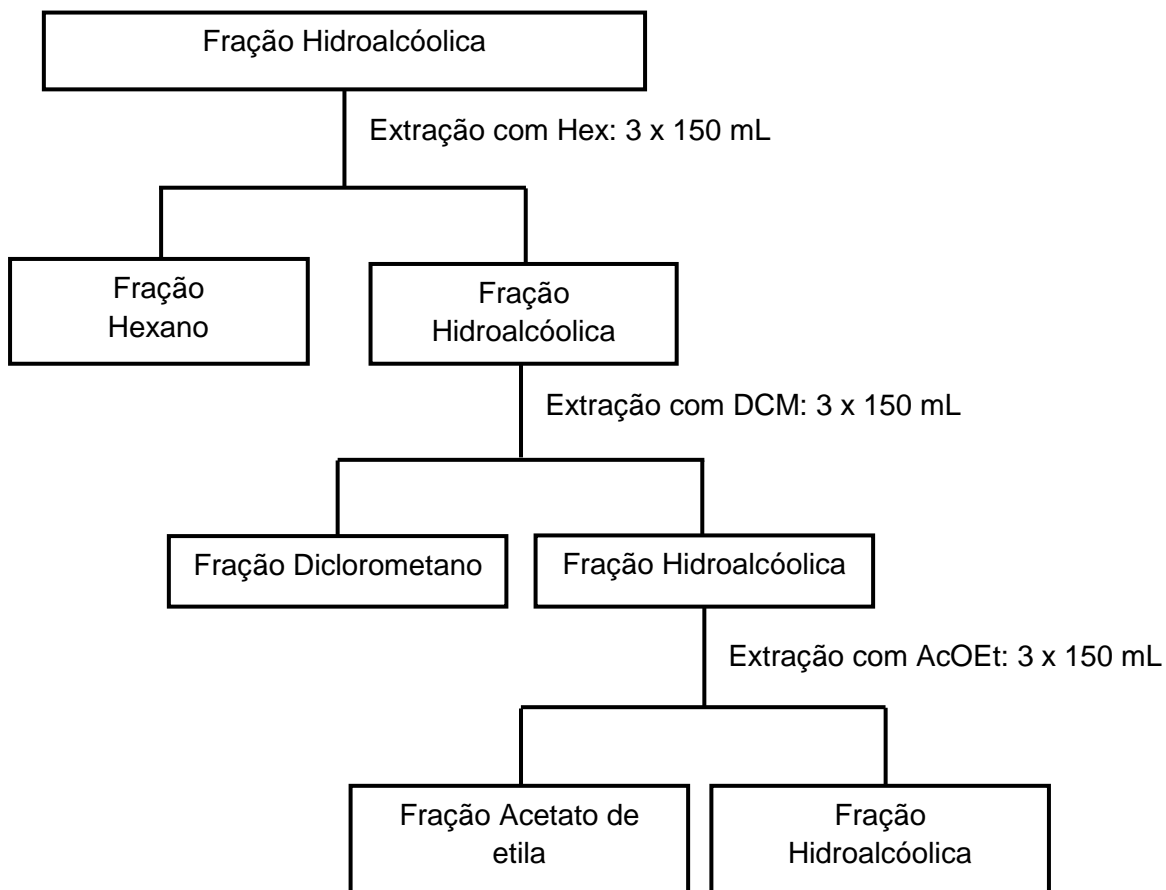
As partes das plantas já separadas foram secas em estufa a 37°C durante aproximadamente 7 dias e posteriormente trituradas em moinho de facas (item 3.2.1). Na sequência, foram submetidas a extrações a frio utilizando-se um homogeneizador/dispersor (item 3.2.8) nas seguintes condições: 11.000 rpm durante 100 segundos, no qual, foi utilizado o etanol como solvente para obtenção de todos os extratos. A escolha desse solvente deu-se a partir de levantamentos bibliográficos e também à sua baixa toxicidade aliada ao fato do etanol ser um solvente de baixa seletividade, possibilitando, portanto, a extração de uma ampla faixa de metabólitos secundários. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro comum, e ao precipitado foi adicionado mais solvente. A adição de solvente ao precipitado foi repetida algumas vezes com a finalidade de extrair o máximo de metabólitos secundários possíveis presentes no material de partida. Finalmente, os extratos foram concentrados a vácuo em evaporador rotativo (**FLUXOGRAMA 3.5.1**) e armazenados na geladeira em recipientes fechados.



FLUXOGRAMA 3.5.1 – Obtenção dos extratos dos extratos etanólicos de *C. rotundus*.

### 3.5.2 – Fracionamento dos Extratos

Os extratos etanólicos das diferentes partes de *C. rotundus* foram fracionados separadamente, através de partições líquido-líquido, em que os mesmos, foram ressuspensos em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:3), em um volume total de 300 mL. As partições foram realizadas de acordo com o **FLUXOGRAMA 3.5.2**.



FLUXOGRAMA 3.5.2 – Metodologia utilizada para obtenção das frações de *C. rotundus* através de partições líquido-líquido dos extratos etanólicos.

As massas obtidas a partir do fracionamento dos extratos etanólicos brutos de *C. rotundus* encontram-se na **TABELA 3.5.2**.



TABELA 3.5.2 – Massas das frações dos extratos etanólicos de *C. rotundus*.

<b>Partes Vegetais</b>	<b>Massas dos Extratos</b>	<b>Códigos</b>	<b>Massas das Frações</b>	<b>Códigos</b>
<b>Rizoma (1)</b>	97,92 g	R (1)	Hexânica = 34,62 g	FHR (1)
			Diclorometano = 19,11 g	FDCMR (1)
			Acetato de etila = 17,6 g	FAcOEtR (1)
			Hidroalcolica = 13,13 g	FHidR (1)
<b>Rizoma (2)</b>	33,97 g	R (2)	Hexânica = 11,85 g	FHR (2)
			Diclorometano = 6,53 g	FDCMR (2)
			Acetato de etila = 6,00 g	FAcOEtR (2)
			Hidroalcolica = 4,20 g	FHidR (2)
<b>Parte Aérea Vegetativa (1)</b>	26,85 g	PAV (1)	Hexânica = 1,97 g	FHPAV (1)
			Diclorometano = 3,31 g	FDCMPAV (1)
			Acetato de etila = 4,00 g	FAcOEtPAV (1)
			Hidroalcolica = 3,83 g	FHidPAV (1)
<b>Parte Aérea Vegetativa (2)</b>	35,67 g	PAV (2)	Hexânica = 3,43 g	FHPAV (2)
			Diclorometano = 5,71 g	FDCMPAV (2)
			Acetato de etila = 7,00 g	FAcOEtPAV (2)
			Hidroalcolica = 6,62 g	FHidPAV (2)
<b>Parte Aérea Reprodutiva (1)</b>	7,55 g	PAR (1)	Hexânica = 0,33 g	FHPAR (1)
			Diclorometano = 0,59 g	FDCMPAR (1)
			Acetato de etila = 0,72 g	FAcOEtPAR (1)
			Hidroalcolica = 0,87 g	FHidPAR (1)
<b>Parte Aérea Reprodutiva (2)</b>	10,43 g	PAR (2)	Hexânica = 0,68 g	FHPAR (2)
			Diclorometano = 1,20 g	FDCMPAR (2)
			Acetato de etila = 1,51 g	FAcOEtPAR (2)
			Hidroalcolica = 1,83 g	FHidPAR (2)

R = rizoma; PAV = parte aérea vegetativa; PAR = parte aérea reprodutiva; H = hexano; DCM = diclorometano; AcOEt = acetato de etila e Hid = hidroalcolico (a).

## 3.6 – METODOLOGIA UTILIZADA PARA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DOS PERFIS QUÍMICOS

### 3.6.1 – Análise dos perfis químicos de *C. rotundus* através das obtenções dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ (*fingerprint*) e análises quimiométricas dos dados

As análises de *fingerprints* por RMN foram realizadas para todas as frações (hexânica, diclorometano, acetato de etila e hidroalcóolica) dos rizomas (R), partes aéreas vegetativas (PAV) e partes aéreas reprodutivas (PAR). Cada fração foi preparada de modo que a parte da planta em questão tivesse a mesma concentração da sua equivalente ou uma concentração mais próxima possível, a fim de que fosse feita uma análise comparativa qualitativa dos sinais. Na **TABELA 3.6.1**, estão apresentadas as concentrações calculadas para cada amostra.

TABELA 3.6.1 – Concentrações das amostras para análise de *fingerprint* e quimiometria por RMN.

	Hexano		Diclorometano		Acetato de etila		Hidroalcóolica	
<b>Rizomas</b>								
	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>[ ] mg/mL</b>	80,17	76,50	75,83	75,83	77,83	77,83	61,17	61,17
<b>Partes aéreas vegetativas</b>								
	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>[ ] mg/mL</b>	77,50	77,50	72,50	72,50	51,00	51,00	81,50	81,50
<b>Partes aéreas reprodutivas</b>								
	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>[ ] mg/mL</b>	68,00	68,00	74,67	74,67	3,50	3,50	73,33	73,33

Nota: [ ] Concentração; Contaminada (1) e não contaminada (2).

Para solubilizar as amostras correspondentes às frações hexânicas (FH) e diclorometano (FDCM) foi utilizado  $\text{CDCl}_3$ , enquanto que para as amostras correspondentes às frações Acetato de Etila (FAcOEt) e Hidroalcólicas (FHid) foi utilizado MeOD (solventes descritos no item 3.1.1). Uma vez solubilizadas, as amostras foram sonicadas por 10 minutos e centrifugadas também por 10 minutos, a 10.000 rpm e 25 °C.

Um volume de 600  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante foi retirado e filtrado em algodão para tubo de RMN. Na figura **FIGURA 3.6.1.1** estão apresentadas as amostras preparadas para análises, correspondentes às frações (F<sub>AcOEt</sub>) e (F<sub>Hid</sub>).

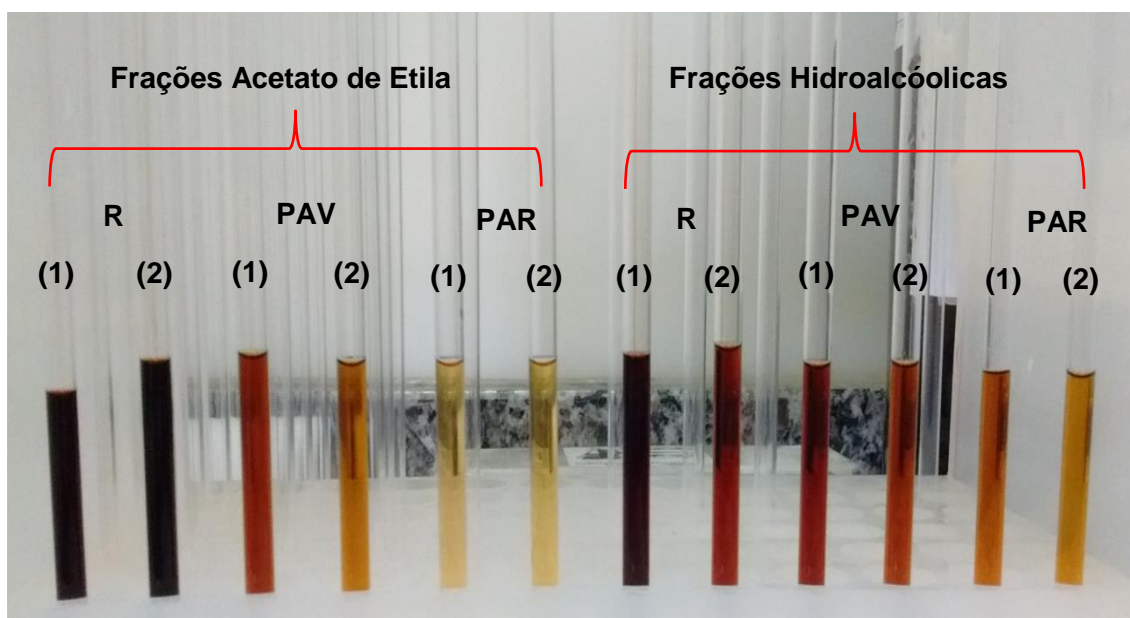


FIGURA 3.6.1.1 – Amostras das frações F<sub>AcOEt</sub> e F<sub>Hid</sub> de *C. rotundus*, para análise de *fingerprint* por RMN.

A aquisição dos perfis *fingerprints* foi realizada no equipamento Bruker Avance III - 14,1 T, já descrito no item 3.2.5. Para isto, os tubos de RMN com amostras das frações da planta a serem analisadas foram distribuídos aleatoriamente no amostrador automático.

Na **FIGURA 3.6.1.2**, pode-se verificar o perfil espectroscópico por RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra contaminada (1) e de uma não contaminada (2) (espectro selecionado aleatoriamente). No qual podemos observar sinais de várias classes de compostos, como a região alifática ( $\delta$  0,0 – 3,0), carboidratos ( $\delta$  3,0 – 6,0) e aromáticos ( $\delta$  6,0 – 9,0). Observou-se que no perfil obtido das F<sub>AcOEt</sub>R, há muitos sinais nas três regiões do espectro, caracterizando-a como uma matriz complexa.

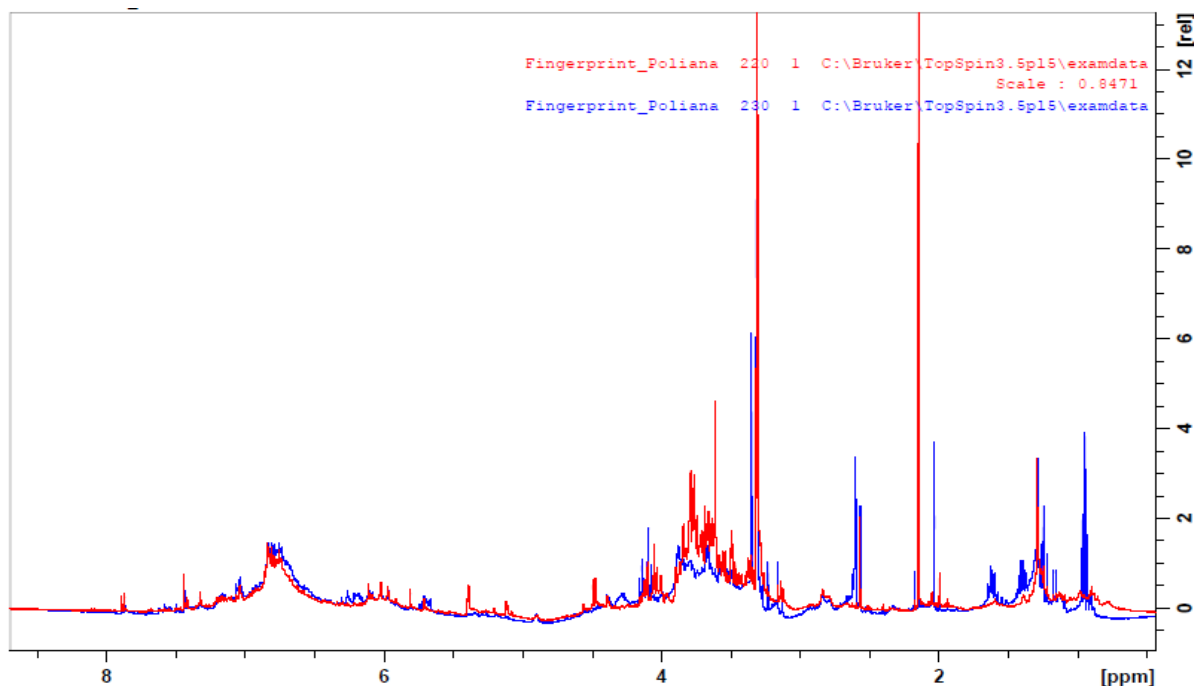


FIGURA 3.6.1.2 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da fração FAcOEtR de *C. rotundus*. Sequência com supressão do sinal da água NOESYGPPR1D, ns = 64.  
 Nota: Amostra contaminada (vermelho) e não-contaminada (azul).

Uma vez terminadas todas as medidas de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras (todas feitas em triplicata), foram realizados tratamentos quimiométricos dos espectros através do *software* Amix® versão 3.9.14 da Bruker®. Foram selecionadas as regiões espectrais entre  $\delta$  0,67 e 14,9, com exclusão das faixas de supressão dos hidrogênios relativos ao HOD ( $\delta$  4,92 – 4,73), sinal do solvente MeOD ( $\delta$  3,27 – 3,30) e da referência interna ( $\delta$  0,66 – 5,0), conforme mostrado na **FIGURA 3.6.1.3**.

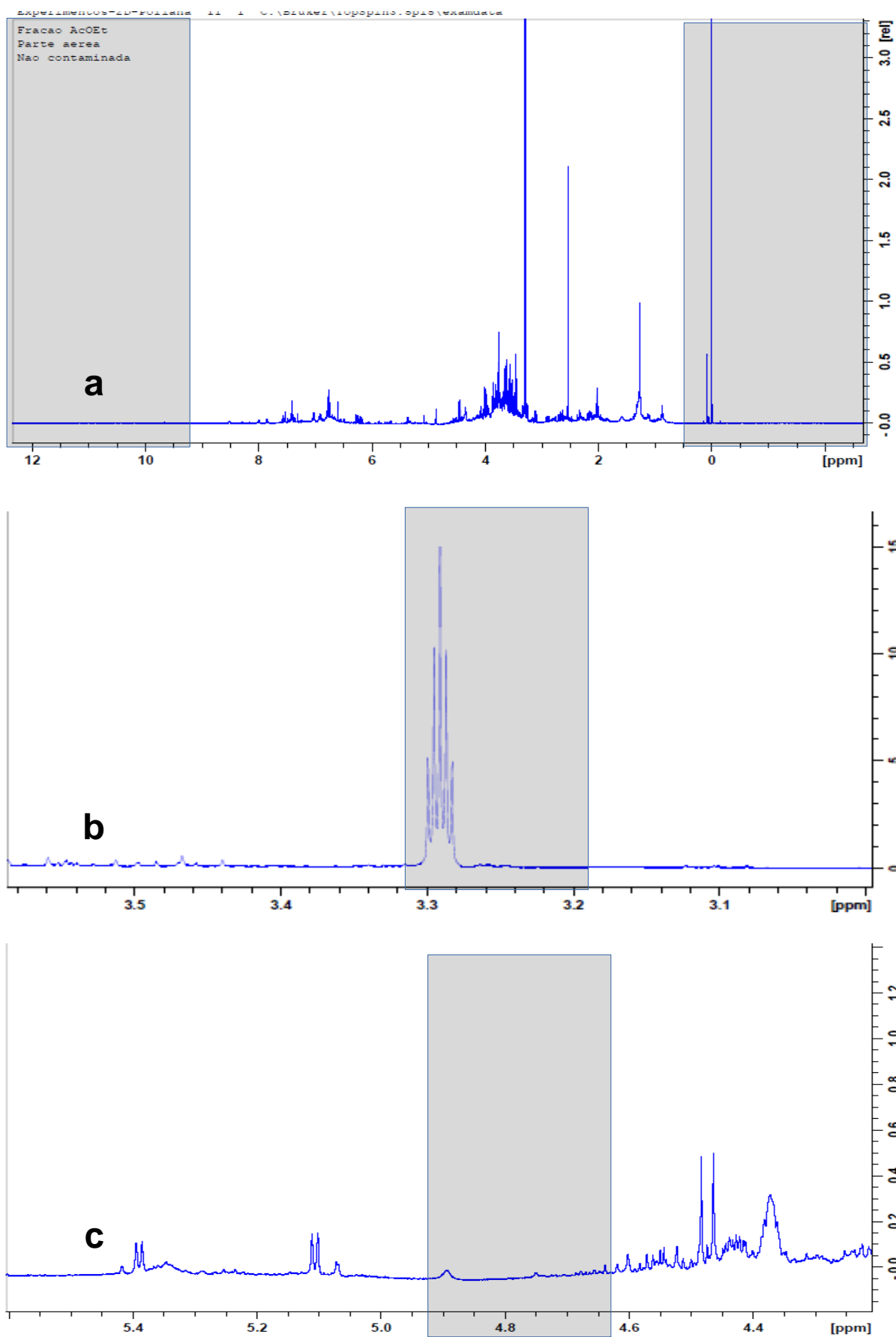


FIGURA 3.6.1.3 – Regiões do espectro de RMN  $^1\text{H}$  excluídas no tratamento quimiométrico. (a) Exclusão da região sem sinal da amostra (b) do sinal do solvente MeOD e (c) pré-saturação do sinal do HDO do solvente.

As bases de dados foram montadas com *bucket tables* de  $\delta$  0,05, com modo de integração soma de intensidades, as variáveis geradas não foram escalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança.

A análise multivariada dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  foi realizada através da PCA das triplicatas das amostras de todas as partes da planta analisadas referentes às frações FAcOEt (1) e (2), e FHid (1) e (2).

### **3.6.2 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt por HPLC**

O Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent 1260 (equipamento descrito no item 3.2.3) foi o cromatógrafo utilizado para a análise da variação do perfil químico de *C. rotundus*.

Quanto ao preparo das amostras de interesse, estas, foram pesadas (1 mg) e ressuspendidas em 1,0 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (1:1), grau HPLC. Filtrou-se o sobrenadante em filtros de seringa (PVDF), polar e não polar de 15 mm x 0,20  $\mu\text{m}$  (Chromafil®), em seguida, as amostras preparadas foram analisadas via HPLC-UV-SPE-NMR.

As análises foram realizadas no modo reverso de eluição, nas quais foram utilizados H<sub>2</sub>O (sistema A) e ACN (sistema B), ambos acidificados com 0,1 % de ácido fórmico. Uma vez que a amostra apresenta uma ampla faixa de polaridade, geralmente é feita a opção por eluição gradiente. Haja vista que nesses casos, nenhuma condição isocrática consegue simultaneamente, oferecer boa resolução, pequeno alargamento de bandas e tempo de análise adequado. As substâncias que demoram a eluir são melhores separadas com fase móvel mais forte, em contrapartida, aquelas que eluem mais rapidamente requerem uma fase eficientemente móvel fraca. Em casos como este, o modo de eluição gradiente é a melhor opção a ser adotada, uma vez que permite uma retenção adequada de todos os componentes de interesse, e conseqüentemente, as bandas cromatográficas podem ser melhores detectadas (SNYDER, 1997 apud BELLETE, 2013).

O ultravioleta (UV) foi o detector utilizado, com comprimento de onda variável, em que as corridas foram monitoradas nos comprimentos de onda 254 e 342 nm. O fluxo foi de 1,0 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 20  $\mu\text{L}$ . Para a

realização de todas as separações cromatográficas foi utilizada a coluna Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,60 mm, partículas de 5 µm). Como pré-coluna foi utilizada uma coluna C18 (4 x 3 mm) também da marca Gemini.

As condições cromatográficas utilizadas para as frações acetato de etila dos rizomas (1) e (2), FAcOEtR (1) e FAcOEtR (2), respectivamente, estão descritas a seguir e estas, também podem ser observadas na **TABELA 3.6.2.1**, (A) H<sub>2</sub>O + 0.1% ácido fórmico; (B) ACN + 0.1 % ácido fórmico; gradiente (em solvente B): (0 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (24 min) 50 % de (A) e 50 % (B), (26 min) 0 % de (A) e 100% (B), (29 min) 0 % de (A) e 100 % (B), (31 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (41 min) 95 % de (A) e 5 %, tempo total de corrida (41 min); fluxo: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; comprimento de onda: 254 nm.

TABELA 3.6.2.1 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H<sub>2</sub>O; linha B: ACN) das frações FAcOEtR (1) e (2) de *C. rotundus*.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Linha (A%)</b>	<b>Linha (B%)</b>
0	95	5
24	50	50
26	0	100
29	0	100
31	95	5
41	95	5

As condições cromatográficas utilizadas para as frações acetato de etila das partes aéreas vegetativas (1) e (2), FAcOEtPAV (1) e FAcOEtPAV (2), respectivamente estão descritas a seguir e estas, também podem ser observadas na **TABELA 3.6.2.2**, (A) H<sub>2</sub>O + 0.1 % ácido fórmico; (B) ACN + 0.1 % ácido fórmico; gradiente (em sovente B): (0 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (23 min) 49 % de (A) e 51 % (B), (25 min) 0 % de (A) e 100 % (B), (30 min) 0 % de (A) e 100 % (B), (32 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (42 min) 95 % de (A) e 5 %, tempo total de corrida (42 min); fluxo: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; comprimento de onda: 342 nm.

TABELA 3.6.2.2 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H<sub>2</sub>O; linha B: ACN) das frações FAcOEtPAV (1) e (2) de *C. rotundus*.

Tempo (min)	Linha (A%)	Linha (B%)
0	95	5
23	49	51
25	0	100
30	0	100
32	95	5
42	95	5

As condições cromatográficas utilizadas para as frações acetato de etila das partes aéreas reprodutivas (1) e (2), FAcOEtPAR (1) e FAcOEtPAR (2), respectivamente são descritas a seguir e estas, também podem ser observadas na **TABELA 3.6.2.3**, (A) H<sub>2</sub>O + 0.1 % ácido fórmico; (B) ACN + 0.1 % ácido fórmico; gradiente (em solvente B): (0 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (21 min) 55 % de (A) e 45 % (B), (23 min) 0% de (A) e 100% (B), (29 min) 0% de (A) e 100% (B), (30 min) 95% de (A) e 5% (B), (42 min) 95% de (A) e 5 %, tempo total de corrida (42 min); fluxo: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; comprimento de onda: 342 nm.

TABELA 3.6.2.3 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H<sub>2</sub>O; linha B: ACN) das frações, FAcOEtPAR (1) e (2) de *C. rotundus*.

Tempo (min)	Linha (A%)	Linha (B%)
0	95	5
21	55	45
23	0	100
29	0	100
30	95	5
42	95	5



### 3.6.3 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR

Antes da realização das análises por HPLC-UV-SPE-NMR, foram realizadas análises cromatográficas das amostras de interesse no Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Agilent 1260 (equipamento descrito no item 3.2.3). Em que a coluna utilizada foi a coluna Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,60 mm, partículas de 5 µm). Como pré-coluna foi utilizada uma coluna C18 (4 x 3 mm) também da marca Gemini.

Foram realizadas análises através da técnica de LC-UV-SPE-NMR e LC-MS, apenas com as frações FAcOEtPAV de ambas as plantas, *Cyperus* (1) e (2). As amostras analisadas foram pesadas: 4,00 g e 7,00 g correspondentes às frações FAcOEtPAV (1) e (2), respectivamente. Estas, foram ressuspensas em 1,5 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (1:1), ambos deuterados. Filtrou-se o sobrenadante em filtros de seringa (PVDF), polar e não polar de 15 mm x 0,20 µm (Chromafil®); em seguida, as amostras preparadas foram analisadas via HPLC-UV-SPE-NMR.

As condições cromatográficas utilizadas para as frações FAcOEtPAV (1) e (2) são descritas a seguir e estas, também podem ser observadas na **TABELA 3.6.3**, (A) H<sub>2</sub>O + 0.1 % ácido fórmico; (B) ACN + 0.1 % ácido fórmico; gradiente (em solvente B): (0 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (40 min) 48 % de (A) e 52 % (B), (41 min) 0 % de (A) e 100 % (B), (46 min) 0 % de (A) e 100 % (B), (47 min) 95 % de (A) e 5 % (B), (52 min) 95 % de (A) e 5 %, tempo total de corrida (52 min); fluxo: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; comprimento de onda: 342 nm.

TABELA 3.6.3 – Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H<sub>2</sub>O; linha B: ACN) das frações FAcOEtPAV (1) e (2) de *C. rotundus*.

Tempo (min)	Linha (A%)	Linha (B%)
0	95	5
40	48	52
41	0	100
46	0	100
47	95	5
52	95	5

Os cartuchos de SPE utilizados para trapear as bandas de interesse são cartuchos de uso geral, cuja fase é polidivinil benzeno. Estas bandas foram condicionadas com acetonitrila e equilibradas com água. Antes da realização do trapeamento das bandas o fluxo de saída da coluna foi combinado com um fluxo de água (deionizada), sendo este três vezes maior, cujo o objetivo era diminuir a força da fase móvel a fim de melhorar a retenção dos compostos nos cartuchos de SPE, usando uma bomba Knauer K100 (Berlin, Germany). Ao todo, foram realizadas 15 corridas em sequência, todas com as mesmas condições citadas anteriormente. Os analitos foram aprisionados usando para a seleção dos mesmos, o modo “*threshold*” em 342 nm, para indicar o início e final de cada banda a ser aprisionada. Terminadas as corridas cromatográficas, os cartuchos foram secos com fluxo de nitrogênio por aproximadamente 30 minutos, em seguida os materiais adsorvidos foram eluídos com 250 µL de acetonitrila deuterada e transferidos para tubos de NMR de 3 mm. O Software utilizado para manuseio do equipamento de HPLC e para o processamento dos dados foi o Hystar v. 3.2 (Bruker BioSpin GmbH) (Belleite, 2013).

Uma vez eluídas as bandas (amostras), algumas delas foram analisadas no equipamento de RMN da Bruker Advance III, de 600 MHz (veja o item 3.6.2), as outras não foram analisadas em virtude de um problema com uma peça do RMN 600 MHz, chamada de criosonda. Por fim, para a obtenção dos espectros, foi realizada sequências de pulsos com supressão do sinal do solvente e do sinal da água residual.

### **3.6.4 – Avaliação dos perfis químicos das frações AcOEt através da técnica HPLC-MS**

Para o estudo das amostras de interesse por HPLC-MS previamente isoladas a partir da técnica de HPLC-SPE-NMR, foi utilizado o HPLC da Agilent Technologies, modelo 1260 acoplado a um espectrômetro de massa da Applied Biosystems modelo APITM 2000, conforme descrito no item 3.2.3. Este equipamento dispõe de uma fonte de ionização do tipo ESI (TurboIonSpray®) e analisador do tipo triplo-quadrupolo.

Para a obtenção dos espectros de massas foram aplicados os parâmetros descritos na **TABELA 3.6.4**. Inicialmente as análises foram realizadas por inserção direta no modo de aquisição *full scan* (Q1 MS), varrendo massas de 150 a 750 Da. A partir desses espectros foram construídos espectros de íons produtos (MS2) e quando necessário de íons precursores, para fins de confirmação da procedência do íon.

A priori, foram aplicadas as condições cromatográficas otimizadas (item 3.6.2.1), porém otimizou-se parâmetros inerentes ao espectrômetro de massas o qual o HPLC em questão estava acoplado.

Os parâmetros ajustados deram-se em função da natureza química do analito, tais como: voltagem do TurbolonSpray® (IS), potenciais de desagrupamento (DP), potenciais de entrada (EP) e potenciais de focalização (FP). Os parâmetros também foram ajustados quando em alguns casos para a realização de experimentos MS/MS, tais como: potenciais de entrada da célula (CEP), potenciais de saída da célula (CXP), energias do gás de colisão (CAD) e energia de colisão (EC). Por fim, os parâmetros foram ajustados em função da fonte, como: gases de cortina (CUR), temperatura da fonte (TEM), nebulizador (GS1) e gás de aquecimento (GS2).

As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 500 µg/mL, objetivando as melhores condições de ionização e de fragmentação dos compostos de interesse, a vazão utilizada foi de 10 µL/min; trabalhou-se no modo negativo de acordo com indicações de algumas literaturas consultadas.

TABELA 3.6.4 – Parâmetros para obtenção dos espectros de massas dos compostos extraídos das FAcOEtPAV de *C. rotundus*.

<b>Parâmetros da amostra P-1</b>	
FP (eVolts)	-180
DP (eVolts)	-16
EP (eVolts)	-6.0
Parâmetros da fonte/gás	
CUR (Psi)	10
TEM (°C)	300
IS (Volts)	4500
GS1 (Psi)	30
GS2 (Psi)	40

<b>Parâmetros da amostra P-5</b>	
FP (eVolts)	-180
DP (eVolts)	-16
EP (eVolts)	-6.0
Parâmetros da fonte/gás	
CUR (Psi)	10
TEM (°C)	250
IS (Volts)	4500
GS1 (Psi)	30
GS2 (Psi)	40

<b>Parâmetros da amostra P-2</b>	
FP (eVolts)	-180
DP (eVolts)	-16
EP (eVolts)	-6.0
Parâmetros da fonte/gás	
CUR (Psi)	10
TEM (°C)	300
IS (Volts)	4500
GS1 (Psi)	30
GS2 (Psi)	40

<b>Parâmetros da amostra P-6</b>	
FP (eVolts)	-355
DP (eVolts)	-80.9
EP (eVolts)	-11.6
Parâmetros da fonte/gás	
CUR (Psi)	10
TEM (°C)	250
IS (Volts)	4500
GS1 (Psi)	30
GS2 (Psi)	40

# ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***



## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ICP-AES

O teste para determinação das concentrações de metais por ICP-AES (item 3.2.6) conforme metodologia descrita nos itens 3.4.1 e 3.4.2 foi realizado com base em análises estatísticas em que para tratamento dos dados obtidos foram feitos cálculos de desvio-padrão. O teste apresentou resultados que confirmam a capacidade de *C. rotundus* em hiperacumular metais absorvendo-os através das suas raízes e transportando-os para suas partes aéreas vegetativas, conforme mostrado nas **TABELAS 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3**.

Segundo LASAT (2000) para que ocorra a fitoextração faz-se necessário que os contaminantes estejam biodisponíveis, em outras palavras; que eles estejam prontos para serem absorvidos pelas raízes das plantas. O que determina a disponibilidade de um metal é a sua solubilidade. Estão disponíveis para absorção pelas plantas, apenas metais associados à solução do solo como íons metálicos e complexos metálicos solúveis e adsorvidos aos constituintes inorgânicos do solo em locais de troca iônica.

Na **TABELA 4.1.1** estão apresentados os dados do teste de determinação das concentrações de metais nos rizomas (1) e (2), contaminados e não contaminados, respectivamente. De acordo com a tabela em questão, observou-se elevada concentração (138 mg/kg de amostra) do elemento cobre (Cu) nos rizomas (1) em relação aos rizomas (2) (11 mg/kg de amostra). Foi possível observar também uma discrepância acentuada na concentração do elemento cromo (Cr) em que os rizomas (2) apresentaram uma concentração de 58 mg/Kg de amostra em relação aos rizomas (1), cuja concentração observada foi quase o dobro (112 mg/Kg de amostra). Observou-se que a concentração de alumínio (Al) foi maior nos rizomas (2) quando comparados aos rizomas (1), 4,7 mg/kg e 3,6 mg/kg de amostra, respectivamente. Quanto às concentrações dos demais metais, estas não apresentaram variações significativas. E em todas as amostras (rizomas, partes aéreas vegetativas e partes aéreas reprodutivas) analisadas por ICP-AES, os elementos cádmio (Cd) e arsênio (As) apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção em ambas às plantas (1) e (2).

TABELA 4.1.1 – Testes de determinação de metais nos rizomas (1) e (2) de *C. rotundus*, realizados por ICP-AES.

<b>Concentração de metal por g ou Kg de amostra</b>	<b>Rizoma (1)</b>	<b>Rizoma (2)</b>
Al (mg/g)	3,6 ± 0,2	4,7 ± 0,1
Fe (mg/g)	2,97 ± 0,07	2,08 ± 0,03
Cr (mg/Kg)	112 ± 1	58 ± 3
Cu (mg/Kg)	138 ± 2	11 ± 1
Zn (mg/Kg)	24 ± 1	17 ± 7
As (mg/Kg)	< 0,1	< 0,1
Cd (mg/Kg)	< 0,01	< 0,01
Pb (mg/Kg)	9,2 ± 0,5	6,6 ± 0,4

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada; < (Abaixo do limite de detecção do equipamento).

A **TABELA 4.1.2** mostra o teste de determinação das concentrações de metais das partes aéreas vegetativas de *C. rotundus*. Com exceção do Cd e As, as concentrações dos demais metais presentes nas partes aéreas (1) e (2) sofreram expressivas variações. A diferença nas concentrações observadas para o Cu entre as partes aéreas vegetativas (1) e (2), foi a maior e, portanto, mais significativa dentre todas as concentrações de metais para todas as partes das plantas analisadas. O Cu apresentou uma concentração muito elevada nas partes aéreas vegetativas (1), 921 mg/kg de amostra, para a amostra correspondente às partes aéreas vegetativas (2) apresentou uma concentração de 3,7 mg/kg de amostra.

Esta concentração muito elevada de cobre (Cu) encontrada nas partes aéreas vegetativas (1) em relação à concentração dos demais metais é justificada pelo fato deste metal ser o principal produto resultante da mineração local (Mina do Sossego). O estado do Pará atualmente compõe as maiores reservas de Cu do Brasil, localizada no distrito cuprífero de Carajás, em Marabá (item 1.1).



TABELA 4.1.2 – Testes de determinação de metais nas partes aéreas vegetativas (1) e (2) de *C. rotundus*, realizados por ICP-AES.

Concentração de metal por g ou Kg de amostra	Parte aérea vegetativa (1)	Parte aérea vegetativa (2)
Al (mg/g)	5,7 ± 0,6	0,54 ± 0,05
Fe (mg/g)	6,4 ± 0,6	0,60 ± 0,01
Cr (mg/Kg)	24 ± 4	< 0,3
Cu (mg/Kg)	921 ± 69	3,7 ± 0,1
Zn (mg/Kg)	45 ± 1	11 ± 1
As (mg/Kg)	< 0,1	< 0,1
Cd (mg/Kg)	< 0,01	< 0,01
Pb (mg/Kg)	17 ± 2	4,6 ± 0,2

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada; < (Abaixo do limite de detecção do equipamento).

Ainda referente à **TABELA 4.1.2**, observou-se que o segundo metal majoritário presente nas partes aéreas vegetativas (1), foi o Cr (24 mg/Kg de amostra) que estava em concentração abaixo do limite de detecção do equipamento na parte aérea (2) (< 0,3 mg/Kg de amostra); seguido do zinco (Zn) cuja concentração foi de 45 mg/Kg de amostra; chumbo (Pb) com concentração 17 mg/Kg de amostra; ferro (6,4 mg/g de amostra) e alumínio (Al), cuja concentração foi de 5,7 mg/g de amostra.

Quanto às partes aéreas reprodutivas, as diferenças observadas nas concentrações de metais analisados foram muito sutis, haja vista que tais concentrações apresentaram variações pouco expressivas de uma planta para outra, conforme mostrado na **TABELA 4.1.3**.

TABELA 4.1.3 – Testes de determinação de metais nas partes aéreas reprodutivas (1) e (2) de *C. rotundus*, realizados por ICP-AES.

<b>Concentração de metal por g ou Kg de amostra</b>	<b>Parte aérea reprodutiva (1)</b>	<b>Parte aérea reprodutiva (2)</b>
Al (mg/g)	0,22 ± 0,2	0,21 ± 0,2
Fe (mg/g)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Cr (mg/Kg)	37 ± 17	40 ± 16
Cu (mg/Kg)	5,9 ± 0,5	5 ± 2
Zn (mg/Kg)	20 ± 9	18 ± 6
As (mg/Kg)	<0,1	<0,1
Cd (mg/Kg)	<0,01	<0,01
Pb (mg/Kg)	6 ± 1	5 ± 1

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada; < (Abaixo do limite de detecção do equipamento).

Portanto, de acordo com os dados apresentados verificaram-se concentrações de metais superiores nas partes aéreas vegetativas da planta contaminada (1) quando comparada às concentrações presentes nos rizomas da planta equivalente (também contaminada), essas diferenças tornaram-se ainda mais acentuadas quando foram comparadas às concentrações de metais entre as partes aéreas vegetativas (1) e reprodutivas (1), uma vez que no segundo caso não houve alterações significativas entre as concentrações de metais na planta (1) em relação a (2). Logo, pode-se inferir que, há translocação de metais dos rizomas para as partes aéreas vegetativas, entretanto, estes não são translocados às partes aéreas reprodutivas, uma vez que as concentrações de metais em ambas as plantas (1) e (2) permaneceram praticamente constantes nestes tecidos, seja em função dos contaminantes ou de outros fatores a serem considerados.

De acordo com NASCIMENTO e XING (2006) o uso de ácidos orgânicos ou quelantes sintéticos, pode acelerar a translocação de metais para as partes aéreas. Provavelmente ácidos orgânicos de baixo peso molecular são os mais utilizados em sistemas de fitoextração, uma vez que influenciam na aquisição de metais através da formação de complexos com íons metálicos, ou através da diminuição do pH em torno das raízes, alterando as características do solo. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) tem sido utilizado com sucesso como quelantes de chumbo e outros metais em solos contaminados.

Essa translocação de metais para as partes aéreas vegetativas em *C. rotundus* pôde ser correlacionada com os cromatogramas obtidos a partir das frações acetato de etila dos rizomas (FAcOEtR), partes aéreas vegetativas (FAcOEtPAV) e partes aéreas reprodutivas (FAcOEtPAR), no espectrômetro Agilent Technologies 1260 (descrito no item 3.2.3), conforme a metodologia descrita no item 3.6.2, nos quais se observou também uma relevante variação no perfil químico entre os rizomas de ambas as plantas, esta variação foi muito mais expressiva nas partes aéreas vegetativas e quase irrelevantes nas partes aéreas reprodutivas, conforme mostra a **FIGURA 4.1.1**. Indicando que a variação da concentração de íons metálicos juntamente com efeitos sazonais e outros fatores desconhecidos a serem considerados, pode de alguma maneira influenciar na variação dos perfis químicos de *C. rotundus*.

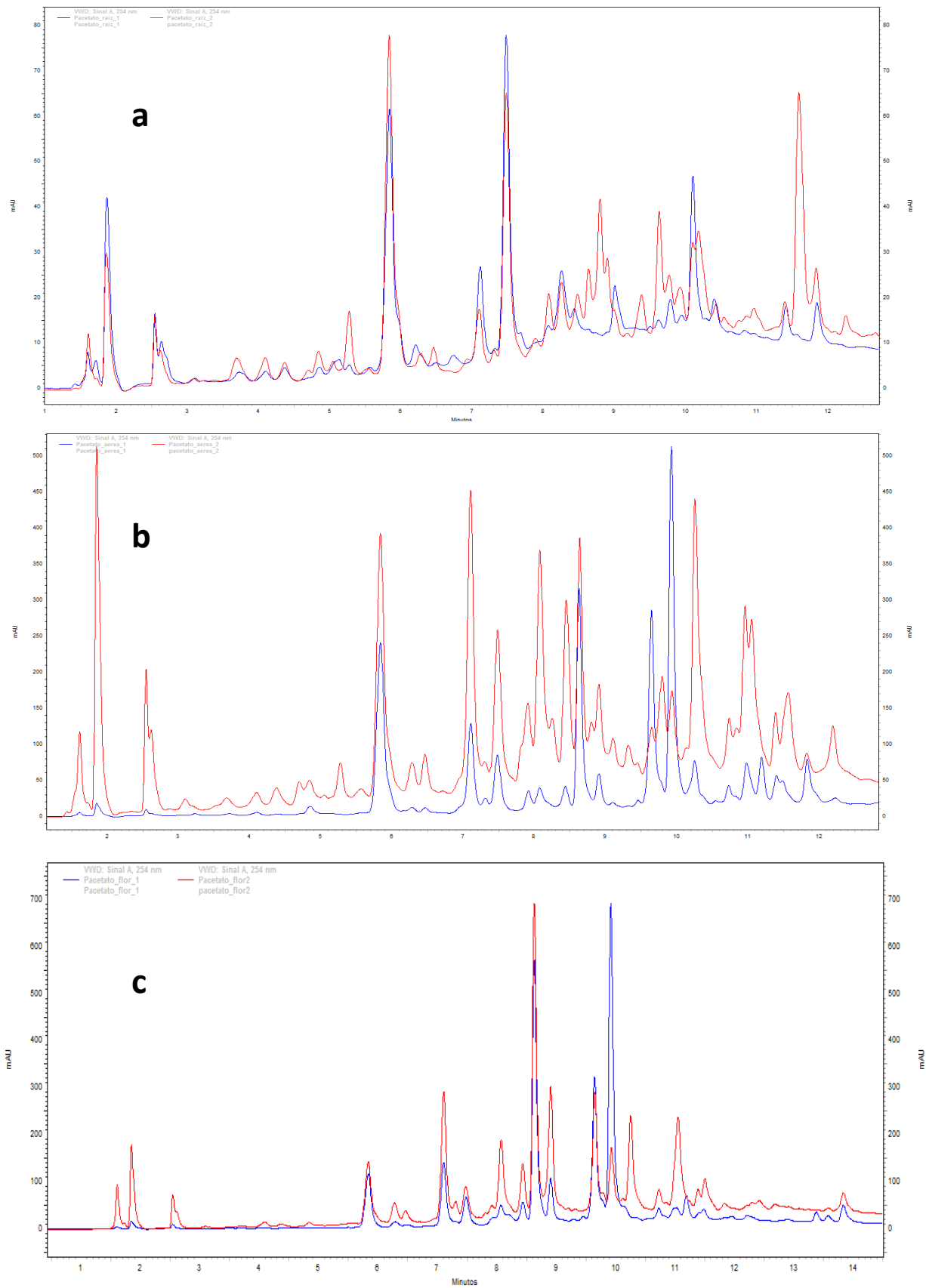


FIGURA 4.1.1 – Cromatograma HPLC-UV das frações líquido-líquido: a) FAcOEtR (1) e (2) b) FAcOEtPAV (1) e (2) e c) das FAcOEtPAR (1) e (2).  
 Nota: Em vermelho está representada *C. rotundus* (1), contaminada; em azul, está *C. rotundus* (2), não contaminada.

## 4.2 – ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE *C. rotundus*

### 4.2.1 – Análise dos perfis químicos de *C. rotundus* através da técnica de RMN

#### 4.2.1.1 – Frações hexânicas (FH)

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações hexânicas (FH) (**FIGURA 4.2.1.1.1**) foram verificados sinais de hidrogênio principalmente na região alifática ( $\delta$  0,0 – 3,0) e na região correspondente a compostos apolares como ácidos graxos ( $\delta$  2,0 – 3,0), estes últimos encontrados principalmente nas raízes e tubérculos de *C. rotundus* (OHIRA et al., 1997; SINGH et al., 2012; KUMAR et al., 2014).

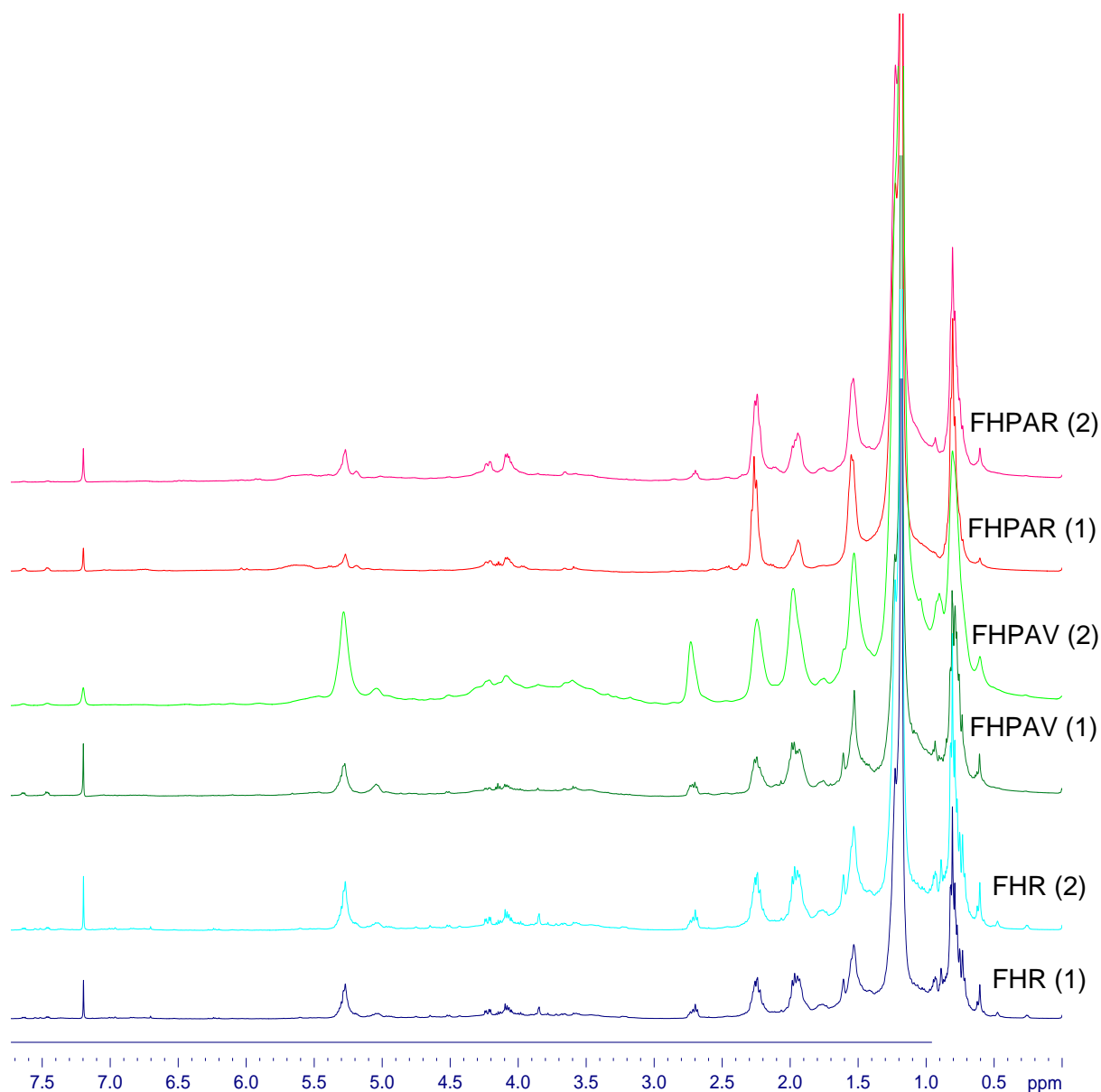


FIGURA 4.2.1.1.1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FH sobrepostas de *C. rotundus*.  
Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Ao comparar as frações hexânicas dos rizomas (FHR), observou-se que entre elas a principal diferença consiste na intensidade, multiplicidade e resolução dos sinais, diferença esta, que pôde ser observada na região entre  $\delta$  8,0 e 2,5. Na fração FHR (1) os sinais apresentaram-se mais visíveis e intensos (**FIGURA 4.2.1.1.2**).

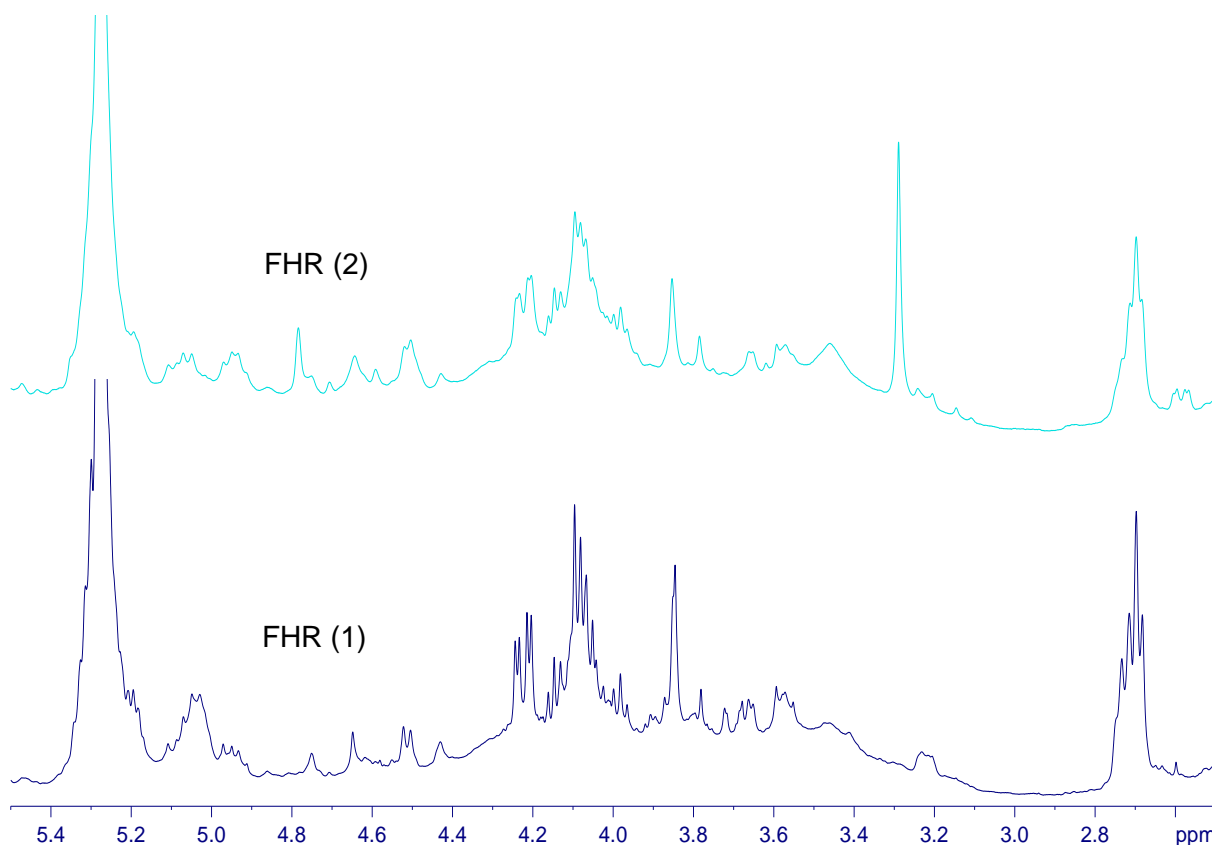


FIGURA 4.2.1.1.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHR de *C. rotundus*, região ampliada  $\delta$  8,0 a 2,5.

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Nas frações hexânicas das partes aéreas vegetativas (FHPAV) foi possível observar diferença de multiplicidade e resolução de sinais, em que na FHPAV (1) estes apareceram muito mais definidos e intensos. Além da presença de um duplo duplete na região de aromáticos (**FIGURA 4.2.1.1.3**).

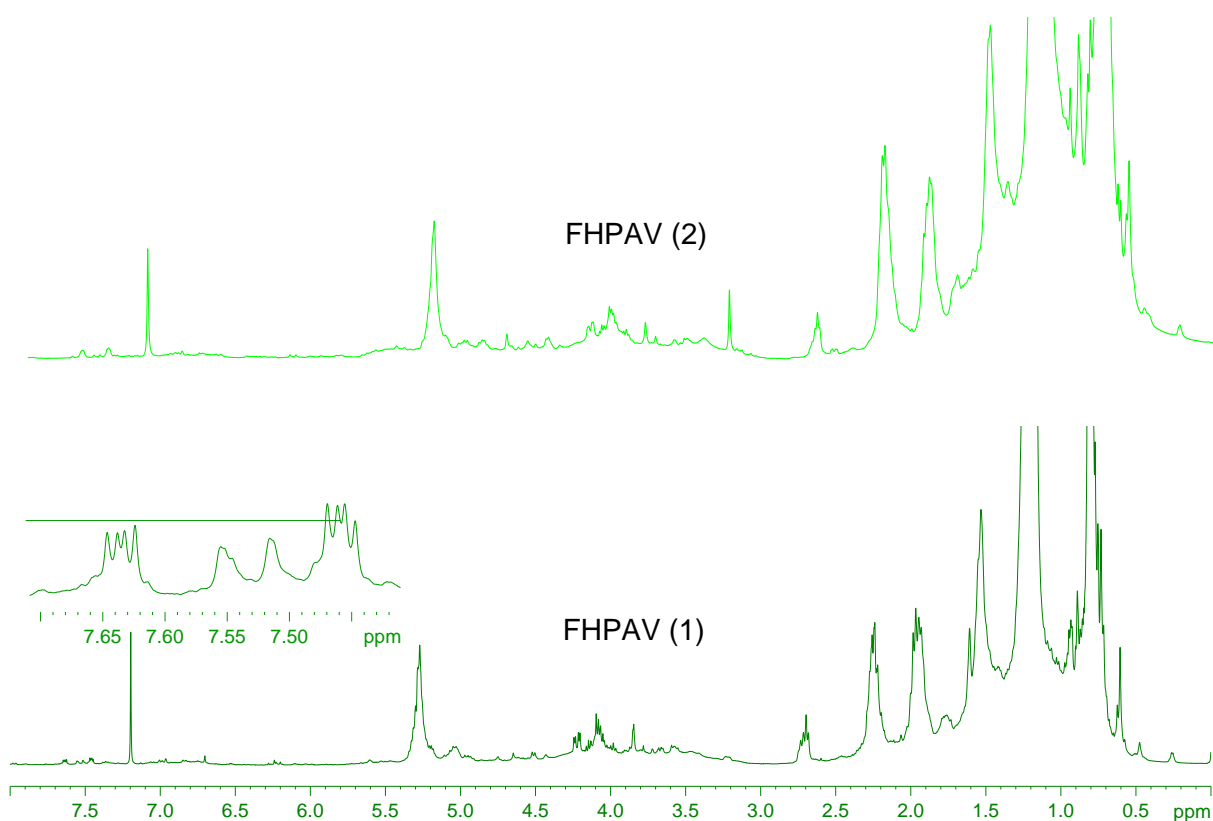


FIGURA 4.2.1.1.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHPAV de *C. rotundus*, região ampliada  $\delta$  7,45 a 7,70.

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Para frações hexânicas das partes aéreas reprodutivas (FHPAR), as principais diferenças estão contidas na região de  $\delta$  4,0 em que pôde-se observar a presença do sinal em  $\delta$  4,15 e os multipletos em  $\delta$  7,50 – 7,60, o primeiro presente apenas na fração FHPAR (1) e o segundo em maior concentração também nesta fração (FIGURA 4.2.1.1.4).

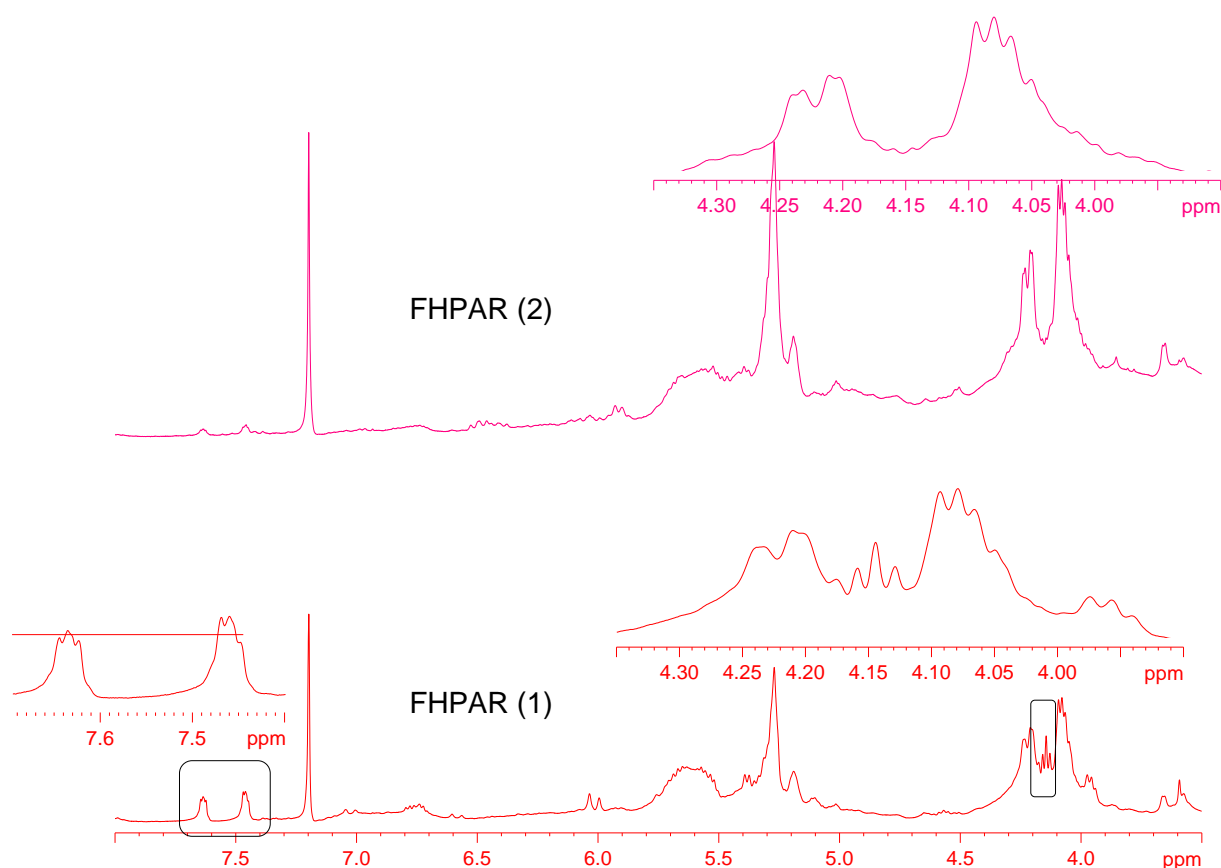


FIGURA 4.2.1.1.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das FHPAR de *C. rotundus*, região ampliada  $\delta$  8,0 a 2,5. Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Assim, pode-se verificar que para as frações FHR e FHPAV de *C. rotundus* (1) e (2), as principais diferenças consistem nas multiplicidades e intensidades dos sinais, nas quais foram observados picos mais definidos e intensos para as amostras FHR (1) e FHPAV (1), podendo ser um indicativo da resposta da planta frente à contaminação por metais, uma vez que nas partes aéreas vegetativas foram determinadas as maiores concentrações dos mesmos, seguidas dos rizomas (**FIGURA 4.1.1** e **FIGURA 4.1.2** do item 4.1). No caso da FHPAR (1) que apresentou alguns poucos picos não encontrados na FHPAR (2), tal indicativo não se aplica, haja vista que os metais não foram translocados para as partes aéreas reprodutivas da planta, assim, deve haver outros fatores que influenciaram nas alterações entre estas amostras (**FIGURA 4.1.3** do item 4.1).



#### 4.2.1.2 – Frações diclorometano (FDCM)

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações diclorometano (FDCM) (**FIGURA 4.2.1.2.1**) foram verificados sinais por todo o espectro, bem como diferentes sinais na região de compostos alifáticos ( $\delta$  0,0 – 3,0) e também na região de carboidratos e aromáticos ( $\delta$  3,0 – 6,0 e 6,0 – 9,0, respectivamente), as classes de compostos citadas foram relatadas não apenas na espécie, como também gênero *Cyperus* (MOHAMED et al., 2015). Foi possível notar a extração de compostos diferentes daqueles extraídos nas frações hexânicas, principalmente devido à presença de sinais na região de  $\delta$  3,0 – 8,0.

Através das análises dos perfis espectrais dessas amostras, observou-se que as frações FDCM (1) apresentaram uma quantidade maior de sinais e alguns destes, com intensidades também maiores em relação às frações FDCM (2), tal diferença mostrou-se ainda mais acentuada nos rizomas (**FIGURA 4.2.1.2.1**).

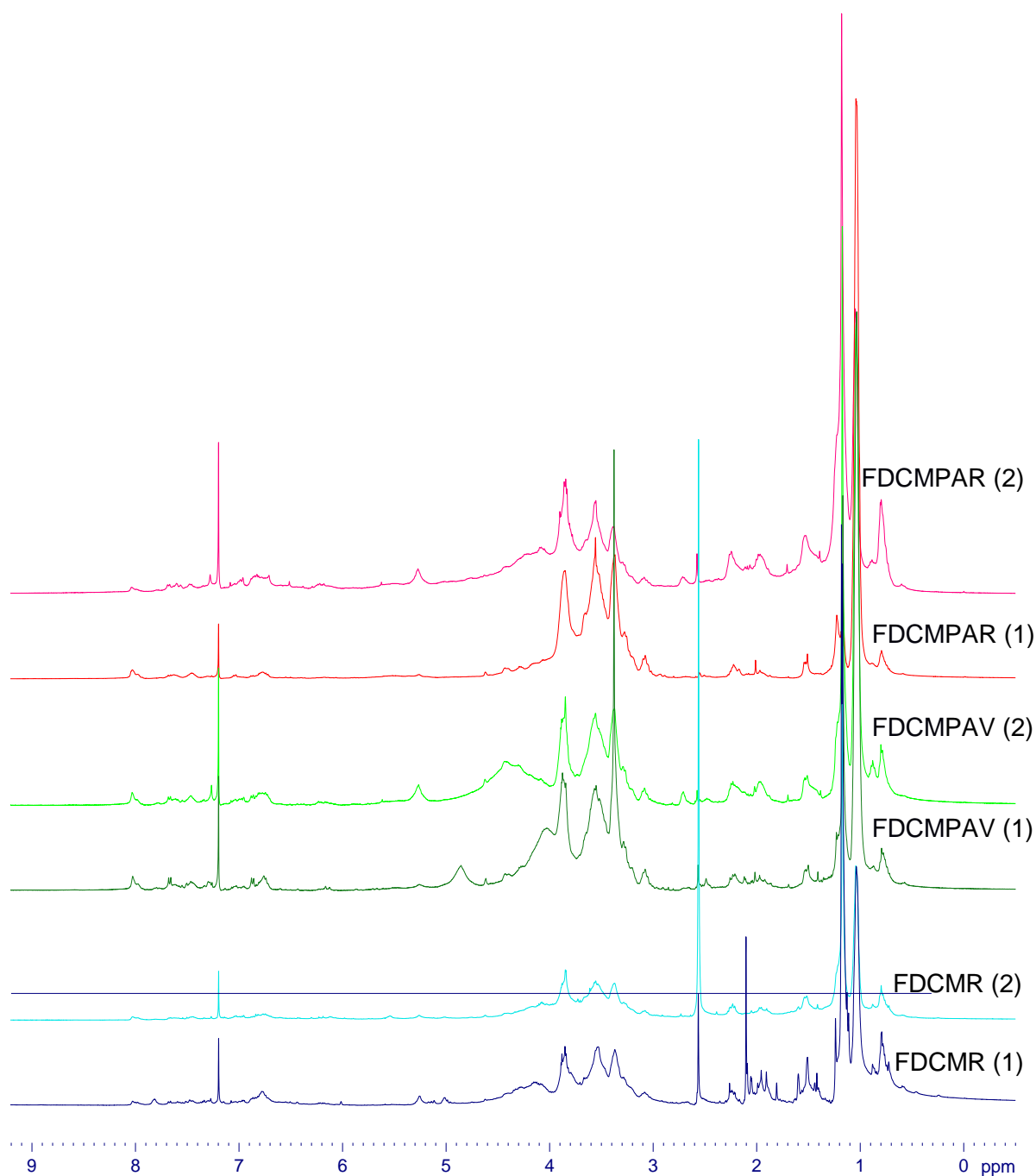


FIGURA 4.2.1.2.1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FDCM sobrepostas de *C. rotundus*.  
Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações diclorometano dos rizomas (FDCMR) (**FIGURA 4.2.1.2.2**) essas diferenças foram vistas na região entre  $\delta$  1,0 e 2,5, nos quais há presença de muitos sinais apenas no espectro correspondente à fração FDCMR (1). Em destaque pode-se observar um sinal em  $\delta$  1,18 (possivelmente uma metila), além de outros três sinais menos intensos na região entre  $\delta$  1,10 e 1,25.

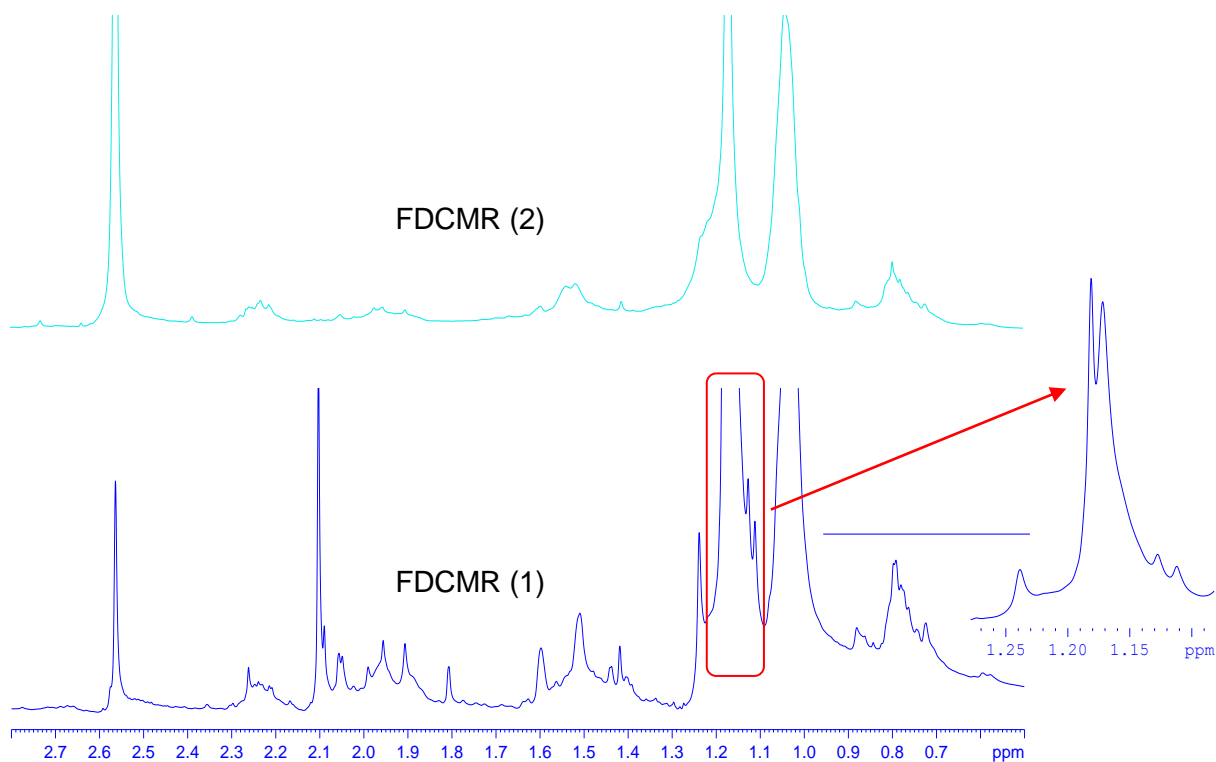


FIGURA 4.2.1.2.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FDCMR de *C. rotundus*, região ampliada  $\delta$  2,8 – 1,0.

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações das partes aéreas vegetativas (FDCMPAV) (**FIGURA 4.2.1.2.3**), foi verificada uma grande similaridade na intensidade dos sinais, exceto para um sinal em  $\delta$  3,37 na fração FDCMPAV (1).

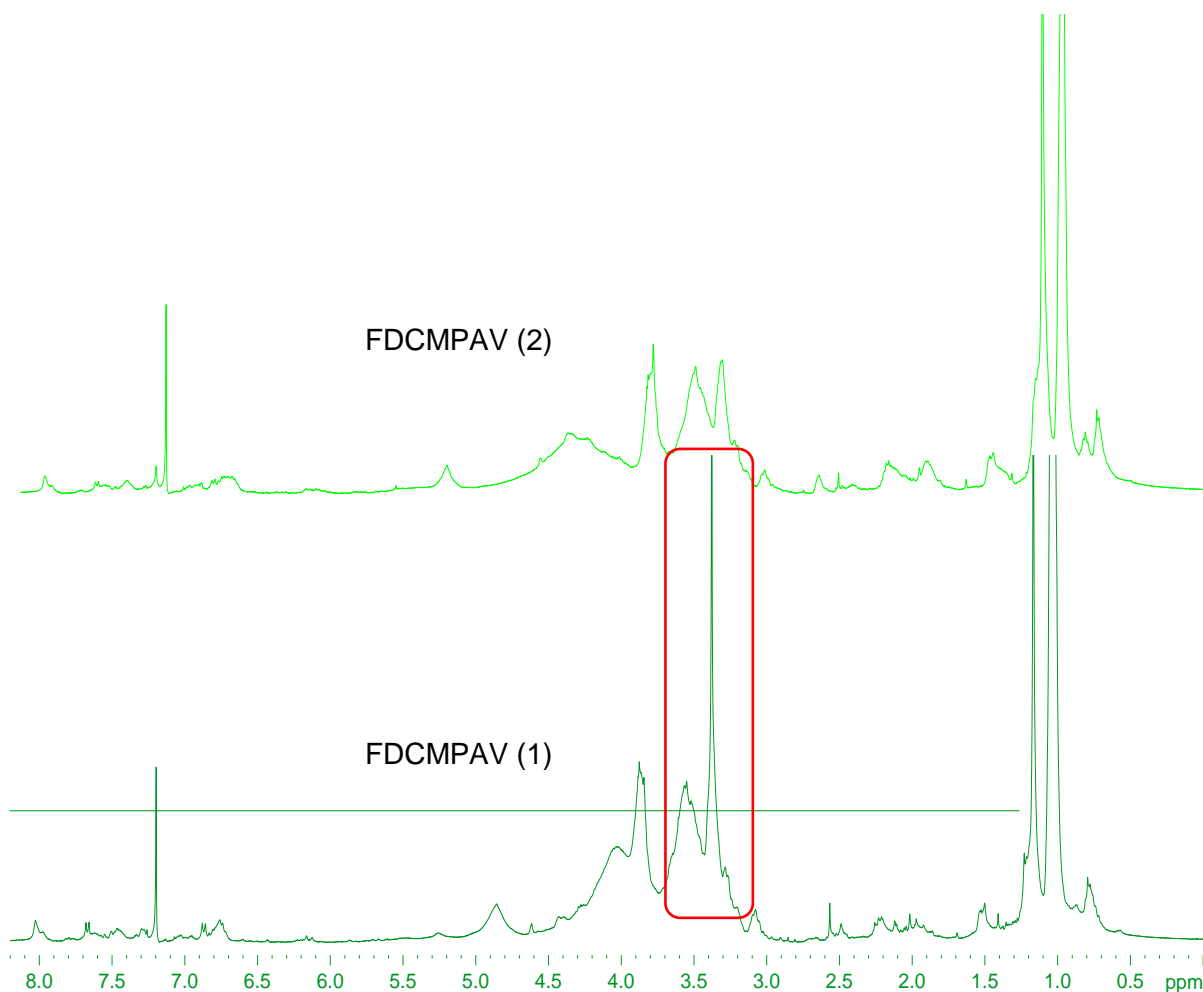


FIGURA 4.2.1.2.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FDCMPAV de *C. rotundus*.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações diclorometano das partes aéreas reprodutivas (FDCMPAR) (FIGURA 4.2.1.2.4), foram observadas diferenças quando às intensidades dos sinais, principalmente na região de  $\delta$  3,0 – 4,0 (carboidratos); sendo estes muito mais intensos para a fração FDCMPAR (1). Além da enorme diferença entre os sinais encontrados na região de  $\delta$  1,0; há ainda a presença de um sinal em  $\delta$  1,20, também presente na fração FDCMPAR (1).

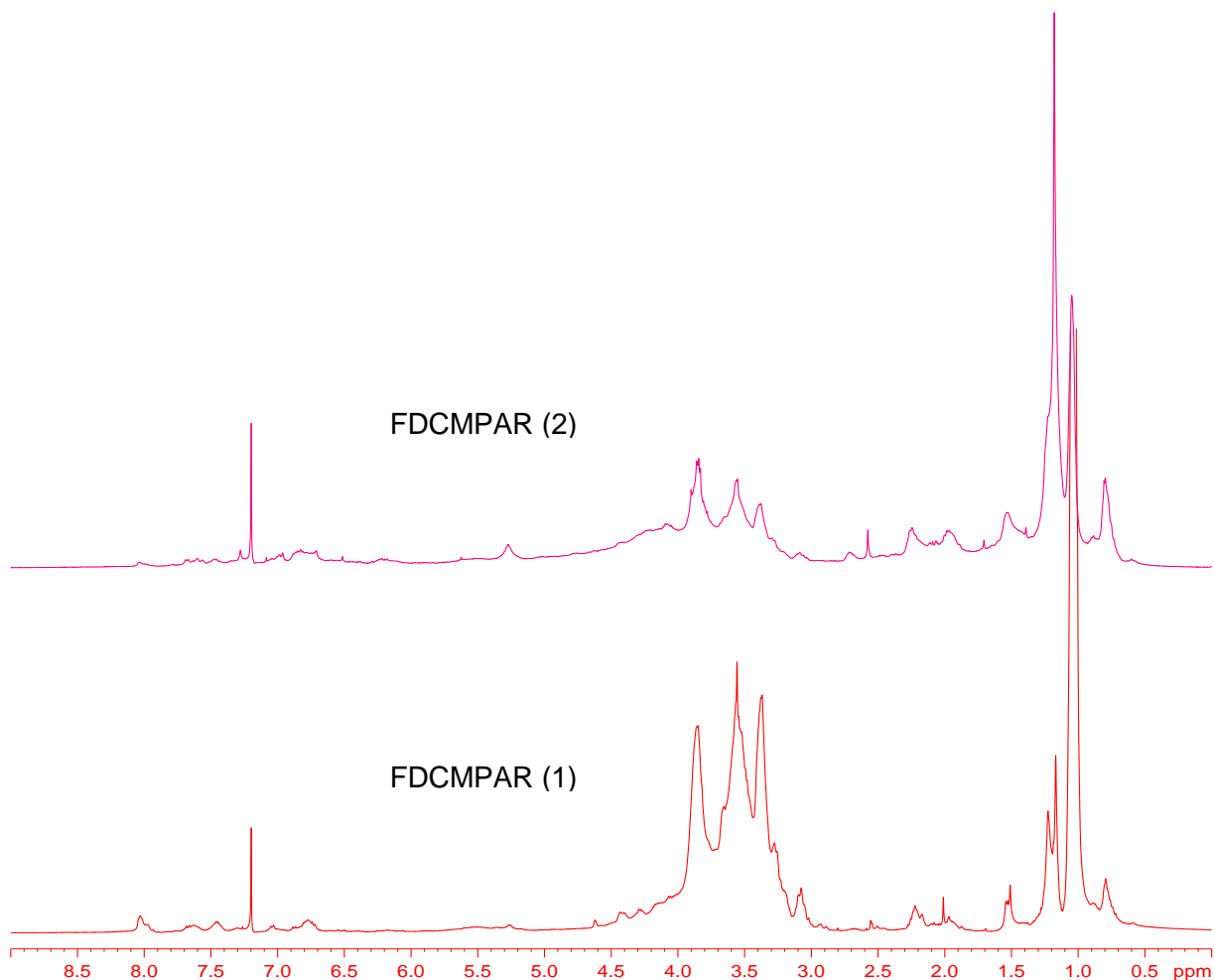


FIGURA 4.2.1.2.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FDCMPAR de *C. rotundus*.  
Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Portanto, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações FDCMR, há a presença de muitos sinais apenas no espectro correspondente à fração FDCMR (1), além de picos mais intensos. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações FDCMPAV, verificou-se que há uma grande similaridade na intensidade dos sinais, exceto para um sinal em  $\delta$  3,37 na fração FDCMPAV (1). Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações FDCMF foram observadas sinais muito mais intensos principalmente na região de  $\delta$  3,0 – 4,0 (carboidratos) para a fração FDCMPAR (1), além da enorme diferença entre os sinais encontrados na região de  $\delta$  1,0 – 1,23 (alifáticos). Estes dados indicam possíveis respostas da planta diante de uma situação de estresse causada por contaminação (neste caso, por metais), com exceção da fração FDCMPAR (1), uma vez que as partes aéreas reprodutivas não receberam esses contaminantes em concentrações significativas (**TABELA 4.1.3** do item 4.1).

### 4.2.1.3 – Frações acetato de etila (FAcOEt)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações acetato de etila (FAcOEt) (FIGURA 4.2.1.3.1) mostraram a presença de compostos de média à alta polaridade, fato este que pôde ser confirmado com a observação de sinais nas regiões características de carboidratos ( $\delta$  3,0 – 6,0) e aromáticos ( $\delta$  6,0 – 9,0). Sabe-se que nesta espécie foi relatada uma série de compostos aromáticos tais como, flavonoides livres e/ou ligados a açúcares, ácidos fenólicos, cromonas, estilbenos, dentre outros (MOHAMED et al., 2015).

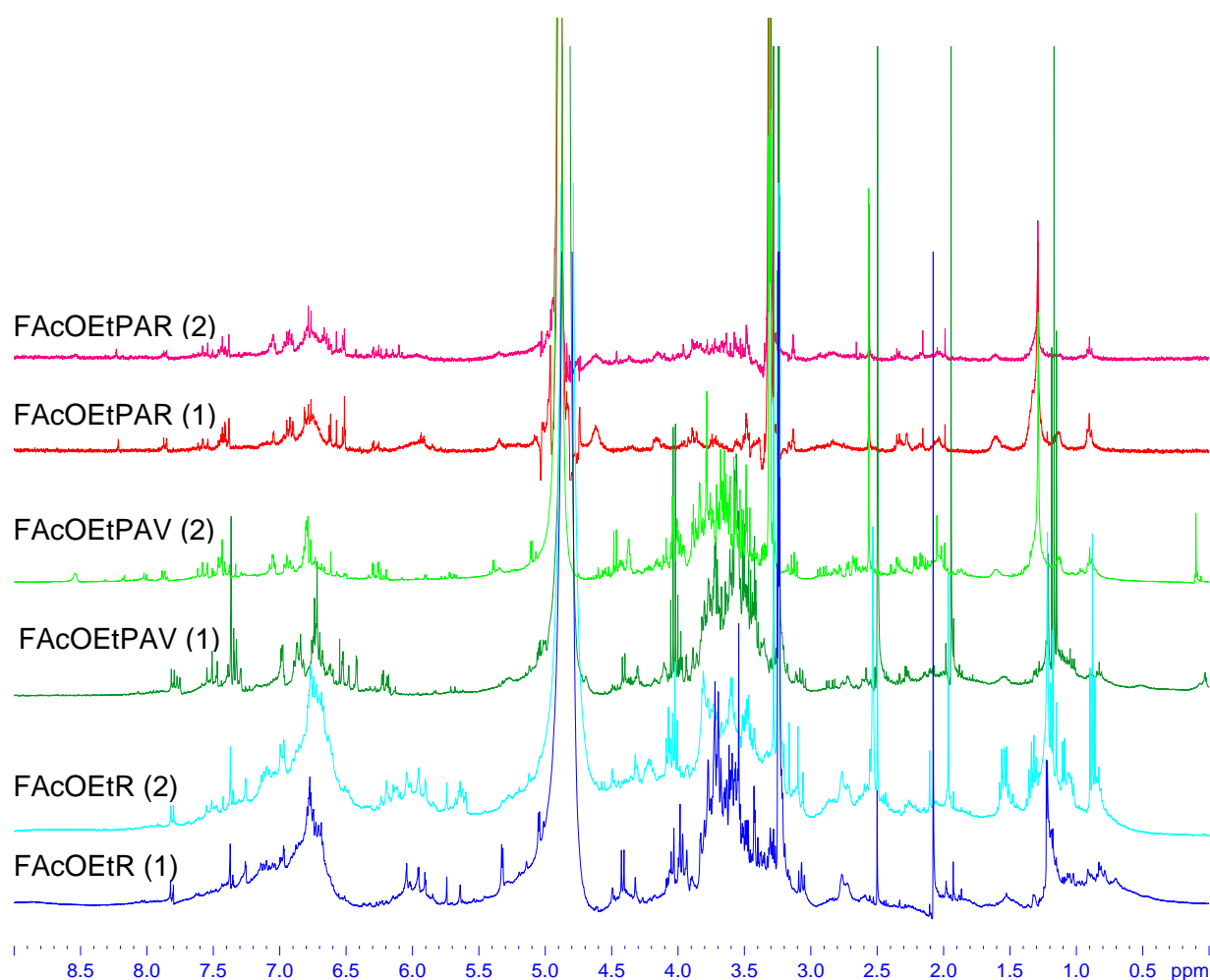


FIGURA 4.2.1.3.1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FAcOEt sobrepostas de *C. rotundus*. Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Os espectros destas frações apresentaram uma quantidade de sinais maior em relação às frações FH e FDCM. Os espectros das frações AcOEt das partes aéreas reprodutivas (FAcOEtPAR) encontram-se em baixas intensidades, isso se deve a pouca quantidade de extrato correspondente a esta parte da planta, conforme listado na **TABELA 3.6.1**, do procedimento experimental.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações AcOEt das dos rizomas (FAcOEtR) (**FIGURA 4.2.1.3.2**), há bastante diferença entre ambas. Observou-se a presença de dois dupletos em torno de  $\delta$  5,0, com constantes de 3,70 Hz, estes estão presentes apenas na FAcOEtR (1).

Diferentemente do que vinha sendo observado nos espectros das frações anteriores (FH e FDCM), foi observada uma quantidade maior de sinais presentes na planta não contaminada, (2), em que a fração FAcEOtR (2) apresentou um singleto em  $\delta$  3,28 e outros sinais na região de  $\delta$  0,8 – 1,7, não encontrados na FAcEOtR (1). Em contrapartida, a fração FAcEOtR (1) também apresentou sinais não encontrados na FAcEOtR (2), conforme relatado no parágrafo anterior, além de sinais com maiores intensidades na região de  $\delta$  3,2 – 4,2, as ampliações destas regiões são mostradas na **FIGURA 4.2.1.3.3**.

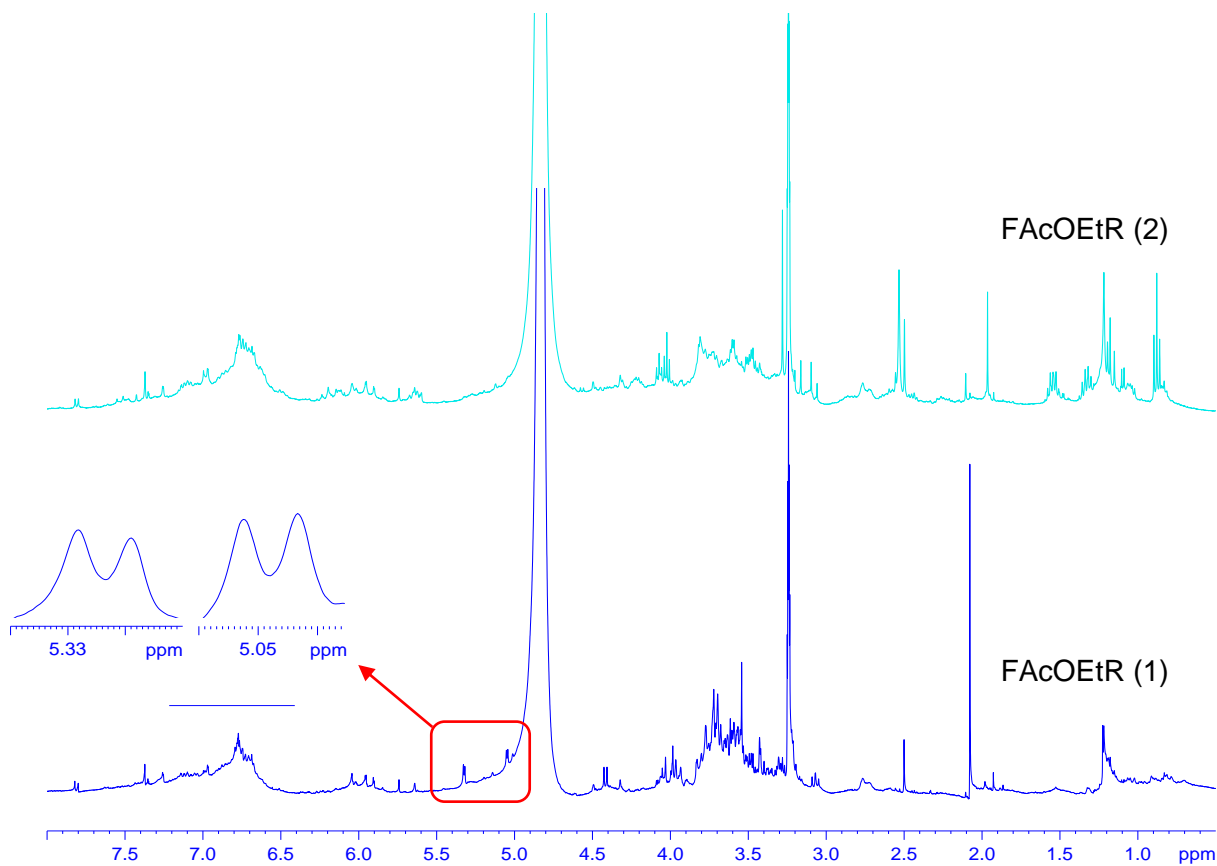


FIGURA 4.2.1.3.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FAcOEtR de *C. rotundus*.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

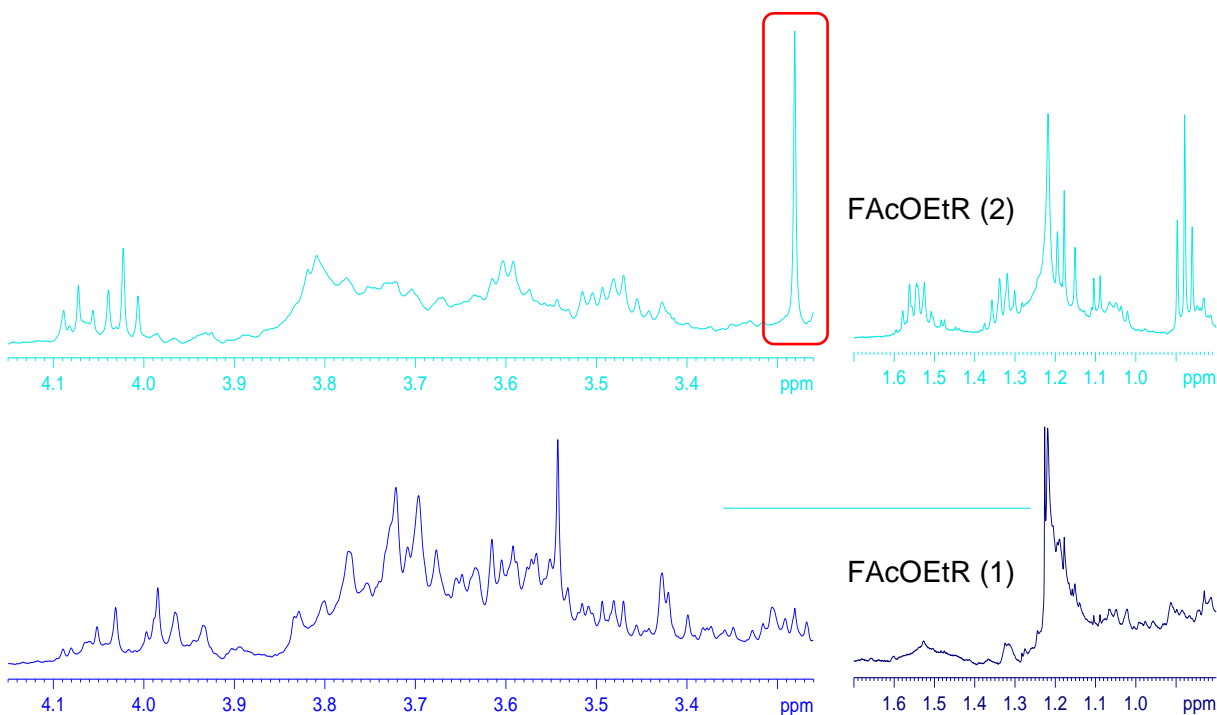


FIGURA 4.2.1.3.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FAcOEtR de *C. rotundus*, regiões ampliadas.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.



Sabe-se que na fitoextração, as raízes das plantas são as partes que recebem os íons metálicos biodisponíveis no solo e realizam a translocação dos mesmos para outros tecidos, fato este, comprovado com os testes de determinação da concentração de metais nos rizomas (1) e (2) de *C. rotundus* (**TABELAS 4.1.1** do item 4.1), em que foram encontradas grandes concentrações de contaminantes nos rizomas (1). Portanto, podemos deduzir que neste caso, as respostas apresentadas pela planta para a PAcOEtR (1) frente à contaminação por metais se deu tanto pelo aumento da produção de determinados compostos, haja vista que estes também foram encontrados na planta (2) (apresentando-se através de picos mais intensos); quanto pela inibição da produção de outros, uma vez que estes compostos foram encontrados apenas na fração FAcOEtR (2). E, podemos citar ainda, pela indução da produção de diferentes compostos, como é o caso dos dupletos presentes apenas na fração FAcOEtR (1), conforme já observados na **FIGURA 4.2.1.3.2**.

Foram realizadas triplicatas experimentais das amostras FAcOEtR (1) e (2) e seus espectros foram analisados por quimiometria.

Na **FIGURA 4.2.1.3.4** está apresentado o gráfico de scores (PC1 x PC2), a obtenção do mesmo permitiu a discriminação entre a amostra FAcOEtR (1) (preto) e FAcOEtR (2) (azul). A triplicata da fração FAcOEtR (1) apresentou-se no eixo negativo da PC1 e a FAcOEtR (2) no eixo positivo. Houve uma maior variação nos espectros da amostra FAcOEtR (2).

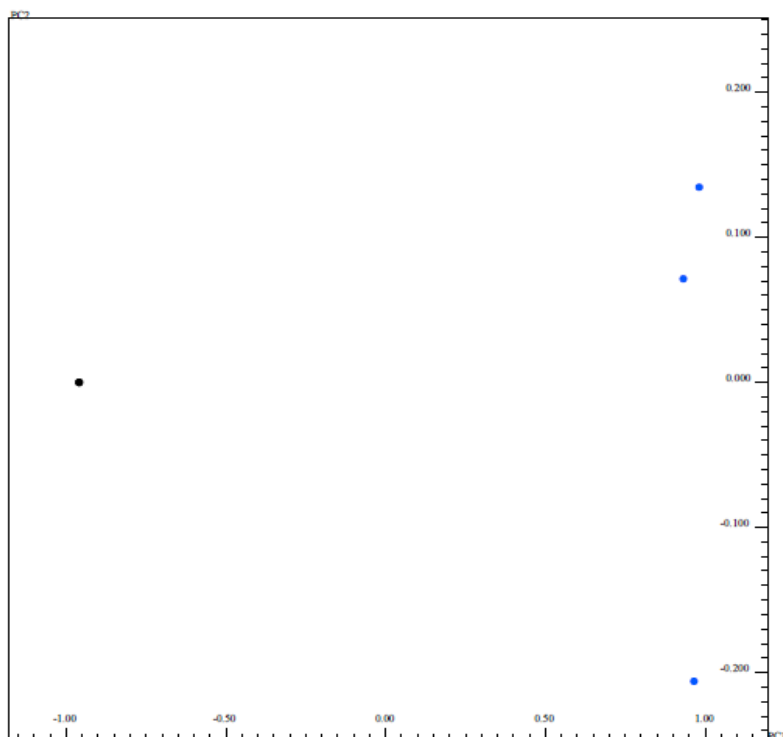


FIGURA 4.2.1.3.4 – Gráfico de scores (PC1 x PC2) das frações FAcOEtR de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,74 % variância total).

Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

A partir do gráfico de *loadings* (PC1 x PC2), mostrado na **FIGURA 4.2.1.3.5**, verificou-se que a variável na região  $\delta$  2,16; e algumas nas regiões de  $\delta$  3,56 – 3,86;  $\delta$  4,06 – 4,60 e  $\delta$  5,06 – 5,42 foram significativas na discriminação da amostra FAcOEtR (1). O singleto em  $\delta$  2,16 é um contaminante, neste caso, a acetona.



apresenta maiores multiplicidades nos sinais, que por sua vez estão bem mais intensos, indicando um possível aumento na concentração de determinados metabólitos já encontrados na fração FAcOEtPAV (2).

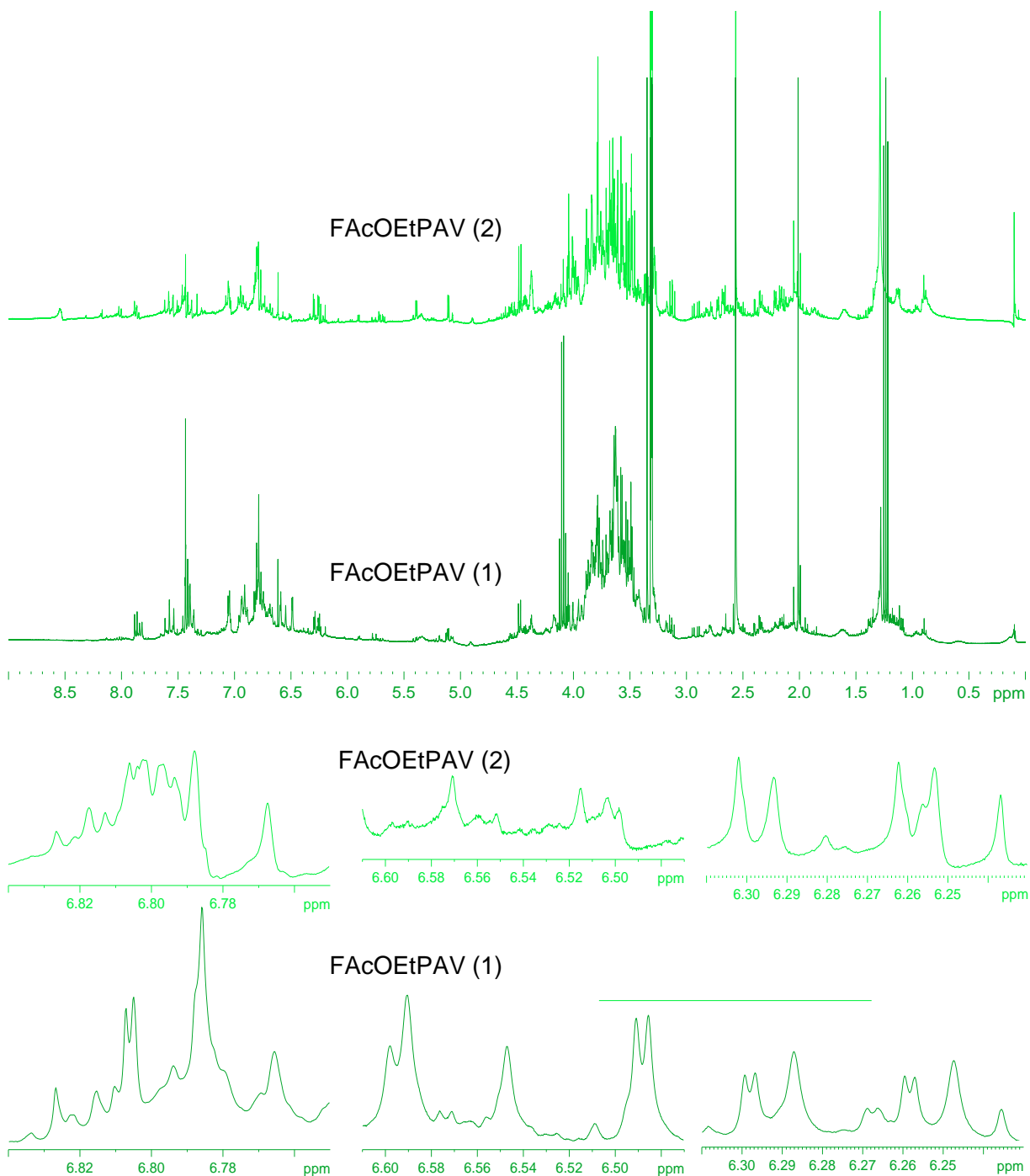


FIGURA 4.2.1.3.6 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H das frações FAcOEt PAV de *C. rotundus*, regiões ampliadas.

Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

A discriminação entre as frações FAcOEtPAV (1) e FAcOEtPAV (2) de *C. rotundus* pôde ser verificada pelo gráfico de *scores* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.3.7**). A triplicata da FAcOEtPAV (1) se apresentou no eixo negativo da PC1 e da FAcOEtPAV (2) no eixo positivo da PC1.

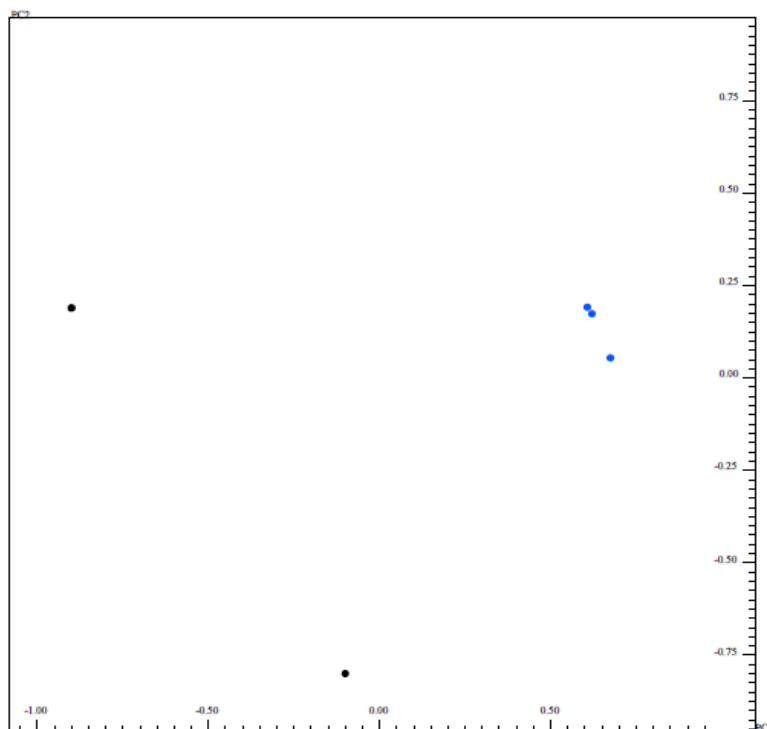


FIGURA 4.2.1.3.7 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAV de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,90 % variância total).  
Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

Com o gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.3.8**) foi possível verificar que as variáveis  $\delta$  3,48, 3,53, 3,58, 3,83, 3,88, 3,93 e sinais entre  $\delta$  6,78 – 7,38 foram significativas na distinção da amostra FAcOEtPAV (1) no eixo negativo da PC1. Já para a amostra FAcOEtPAV (2), foram as variáveis em  $\delta$  1,23, 1,28, 1,33, 1,38, 3,98, 4,00, 4,38.

Alguns desses sinais foram caracterizados por RMN 1D como acetato de etila ( $\delta$  1,22, 2,01 e 4,11) e metanol comum ( $\delta$  3,36) (**FIGURA 4.2.1.3.9**).



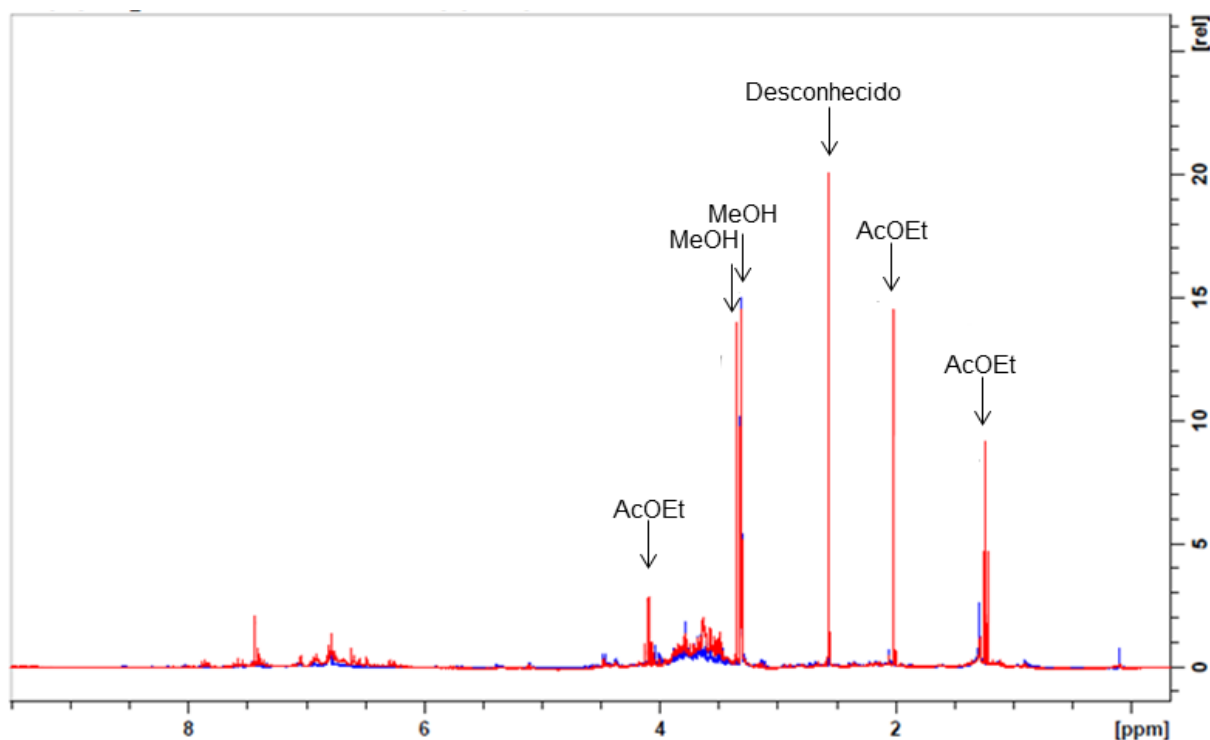


FIGURA 4.2.1.3.9 – Sinais caracterizados por RMN 1D nas frações FAcOEtPAV de *C. rotundus*.  
Nota: Vermelha (contaminada); Azul (não contaminada)

Os sinais em  $\delta$  1,31 e 4,01 foram os significativos para a fração FAcOEtPAV (2). O deslocamento químico em  $\delta$  1,26 é referente a hidrogênios alifáticos, e o sinal em  $\delta$  2,56 pode ser referente a um ácido ainda não determinado. O sinal em  $\delta$  1,31 também é de hidrogênios alifáticos e em  $\delta$  4,01 pode referir-se a ácidos ou algum carboidrato.

Portanto, para o espectro das frações FAcOEtPAV (1) e (2) observou-se algumas alterações no perfil químico da planta; haja vista que houve alterações dos sinais na região de carboidratos, aminoácidos, polipeptídeos e também na região aromática; em grande parte destas regiões os sinais apresentaram maiores multiplicidades e muitos deles maiores intensidades no espectro corresponde à fração FAcOEtPAV (1).

Portanto, assim como no caso dos rizomas, podemos supor que tais alterações têm relação direta com a grande quantidade de alguns metais encontrada através do teste de determinação de metais nas partes aéreas vegetativas (1) (TABELAS 4.1.2 do item 4.1) em que foi confirmada que dentre todas as amostras analisadas, esta foi a que apresentou maiores concentrações de metais.

De acordo com a literatura consultada, a presença de metal pesado causa uma série de danos a níveis moleculares (proteínas e DNA) e consequentes distúrbios metabólicos em função do mau funcionamento dessas biomoléculas. Plantas expostas ao chumbo, por exemplo, podem apresentar altas concentrações de fenóis, produzidos como estratégia não enzimática de lidar com o estresse oxidativo provocado pelo metal (HOSSAIN et al., 2011). Compostos fenólicos possuem grupos hidroxilo e carboxilo, capazes de se ligarem a metais (MICHALAK, 2006). O aumento da concentração de fenóis foi observado por WANG et al. (2011) em *Vallisneria natans* exposta ao chumbo. Evidências mostram que o aumento da concentração de fenóis pode ajudar na remoção do metal nos tecidos da planta por contribuir com a remoção do oxigênio reativo e com a quelação do metal (PAWLIK-SKOWRÓNSKA & BACKOR, 2011).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações AcOEt das partes aéreas reprodutivas (FAcOEtPAR) (**FIGURA 4.2.1.3.10**) apresentaram um perfil espectral rico, com sinais em várias regiões dos espectros, principalmente entre  $\delta$  3,44 – 4,20 e  $\delta$  5,83 – 8,70. Uma comparação visual mostrou bastantes semelhanças entre as frações FAcOEtPAR (1) e (2), em que as diferenças consistiam apenas em sinais mais intensos para a fração FAcOEtPAR (1) quando comparado à fração FAcOEtPAR (2) e um singlete intenso em  $\delta$  4,88 apenas na fração FAcOEtPAR (1), resultado que é compatível aos cromatogramas já mostrados na **FIGURA 4.1.1c** do item 4.1. Assim, podemos associar esse resultado ao teste de determinação de metais para as partes aéreas reprodutivas (1) e (2) (**TABELAS 4.1.3** do item 4.1), em que as diferenças observadas nas concentrações dos mesmos foram muito sutis entre ambas as amostras, permanecendo praticamente constantes, evidenciando que a planta não transloca metais para estes tecidos.



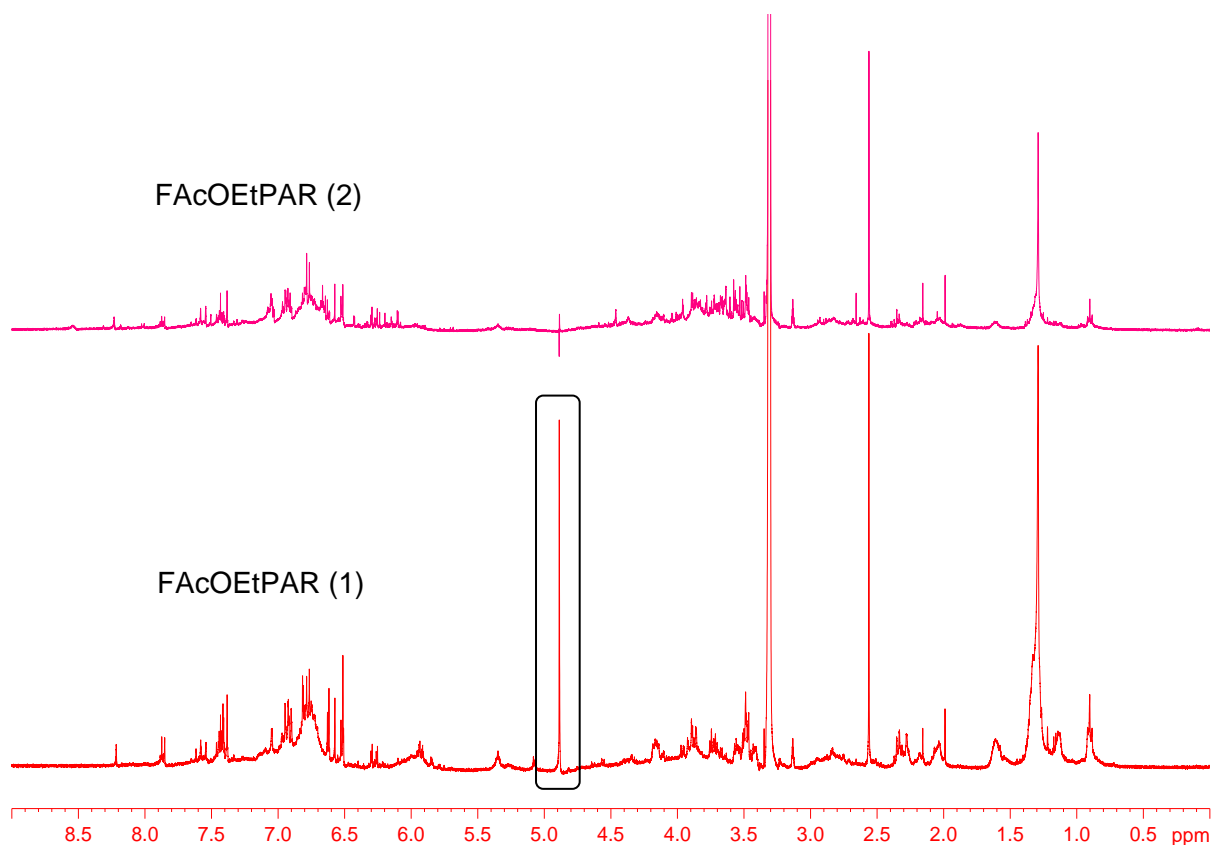


FIGURA 4.2.1.3.10 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FAcOEtPAR de *C. rotundus*.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

O gráfico de *scores* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.3.11**) mostrou certa distinção no modelo entre as frações FAcOEtF (1) e (2) de *C. rotundus*. A triplicata da FAcOEtPAR (1) (preto) se apresentou no eixo negativo da PC1 e no caso da FAcOEtPAR (2) (azul), no eixo positivo.

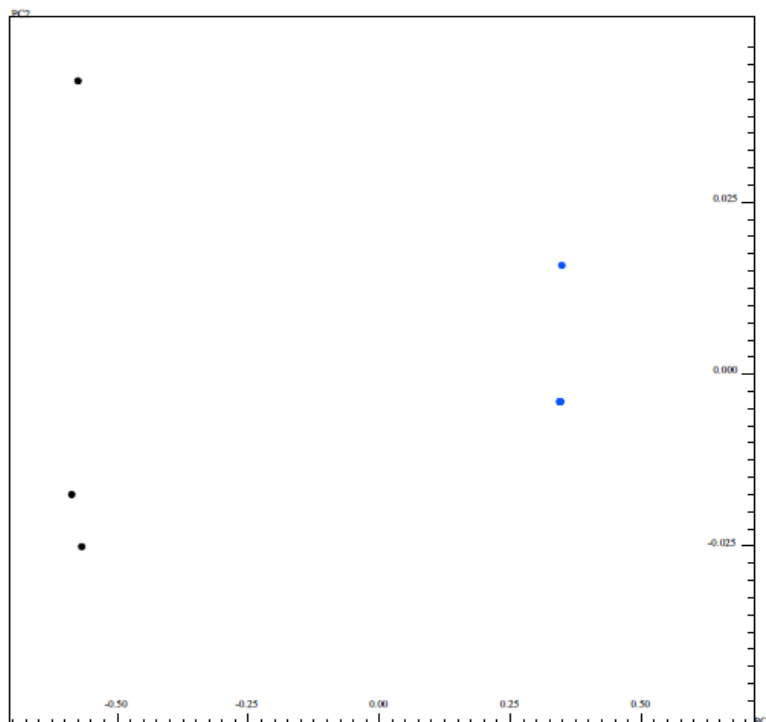


FIGURA 4.2.1.3.11 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) das frações FAcOEtPAR de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,96 % variância total).

Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

Com o gráfico de *loadings* (PC1 x PC3) (**FIGURA 4.2.1.3.12**) foi possível verificar que as variáveis  $\delta$  0,91; 1,11; 1,16; 1,21; 1,26; 1,31; 1,36 e 1,61 foram significativas na distinção da amostra FAcOEtPAR (1) no eixo negativo da PC1. Esses sinais são característicos de hidrogênios de ligações saturadas e alifáticas. Já os sinais significativos para a amostra FAcOEtPAR (2) foram os deslocamentos químicos na faixa entre  $\delta$  3,11 e 3,86. Esses podem ser característicos de carboidratos e aminoácidos.



hidroalcoólicas dos rizomas (1) e (2) e para as frações das partes aéreas vegetativas (1) e (2), pode-se observar espectros com sinais correspondentes principalmente, a carboidratos ( $\delta$  3,0 – 6,0).

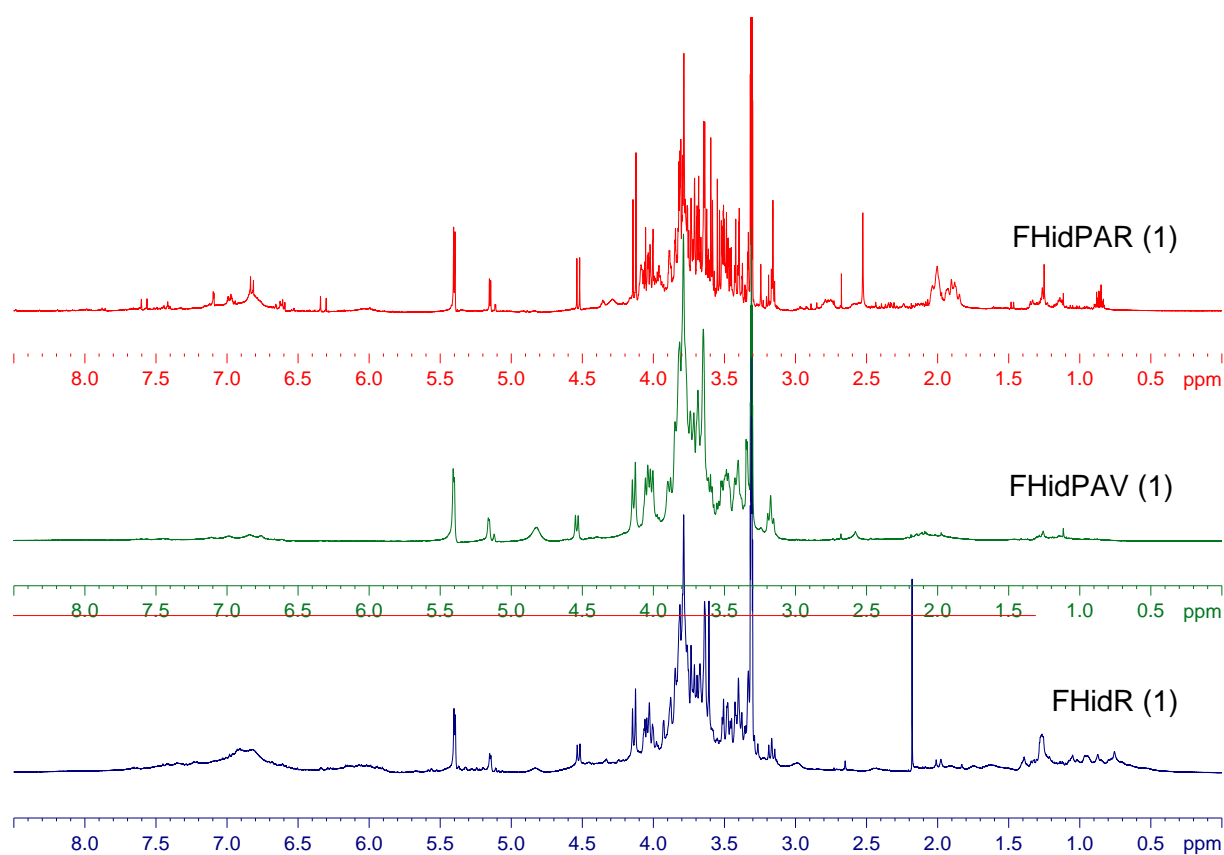


FIGURA 4.2.1.4.1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHid (1) de *C. rotundus*.

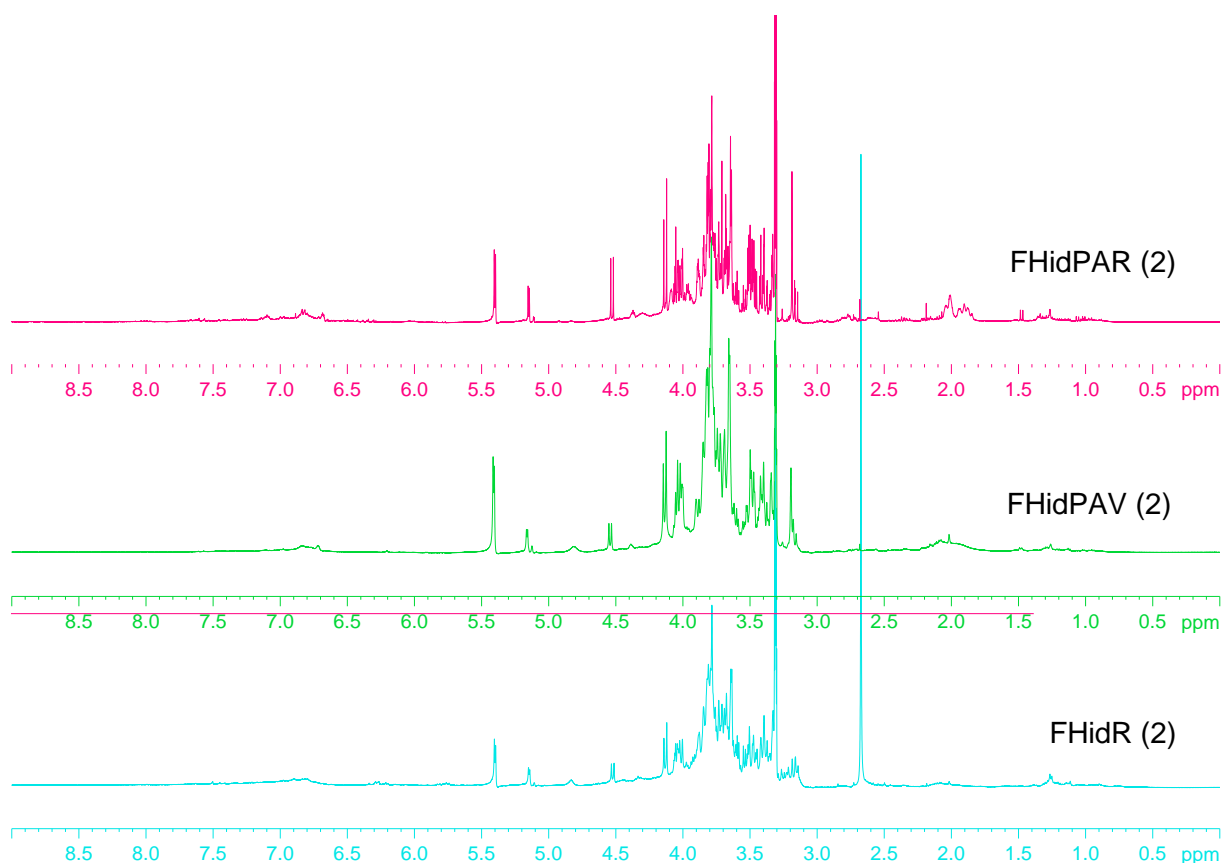


FIGURA 4.2.1.4.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHid (2) de *C. rotundus*.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações hidroalcoólicas dos rizomas (FHidR) (**FIGURA 4.2.1.4.3**) apresentaram um perfil espectral contendo sinais principalmente na região central de carboidratos ( $\delta$  3,0 – 6,0). É possível notar a diminuição dos sinais na região alifática ( $\delta$  0,0 – 3,0), quando comparados com espectros observados das frações anteriores.

A análise visual comparativa mostrou que houve uma sutil alteração no perfil espectral da FHidR (1) em relação à FHidR (2). As intensidades dos sinais são semelhantes, sendo a principal diferença, a presença de um singlete em  $\delta$  2,18 (podendo ser acetona) na amostra FHidR (1) e outro singlete em  $\delta$  2,67 na amostra FHidR (2), que provavelmente são contaminantes. Há, ainda, a presença de outro singlete em  $\delta$  3,61, o qual está presente apenas na FHidR (1).

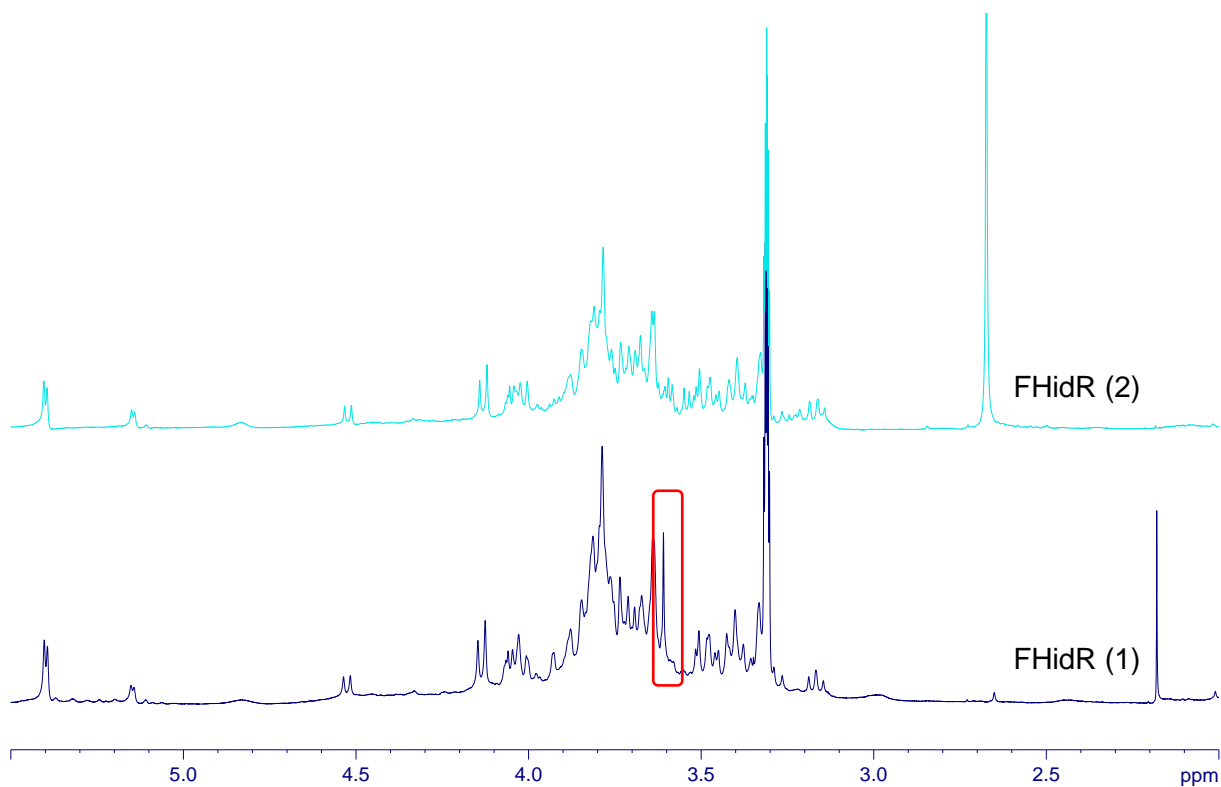


FIGURA 4.2.1.4.3 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHidR de *C. rotundus*.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Pelo gráfico de scores (PC1 x PC2) (FIGURA 4.2.1.4.4) podem-se verificar algumas diferenças entre as amostras FHidR (1) (preto) e a FHidR (2) (azul) de *C. rotundus*. A triplicata da amostra FHidR (1) se apresentou no eixo negativo da PC1, enquanto a triplicata da amostra FHidR (2) no eixo positivo. As multiplicatas experimentais da FHidR (1) apresentaram espectros de RMN de  $^1\text{H}$  idênticos, já na amostra FHidR (2) houve pequenas variações nos espectros das multiplicatas.

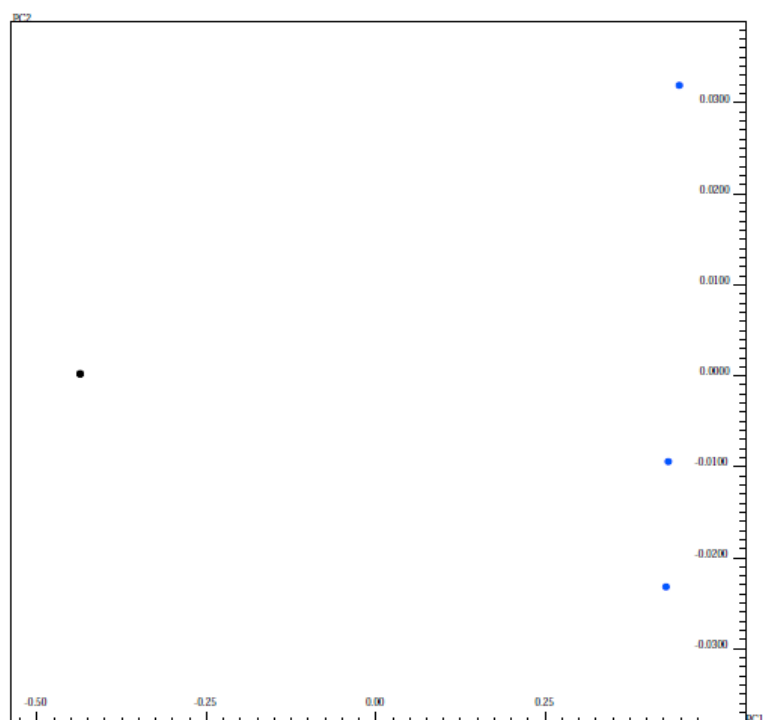


FIGURA 4.2.1.4.4 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) das frações FHidR de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,95 % variância total).  
Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

Com o gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.4.5**) foi possível verificar que as variáveis  $\delta$  2,66 e 2,71 (correspondente a um ácido ainda não identificado) foram significativos na distinção da amostra FHidR (2) no eixo positivo da PC1; enquanto as variáveis em  $\delta$  1,26 e 3,61 foram significativas para a amostra FHidR (1) no eixo negativo da PC1.





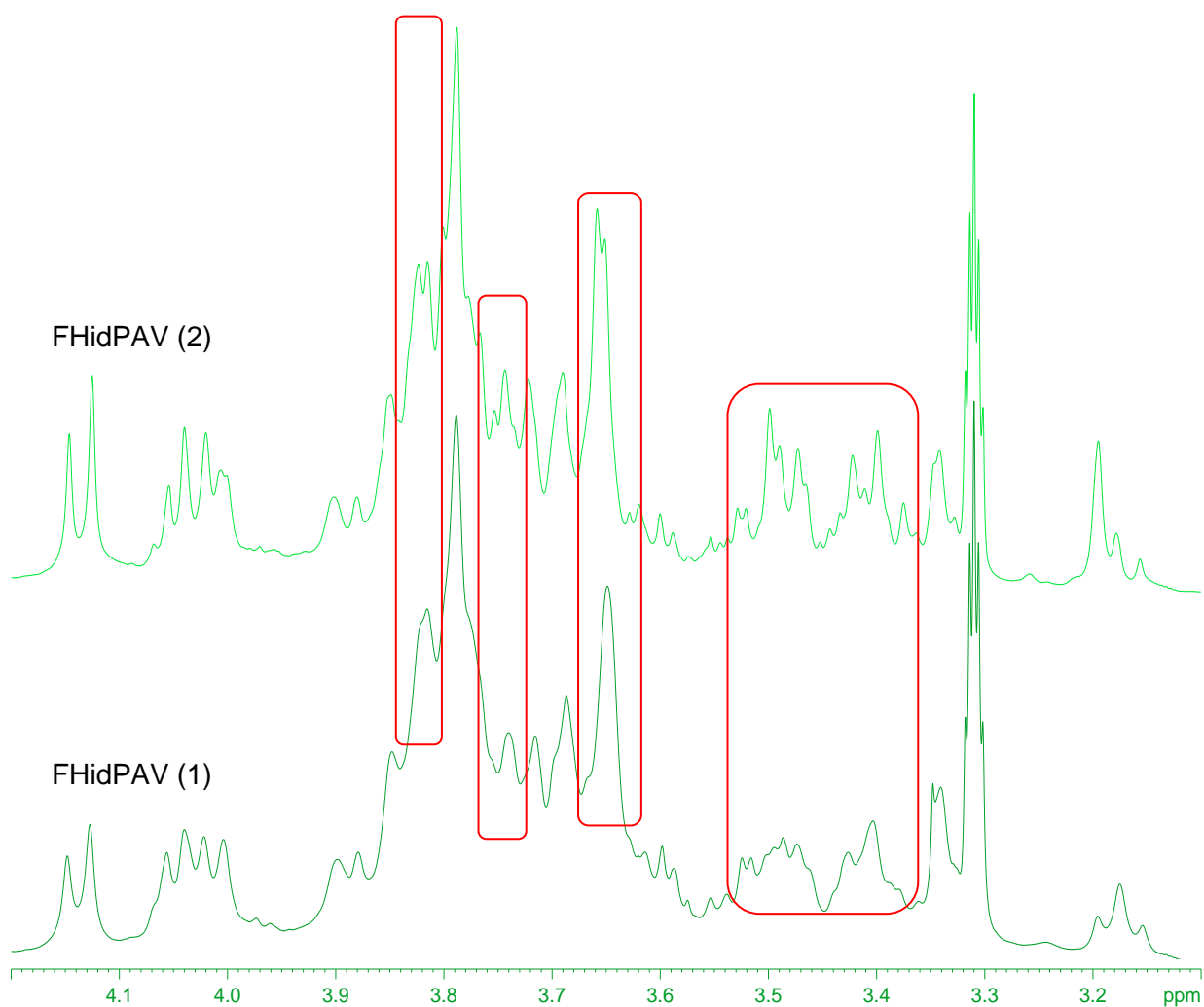


FIGURA 4.2.1.4.6 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHidPAV de *C. rotundus*.  
 Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Pelo gráfico de scores (PC1 x PC2) (FIGURA 4.2.1.4.7) pôde ser verificada a discriminação entre as amostras FHidPAV (1) (preto) e a FHidPAV (2) (azul) de *C. rotundus*. A triplicata da amostra FHidPAV (1) se apresentou no eixo negativo da PC1 e a da amostra FHidPAV (2) no eixo positivo. As multiplicatas experimentais da FHidPAV (1) apresentaram os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  idênticos.

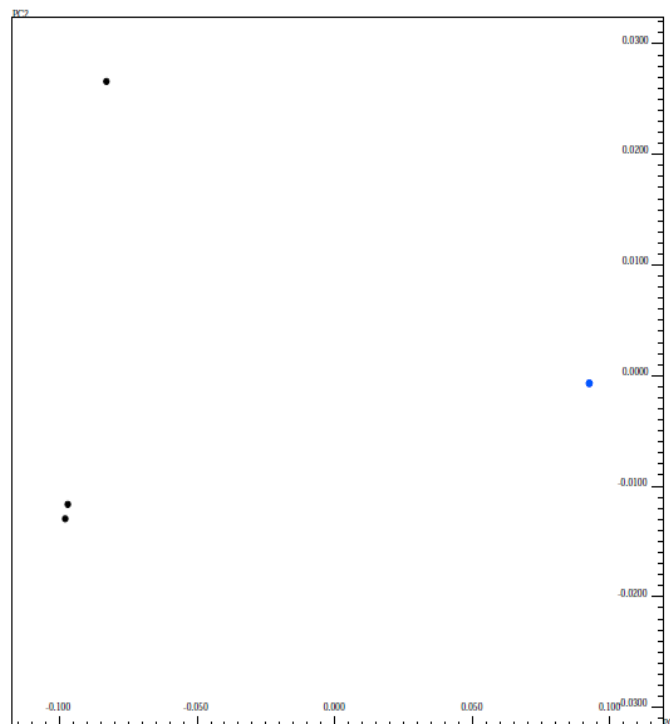


FIGURA 4.2.1.4.7 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) das frações FHidPAV de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,19 % variância total).  
Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

Com o gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.4.8**) foi possível verificar que as variáveis entre  $\delta$  3,16 – 3,76 (região característica de carboidratos e aminoácidos) foram significativas na discriminação da amostra FHidPAV (1), no eixo negativo da PC1. Enquanto os sinais significativos para a amostra FHidPAV (2) foram aqueles observados na região em  $\delta$  2,01; 2,06; 3,21; 4,01; 4,13 e 5,41, os dois últimos sinais são correspondentes ao carboidrato sacarose, já caracterizado anteriormente.

Através do gráfico 1D (**FIGURA 4.2.1.4.8**) é possível verificar que os deslocamentos químicos na região central dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram os determinantes na discriminação entre as amostras (1) e (2).

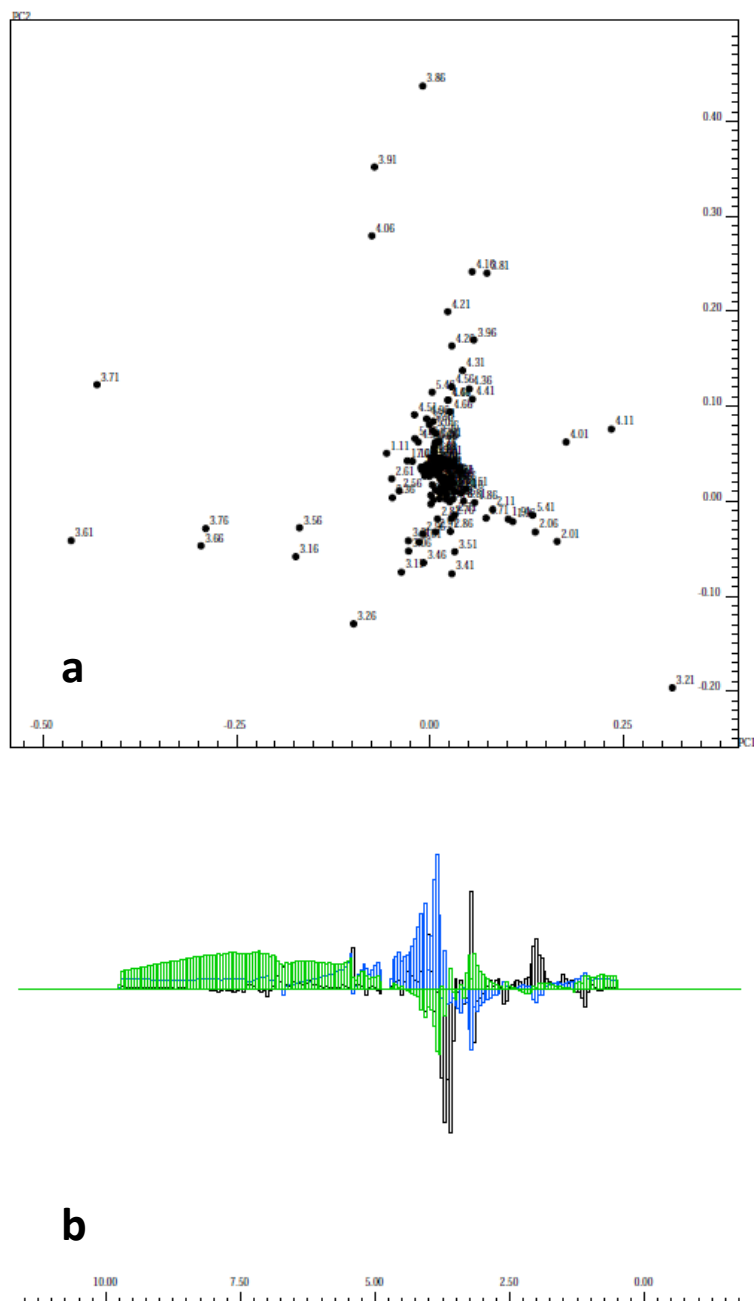


FIGURA 4.2.1.4.8 – Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) das frações FHidPAV de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN. Nota: a) *loading plot*; b) *loading 1D*.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações hidroalcólicas das partes aéreas reprodutivas (FHidPAR) (**FIGURA 4.2.1.4.9**) apresentaram um perfil rico em sinais por todo o espectro de  $^1\text{H}$  RMN, principalmente em  $\delta$  3,0 – 4,20 e também sinais bem definidos na região aromática ( $\delta$  6,3 – 8,7).

A amostra correspondente à FHidPAR (1) apresentou um aumento nas intensidades dos sinais nas faixas de  $\delta$  0,7 – 3,0; 3,55 – 3,60 e 6,2 – 7,6. Logo, pôde-se observar que o perfil químico dessa amostra sofreu alterações, porém estas

não estão ligadas à contaminação por metais, haja vista que os mesmos não são translocados para as partes aéreas reprodutivas conforme já mencionado (**FIGURA 4.1.3** do item 4.1), portanto, deve haver outros interferentes que ocasionaram essas alterações.

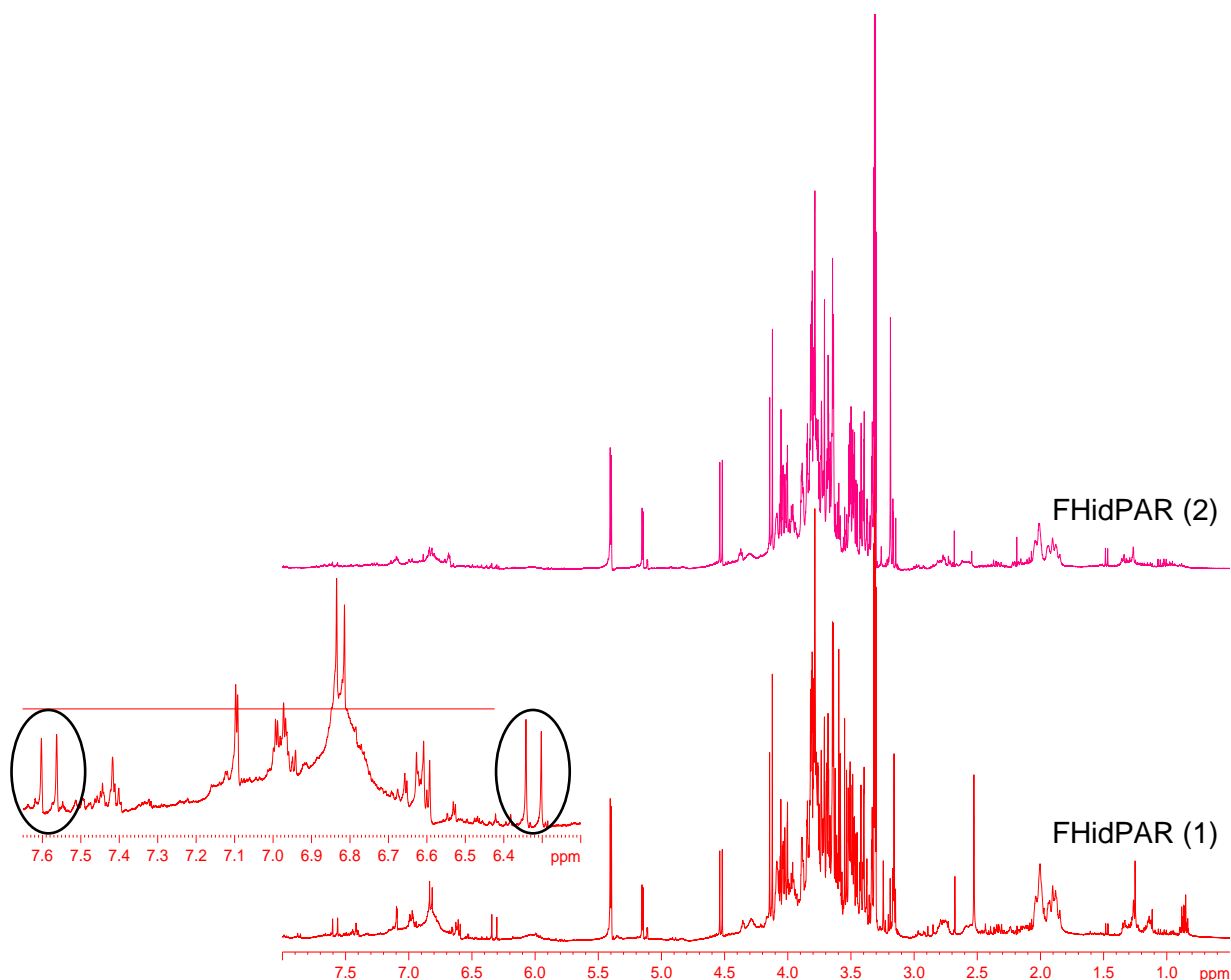


FIGURA 4.2.1.4.9 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das frações FHidPAR de *C. rotundus*.  
Nota: (1) contaminada e (2) não contaminada.

Pelo gráfico de *scores* (PC1 x PC2) da fração FHidPAR (1) e (2) (**FIGURA 4.2.1.4.10**) verificou-se uma diferença acentuada entre elas. A triplicata da amostra FHidPAR (1) se apresentou no eixo negativo da PC1 e as da amostra FHidPAR (2) no eixo positivo. As multiplicatas experimentais da amostra FHidPAR (2) apresentaram espectros de  $^1\text{H}$  RMN idênticos.

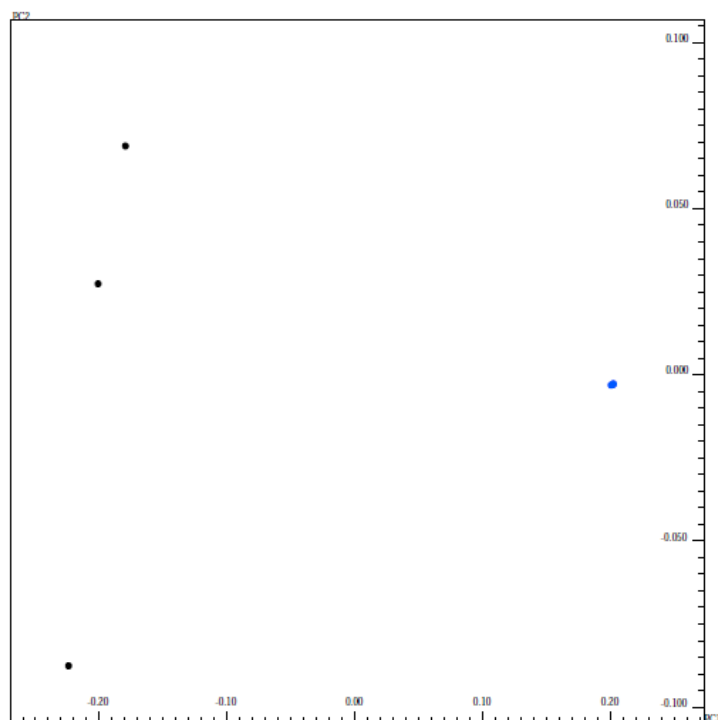


FIGURA 4.2.1.4.10 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) das frações FHidPAR de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN (99,90 % variância total).

Nota: 1 (preto) e 2 (azul).

Através do gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) (**FIGURA 4.2.1.4.11A**) foi possível verificar que as variáveis na região alifática ( $\delta$  0,86; 1,26; 1,86 e 1,91), os sinais característicos na região de carboidratos e aminoácidos ( $\delta$  3,16; 3,26 e  $\delta$  3,44 – 3,79) e sinais na região aromática ( $\delta$  6,28 – 7,63) foram significativos na discriminação da amostra FHidPAR (1), no eixo negativo da PC1. Enquanto para a amostra FHidPAR (2) a principal variável foi o sinal correspondente ao deslocamento químico em  $\delta$  3,21.

Portanto, para as amostras em questão, as diferenças mais drásticas foram verificadas nas regiões de carboidratos, aminoácidos e polipeptídeos, além de alterações na região aromática.

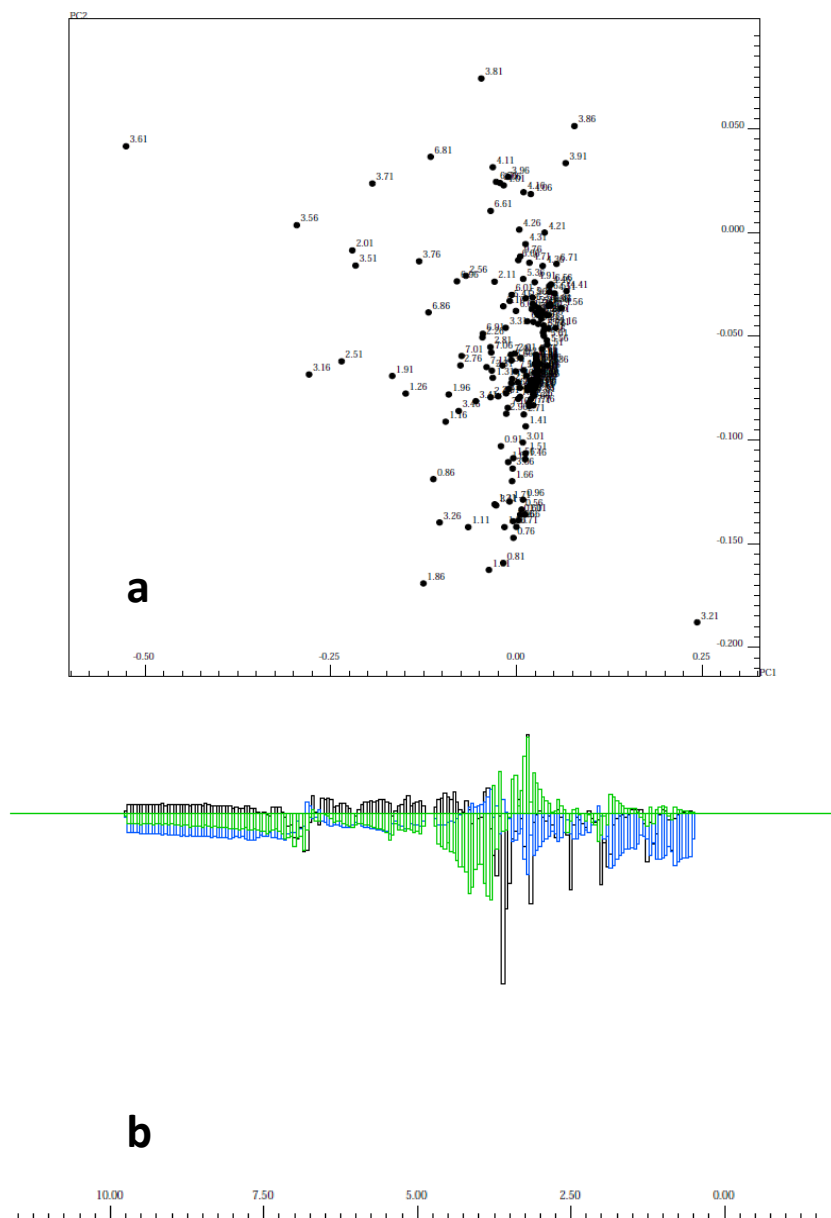


FIGURA 4.2.1.4.11 – Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) das frações FHidPAR de *C. rotundus* por  $^1\text{H}$  RMN.

Nota: a) *loadina plot*. b) *loadina 1D*.

Com a obtenção de triplicatas experimentais de  $^1\text{H}$  RMN das frações analisadas da espécie *C. rotundus* aliado ao tratamento quimiométrico (PCA), foi possível verificar inúmeras diferenças entre todas elas, conforme mostrado na **FIGURA 4.2.1.4.12**. Observaram-se sinais de várias classes de compostos, distribuídos em três regiões: a região alifática ( $\delta$  0,0 – 3,0), carboidratos ( $\delta$  3,0 – 6,0) e aromáticos ( $\delta$  6,0 – 9,0). Os compostos determinados estão listados na **TABELA 4.2.1**.

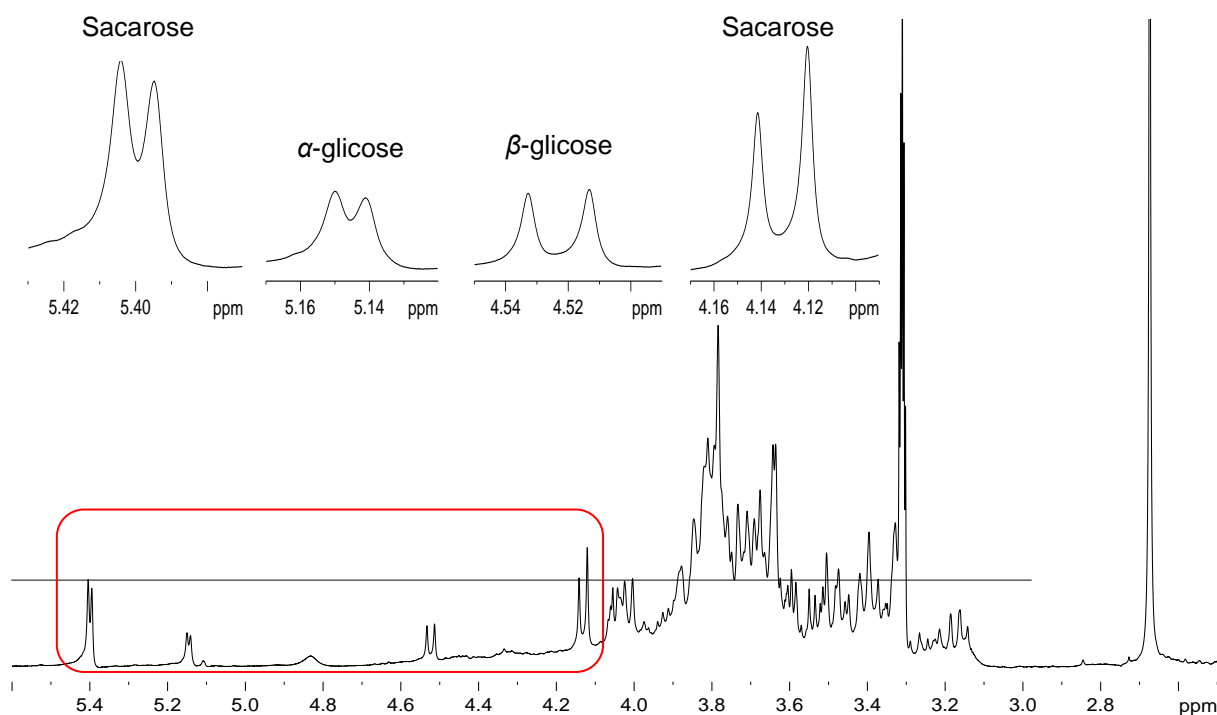


FIGURA 4.2.1.4.12 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração hidroalcoólica dos rizomas não contaminados – FHidR (1) – de *C. rotundus*.

TABELA 4.2.1 – Metabólitos determinados nas diferentes frações de *C. rotundus*.

Composto	$^1\text{H}$
$\alpha$ - glicose	5,14 (d, 3,60)
$\beta$ – glicose	4,52 (d, 7,90)
Sacarose	5,40 (d, 3,90 Hz)
Sacarose	4,13 (d, 8,75 Hz)
Sacarose	3,40 (d, 9,40)
Ácido glutárico	2,58 (t, 7,45 Hz)
Ácido glutárico	2,10 (t, 7,45 Hz)
Treonina	1,30 (d, 6,5)
Treonina	3,59 (d, 4,6)
Metilamina	2,67 s
Rhamnose	3,40 (t, 9,50)
Rhamnose	5,10 (d, 1,70)
Contaminantes	$^1\text{H}$
Acetona	2,14 (s)
Acido acético	1,99 (s)
Água	4,87 (s)
Clorofórmio	7,90 (s)
Etanol	1,19 (t, 7,0)
Desconhecido	3,60 (q, 7,0)
Metanol	3,34 (s)
Acetato de etila	1,22 (t, 7,04)

#### 4.2.2 – Determinação de compostos encontrados na fração FAEPA (2) de *C. rotundus* por LC-SPE-NMR

Uma vez confirmada a grande diferença entre frações acetato de etila das partes aéreas vegetativas (FACOEtPAV) das plantas (1) e (2), estas, foram levadas para posterior análise no HPLC-SPE-NMR e HPLC-MS, para que os picos incomuns às amostras de mesma natureza fossem trapeados, para posterior determinação estrutural. Portanto, com o uso do modo “*threshold*” em 342 nm (FIGURA 4.2.2.1) foram aprisionadas 8 bandas diferentes na FACOEtPA (2) quando comparados com a FACOEtPAV (1) – FIGURA 4.2.2.2 –, e destas, apenas quatro bandas foram elucidadas completamente.

Às bandas (amostras) aprisionadas foram atribuídos os códigos **D1, D2, D3, D4, D5, D6 e D7** (correspondentes àquelas aprisionadas a partir das partes aéreas vegetativas da planta contaminada) e **P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8** (correspondentes àquelas aprisionadas a partir das partes aéreas vegetativas da planta não contaminada), as numerações dos códigos indicam a sequência em que estas amostras foram aprisionadas.

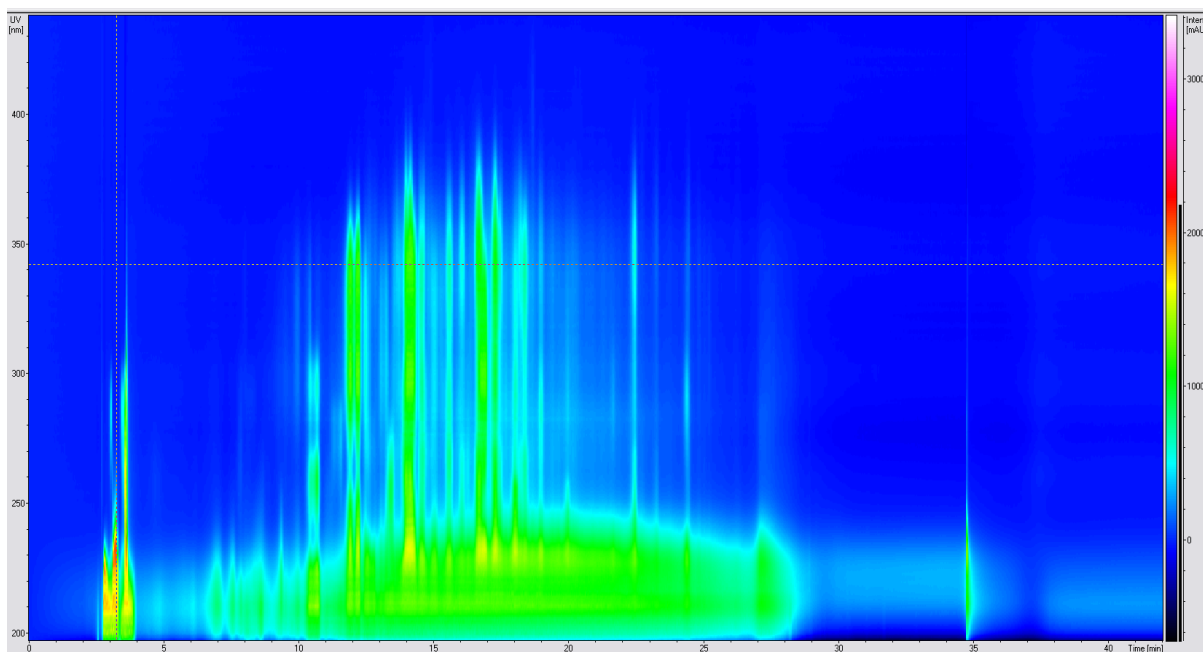


FIGURA 4.2.2.1 – Cromatograma DAD para o cromatograma do perfil químico de uma das frações FACOEtPAV de *C. rotundus*.



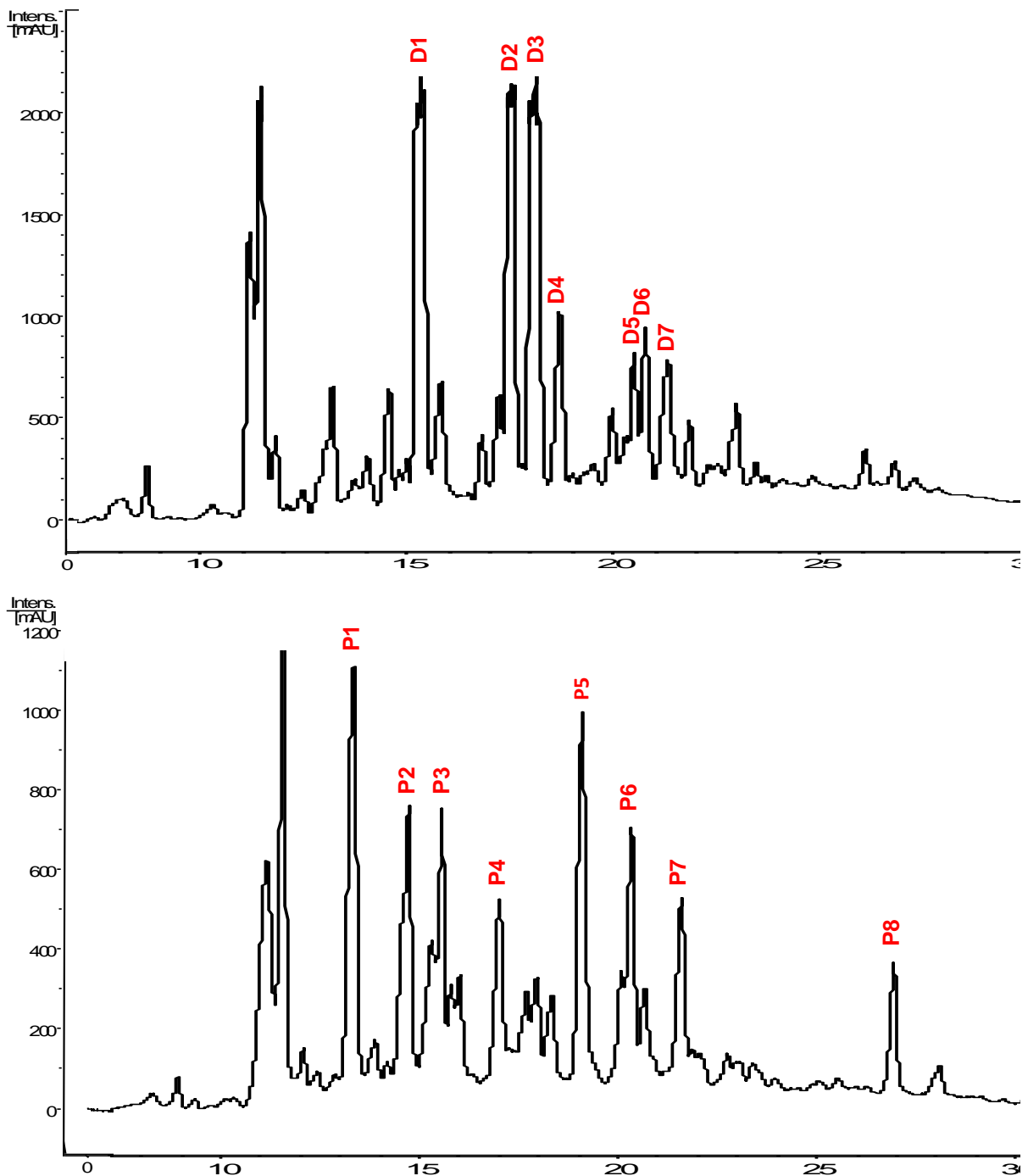


FIGURA 4.2.2.2 – Cromatograma obtido por HPLC-UV-SPE-NMR das frações FAcOEtPAV (1) e (2), respectivamente, da espécie *C. rotundus*.

#### 4.2.2.1 – Determinação estrutural de P-1, P-2 e P-5

O estudo fitoquímico das amostras aprisionadas da FAcOEtPAV (2) de *C. rotundus* (**FIGURA 3.6.3.2** do item 3.6.3), foi realizado por RMN 1D e 2D, e HPLC-MS, estes, permitiram identificar os compostos a seguir.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu caracterizar as amostras P-1, P-2 e P-5 (**FIGURA 4.2.2.1.1**, **FIGURA 4.2.2.1.2**, **FIGURA 4.2.2.1.3**, respectivamente) como derivados do ácido cinâmico, com uma feição comum caracterizada por um par de dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,59 – 7,53 (1H,  $J = 16$  Hz; H-1') e  $\delta_{\text{H}}$  6,25 – 6,29 (1H,  $J = 16$  Hz; H-2'), referentes aos de hidrogênios olefínicos típicos do sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos C6-C3, correspondentes aos hidrogênios H-1' e H-2'. Os demais valores atribuídos aos sinais correspondentes ao anel aromático demonstram sutis diferenças entre P-1, P-2 e P-5. Nas regiões de deslocamentos  $\delta_{\text{H}}$  5,25, 4,15, 3,68, 3,57 e 1,2 (regiões ampliadas na **FIGURA 4.2.2.1.4**) aparecem picos correspondentes a impurezas e/ou picos do próprio equipamento, os quais se repetem em todas as outras análises, bem como o singleto bem definido em  $\delta_{\text{H}}$  3,27. Não foi possível a obtenção do espectro de  $^{13}\text{C}$  para nenhuma das amostras analisadas (P-1, P-2, P-5 e P-6), portanto, os valores aproximados atribuídos aos carbonos de cada amostra, foram propostos a partir de experimentos bidimensionais HSQC e HMBC.

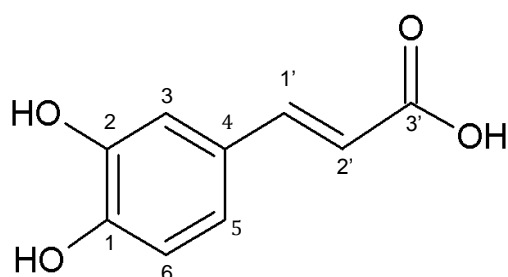


FIGURA 4.2.2.1.1 – Ácido *trans*-cafeico (P-1).

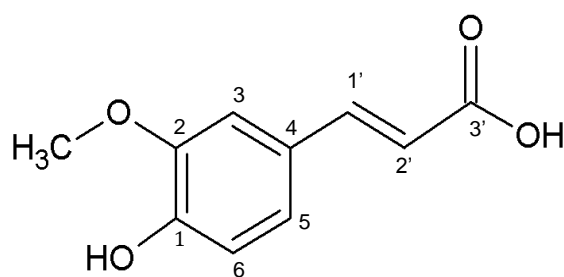


FIGURA 4.2.2.1.2 – Ácido *trans*-ferúlico (P-2).

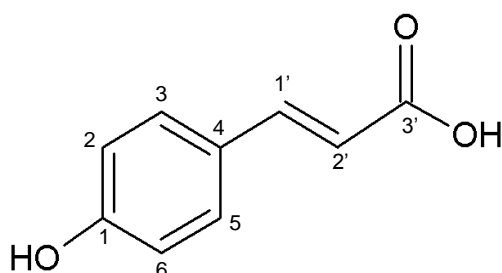


FIGURA 4.2.2.1.3 – Ácido *p*-cumárico (P-5).

Os sinais em  $\delta_H$  7,11 (1H, d,  $J_{meta} = 2$  Hz, H-3),  $\delta_H$  7,02 (dd,  $J_{meta}$ ,  $J_{orto} = 2$  e 8,2 Hz, H-5) e  $\delta_H$  6,84 (d,  $J_{orto} = 8,2$  Hz, H-6) observados no espectro de RMN de  $^1H$  de P-1 (**FIGURA 4.2.2.1.4**) foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-5 e H-6, respectivamente. Esses dados sugerem a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. No espectro de HSQC (**FIGURA 4.2.2.1.5**), pode-se observar as correlações entre os sinais em  $\delta_H$  7,11 e  $\delta_C$  116 (C-3);  $\delta_H$  6,84 e  $\delta_C$  117,58 (C-6);  $\delta_H$  7,58 e  $\delta_C$  147,5 (C-1');  $\delta_H$  6,29 e  $\delta_C$  118 (C-2'). No espectro de HMBC (**FIGURA 4.2.2.1.6**) pode-se observar as correlações entre os sinais entre o hidrogênio em  $\delta_H$  7,58 e os carbonos em  $\delta_C$  170 a  $^3J$  (C-3') e  $\delta_C$  118 a  $^2J$  (C-2'); hidrogênio em  $\delta_H$  7,11 e os carbonos  $\delta_C$  150 a  $^3J$  (C-1) e  $\delta_C$  124,27 a  $^3J$  (C-5); hidrogênio em  $\delta_H$  6,84 e o carbono em  $\delta_C$  150 (C-1); hidrogênio em  $\delta_H$  6,29 e o carbono em  $\delta_C$  170 a  $^3J$  (C-3'). Os valores atribuídos aos hidrogênios e carbonos para a amostra P-1 estão mostrados na **TABELA 4.2.2.1.1**. Os dados discutidos através dos espectros de RMN em comparação aos encontrados na literatura consultada (CHANG et al., 2009), juntamente com dados do HPLC-MS (pico do íon pseudo-molecular 179 Da, cuja fórmula molecular é  $C_9H_8O_4$ ) (**FIGURA 4.2.2.1.7**), permitiram a identificação estrutural do derivado de ácido cinâmico em análise como sendo o ácido *trans*-cafeico.

TABELA 4.2.2.1.1 – Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  para o fenilpropanóide P-1 em comparação com a literatura.

Nº C	$^1H$ ( $\delta$ )	$^{13}C$ ( $\delta$ )	$^1H$ (d)*	$^{13}C$ ( $\delta$ )*
1	–	150	–	148,3
2	–	148	–	145,8
3	7,11 (1H, d, 2 Hz)	117	7,05 (1H, d, 1,5 Hz)	114,3
4	–	–	–	126,7
5	7,02 (1H, dd, 2 e 8,2 Hz)	124,27	6,96 (1H, dd, 1,5 e 8 Hz)	121,7
6	6,84 (1H, d, 8,2 Hz)	117,58	6,79 (1H, d, 8 Hz)	115,3
1'	7,58 (1H, d, 16 Hz)	147,5	7,53 (1H, d, 16 Hz)	145,6
2'	6,29 (1H, d, 16 Hz)	118	6,22 (1H, d, 16 Hz)	114
3'	–	170	–	169

Nota: \*Dados obtidos da literatura (CHANG et al., 2009).

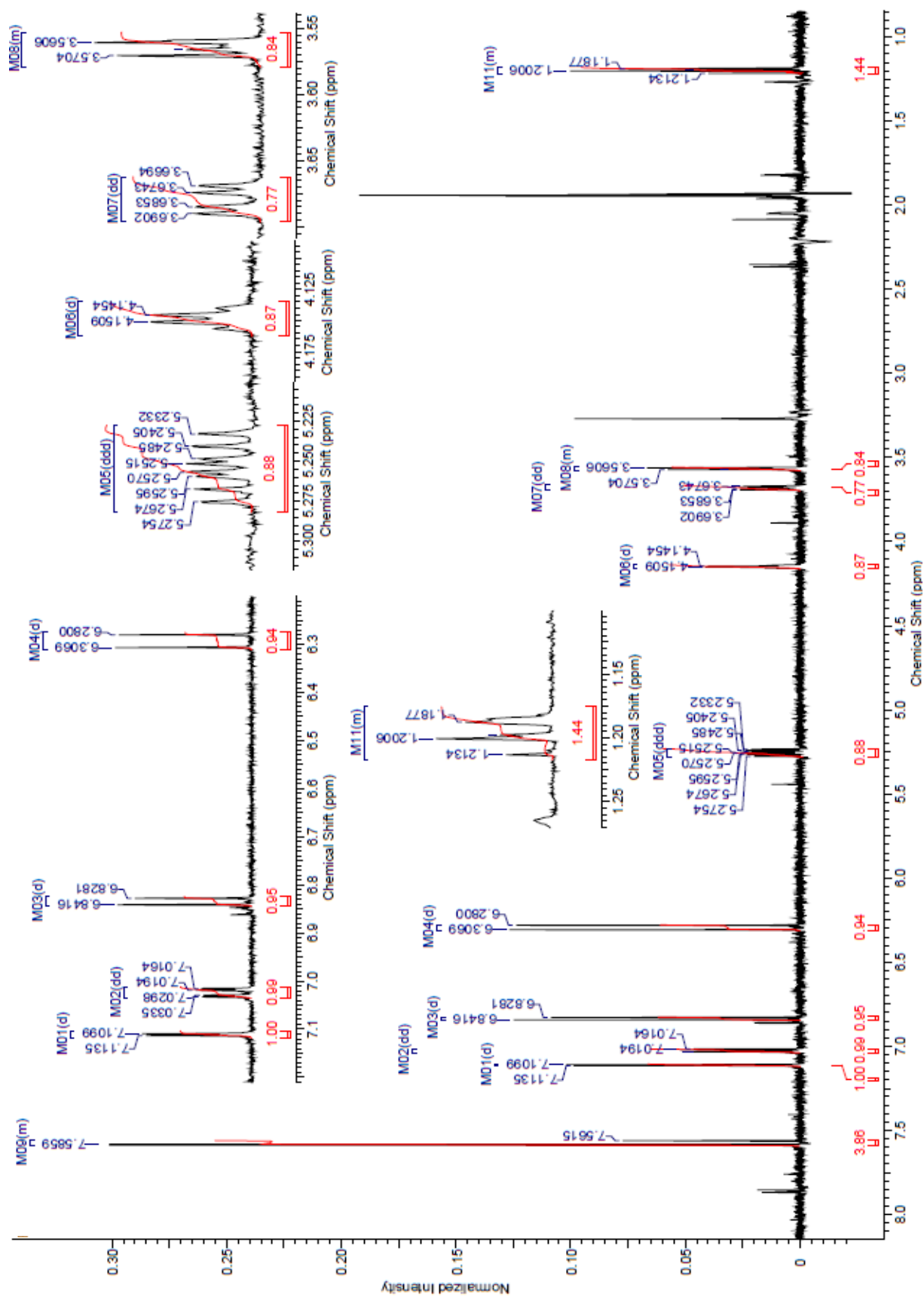


FIGURA 4.2.2.1.4 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do fenilpropanóide P-1 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz). Solvente:  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

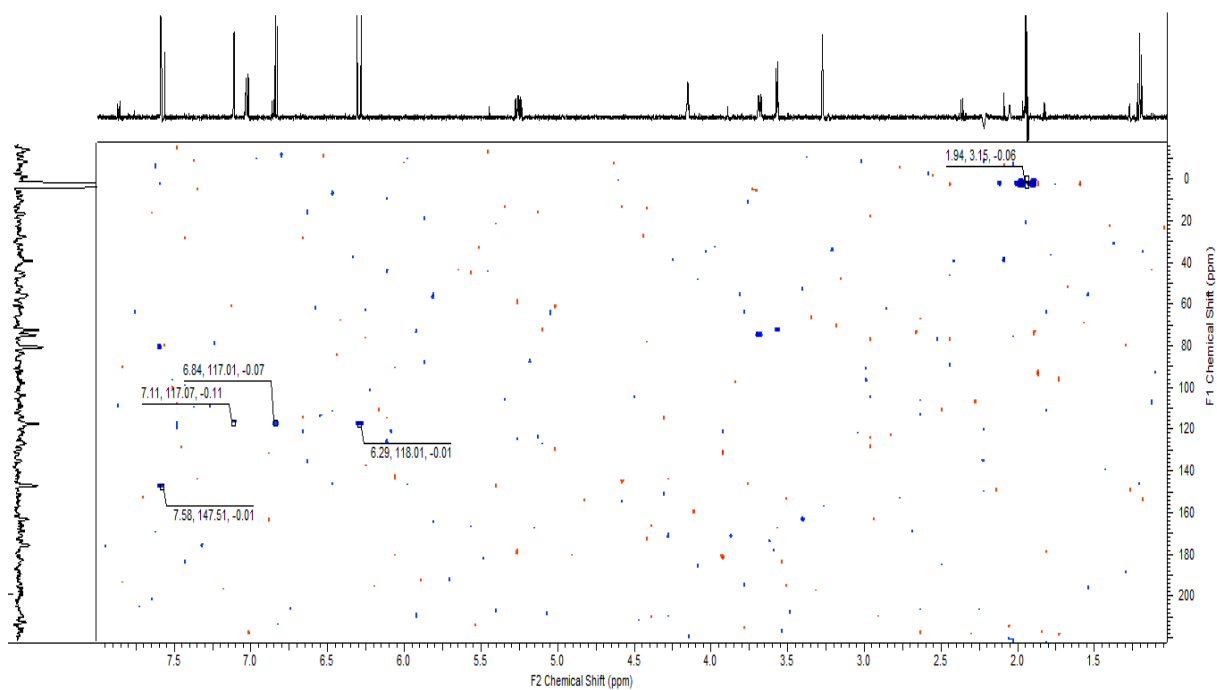


FIGURA 4.2.2.1.5 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-1 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz).

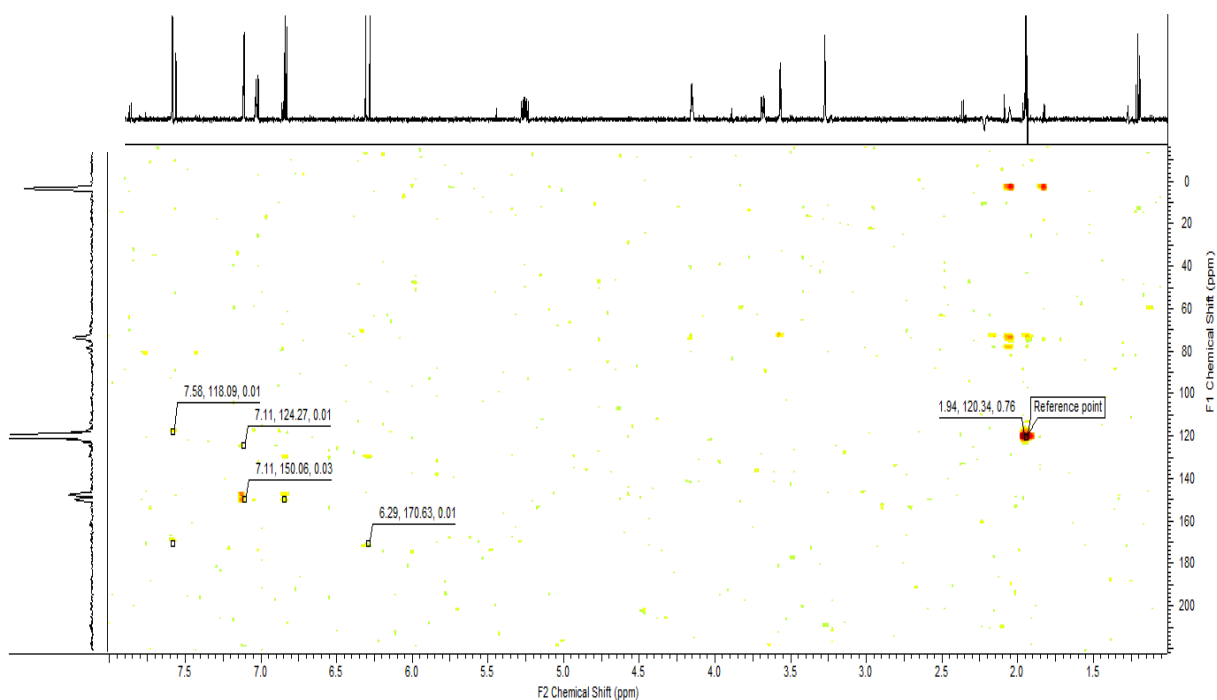


FIGURA 4.2.2.1.6 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-1 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz).

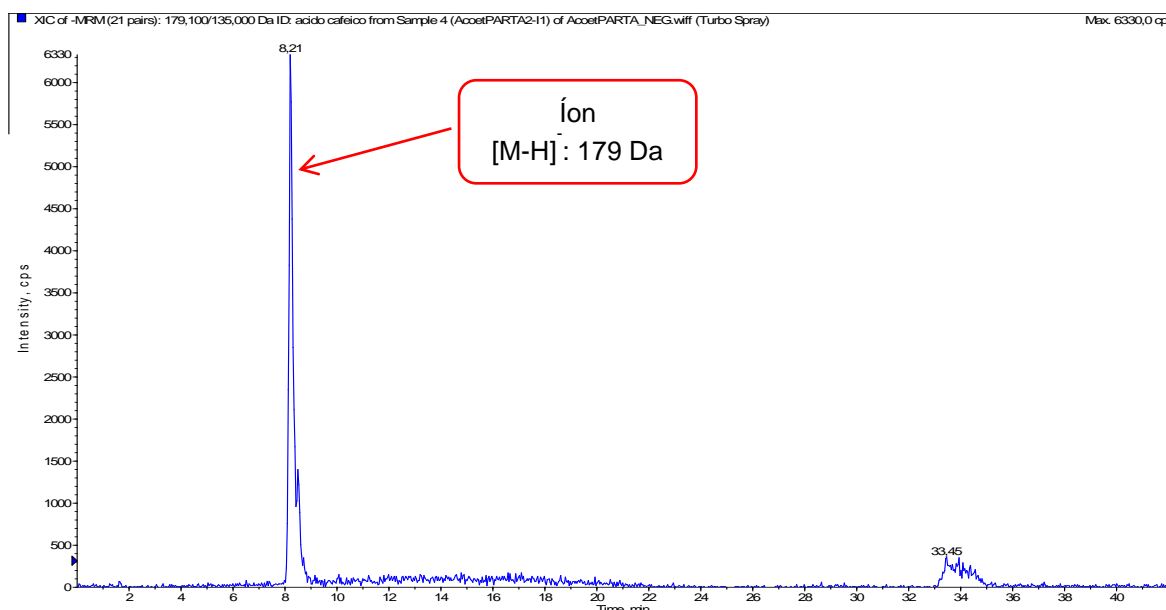


FIGURA 4.2.2.1.7 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-1.

Quanto a P-2 (**FIGURA 4.2.2.1.2**) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.2.2.1.8**) observou-se sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,1 (1H, *d*,  $J_{\text{meta}} = 1,8$  Hz, H-3),  $\delta_{\text{H}}$  7,01 (*dd*,  $J_{\text{orto, meta}} = 1,8$  e 8,4 Hz, H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (*d*,  $J_{\text{orto}} = 8,4$  Hz, H-6) os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-3, H-5 e H-6, respectivamente. Os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,53 ( $J_{\text{trans}} = 16$  Hz; 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,25 ( $J_{\text{trans}} = 16$  Hz; 1H) são devidos aos hidrogênios olefínicos, H-1' e H-2'. Estes dados sugerem a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. O que difere P-2 de P-1 é a presença de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  3,86, correspondente ao grupo metoxílico ( $\text{OCH}_3$ ). No espectro de HSQC (**FIGURA 4.2.2.1.9**), foram observadas correlações entre os sinais do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,53 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  147,4 (C-1'); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,01 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  124,41 (C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  116,95 (C-6); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,27 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  117,22 (C-2'). No espectro de HMBC (**FIGURA 4.2.2.1.10**) observaram-se correlações entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,53 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  170 a  $^3J$  (C-3') e  $\delta_{\text{C}}$  124,4 a  $^3J$  (C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,1 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  150 a  $^3J$  (C-1) e  $\delta_{\text{C}}$  124,4 a  $^3J$  (C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,83 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  150,22 a  $^3J$  (C-1) e  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^2J$  (C-4); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,27 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^3J$  (C-4). A ligação do grupo metoxílico ao anel aromático foi estabelecida pela correlação observada entre o sinal dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,86 ( $\text{OCH}_3$ ) e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  58,69 a  $^1J$  ( $\text{OCH}_3$ ) e foi possível observar também a correção entre os hidrogênios

do grupo metoxílico ao carbono em  $\delta_C$  150,22 a  $^3J$  (C-1). Os valores atribuídos aos hidrogênios e carbonos para a amostra P-2 estão mostrados na **TABELA 4.2.2.1.2**.

Os dados discutidos através dos espectros de RMN em comparação aos encontrados na literatura consultada (DAO et al., 2012), juntamente com dados do HPLC-MS (pico do íon pseudo-molecular 193 Da, cuja fórmula molecular é  $C_{10}H_{10}O_4$ ) (**FIGURA 4.2.2.1.11**), permitiram a identificação estrutural do derivado de ácido cinâmico em análise como sendo o ácido *trans*-ferúlico.

TABELA 4.2.2.1.2 – Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  para o fenilpropanóide P-2 em comparação com a literatura.

Nº C	$^1H$ ( $\delta$ )	$^{13}C$ ( $\delta$ )	$^1H$ (d)*	$^{13}C$ ( $\delta$ )*
1	–	150	–	150,5
2	–	–	–	149,4
3	7,1 (1H, d, 1,8 Hz)	117,11	7,18 (1H, d, 1,5 Hz)	117,11
4	–	130	–	127,8
5	7,01 (1H, dd, 1,8 e 8,4 Hz)	124,44	7,07 (1H, dd, 1,5 e 8,5 Hz)	124
6	6,83 (1H, d, 8,4 Hz)	116,95	6,83 (1H, d, 8,5 Hz)	116,5
1'	7,53 (1H, d, 16 Hz)	147,4	7,62 (1H, d, 16 Hz)	147
2'	6,25 (1H, d, 16 Hz)	117,22	6,33 (1H, d, 16 Hz)	115,9
3'	–	170	–	171,1
OCH <sub>3</sub>	3,86 (3H, s)	58,69	3,80	56,8

Nota: \* Dados obtidos da literatura (DAO et al., 2012).

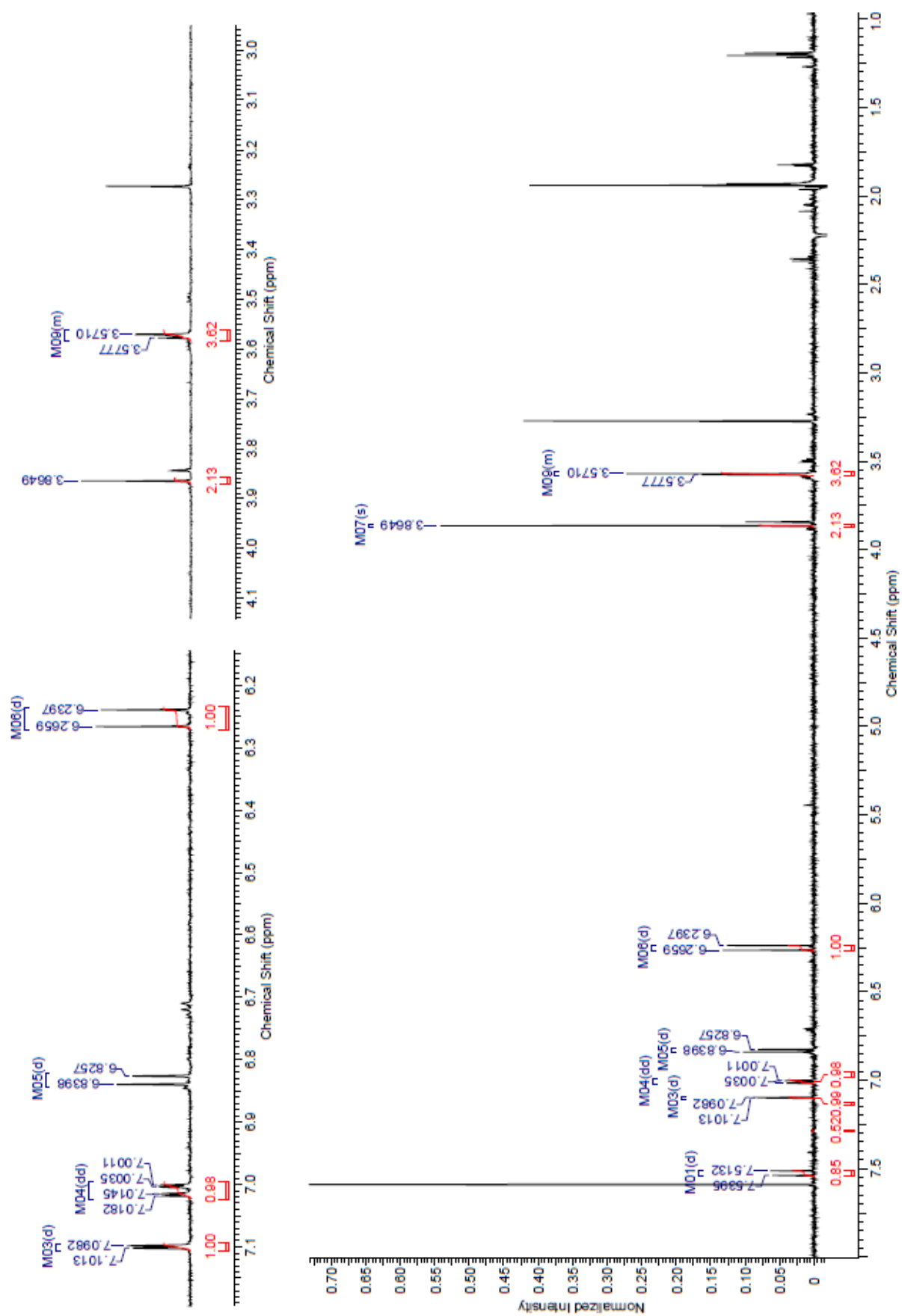


FIGURA 4.2.2.1.8 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do fenilpropanóide P-2 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz). Solvente:  $\text{CD}_3\text{CN}$ .



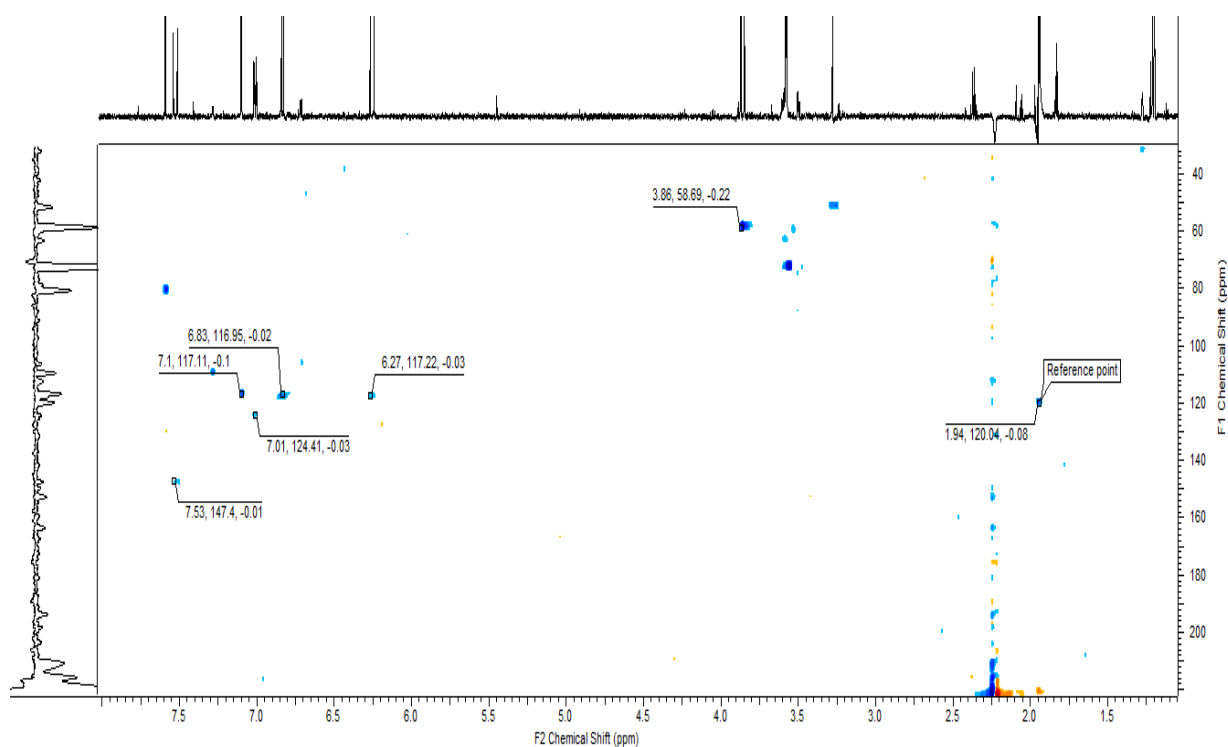


FIGURA 4.2.2.1.9 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-2 (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz).

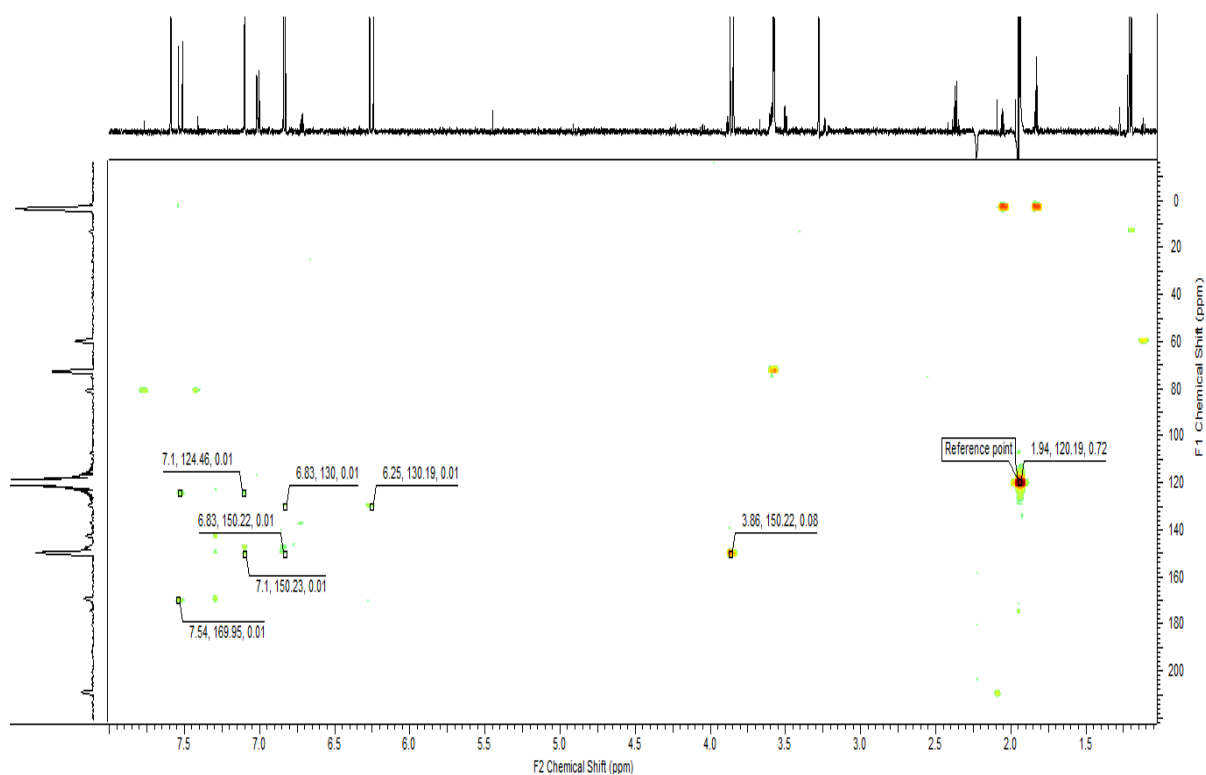


FIGURA 4.2.1.1.10 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-2 (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz).

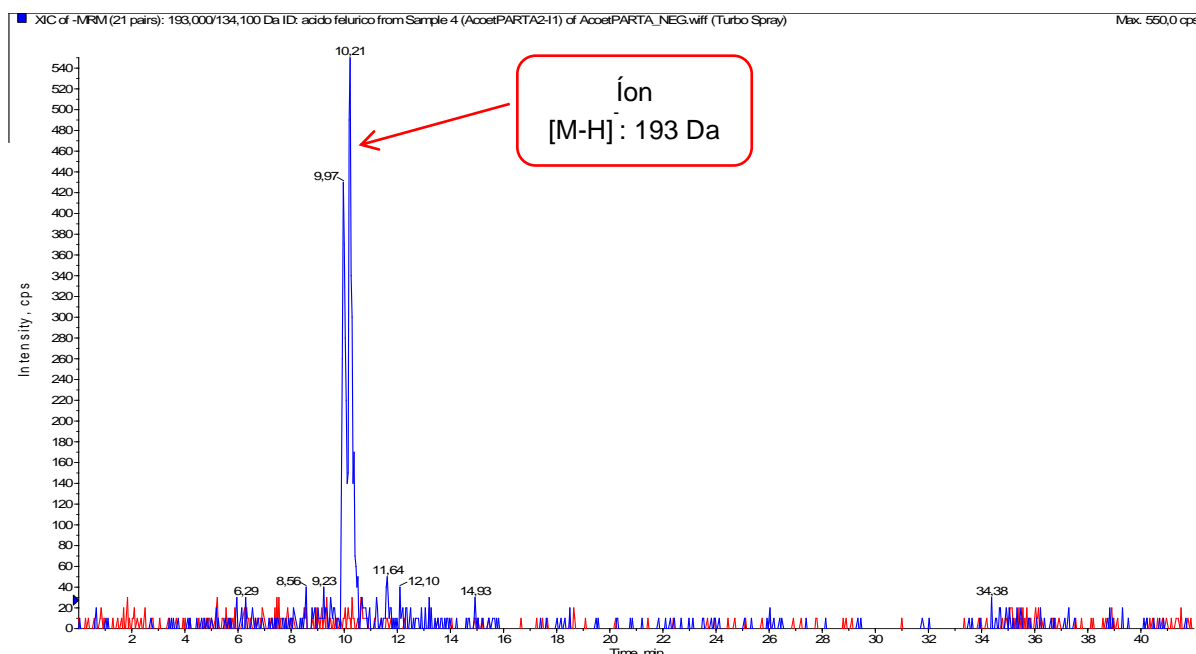


FIGURA 4.2.2.1.11 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-2.

Quanto a P-5 ( **FIGURA 4.2.2.1.3**), o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.2.2.1.12**) mostrou a presença de dois dubletos correspondente aos hidrogênios do grupo fenila, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,49 ( $J_{\text{orto}} = 8,46$  Hz; 2H) correspondente aos hidrogênios H-2 e H-6 e outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 ( $J_{\text{orto}} = 8,46$  Hz; 2H) correspondente aos hidrogênios H-3 e H-5. Os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,58 ( $J_{\text{trans}} = 16$  Hz; 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,29 ( $J_{\text{trans}} = 16$  Hz; 1H) correspondem aos hidrogênios olefínicos, H-1' e H-2'. Tais dados sugerem a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído. No espectro de HSQC (**FIGURA 4.2.2.1.13**), foram observadas correlações entre os sinais do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,59 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  147,45 (C-1'); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,49 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  130 (C-3 e C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  118,52 (C-2 e C-6); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  118,31 (C-2'). No espectro de HMBC (**FIGURA 4.2.2.1.14**) observaram-se correlações entre os sinais do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,59 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^3J$  (C-3 e C-5),  $\delta_{\text{C}}$  170 a  $^3J$  (C-3') e  $\delta_{\text{C}}$  118,31 a  $^2J$  (C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,49 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^3J$  (C-3 e C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  162,5 a  $^3J$  (C-1); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  162,5 a  $^2J$  (C-1),  $\delta_{\text{C}}$  118, 53 a  $^3J$  (C-2) e  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^2J$  (C-3 e C-5); hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,29 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  170 a  $^2J$  (C-3') e  $\delta_{\text{C}}$  130 a  $^4J$  (C-3 e C-5). Os valores atribuídos aos hidrogênios e carbonos para a amostra P-5 estão mostrados na **TABELA 4.2.2.1.3**.

Os dados discutidos através dos espectros de RMN em comparação aos encontrados nas literaturas consultadas (CHRISTOPHORIDOU et al., 2005; SWISŁOCKA, 2012), juntamente com dados do HPLC-MS (pico do íon pseudo-molecular 163 Da, cuja fórmula molecular é C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (**FIGURA 4.2.2.1.15**), permitiram a identificação estrutural do derivado de ácido cinâmico em análise como sendo o ácido *p*-cumárico.

TABELA 4.2.2.1.3 – Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o fenilpropanóide P-5 em comparação com a literatura.

Nº C	<sup>1</sup> H (δ)	<sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> H (d)*	<sup>13</sup> C (δ)*
1	–	162,5	–	159,67
2 e 6	6,84 (2H, <i>d</i> , 8,46 Hz)	118,52	6,83 (2H, <i>d</i> ; 8,6 Hz)	115,83
3 e 5	7,49 (1H, <i>d</i> , 8,46 Hz)	130	7,48 (2H, <i>d</i> , 8,6 Hz)	130,17
4	–	–		125,33
1'	7,59 (1H, <i>d</i> , 16 Hz)	147,45	7,58 (1H, <i>d</i> ; 16 Hz)	144,27
2'	6,29 (1H, <i>d</i> , 16 Hz)	118,31	6,28 (1H <i>d</i> ; 16 Hz)	115,41
3'	–	170	–	168,05

Nota: \* Dados obtidos da literatura (CHRISTOPHORIDOU et al., 2005; SWISŁOCKA, 2012).

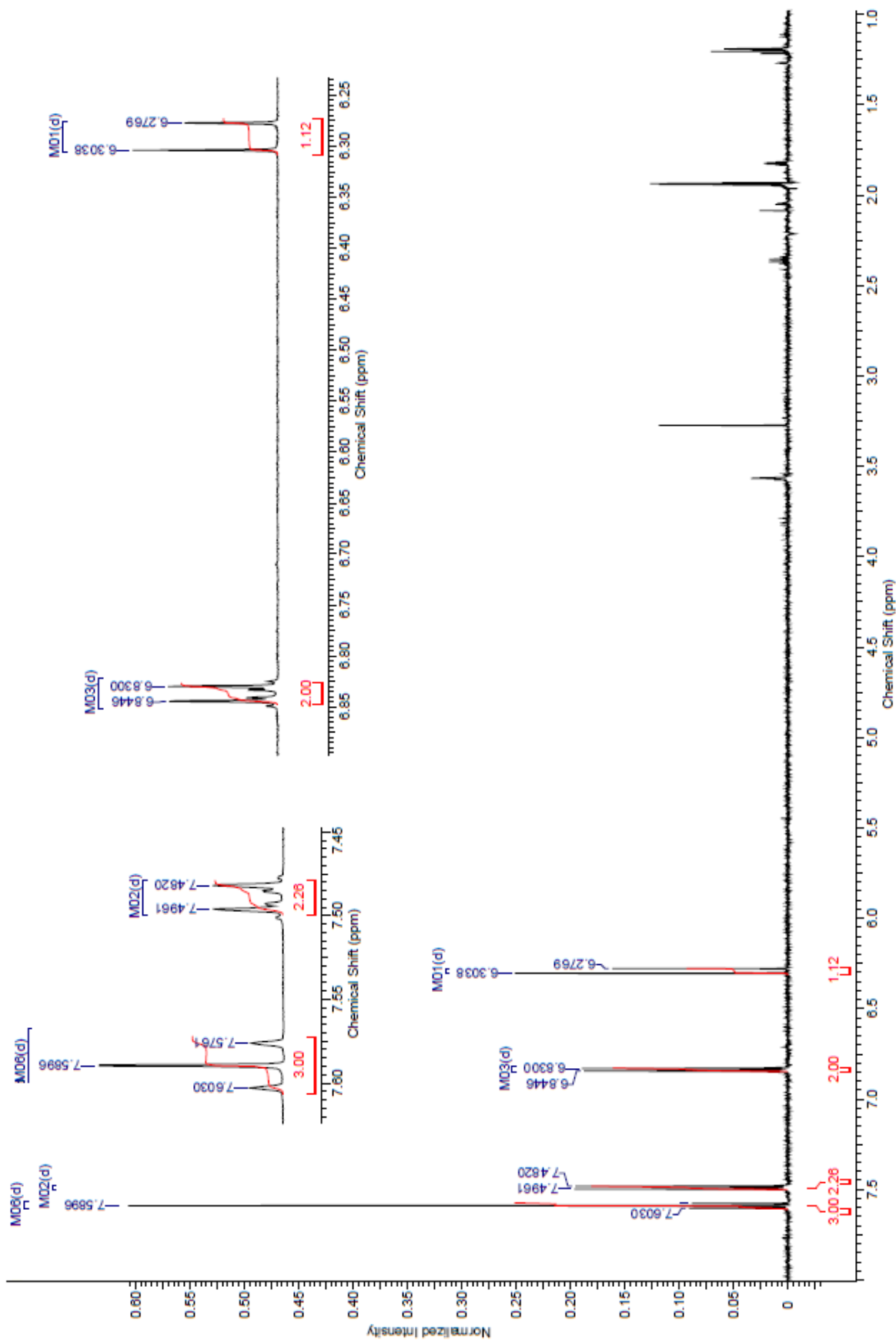


FIGURA 4.2.2.1.12 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do fenilpropanóide P-5 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz). Solvente:  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

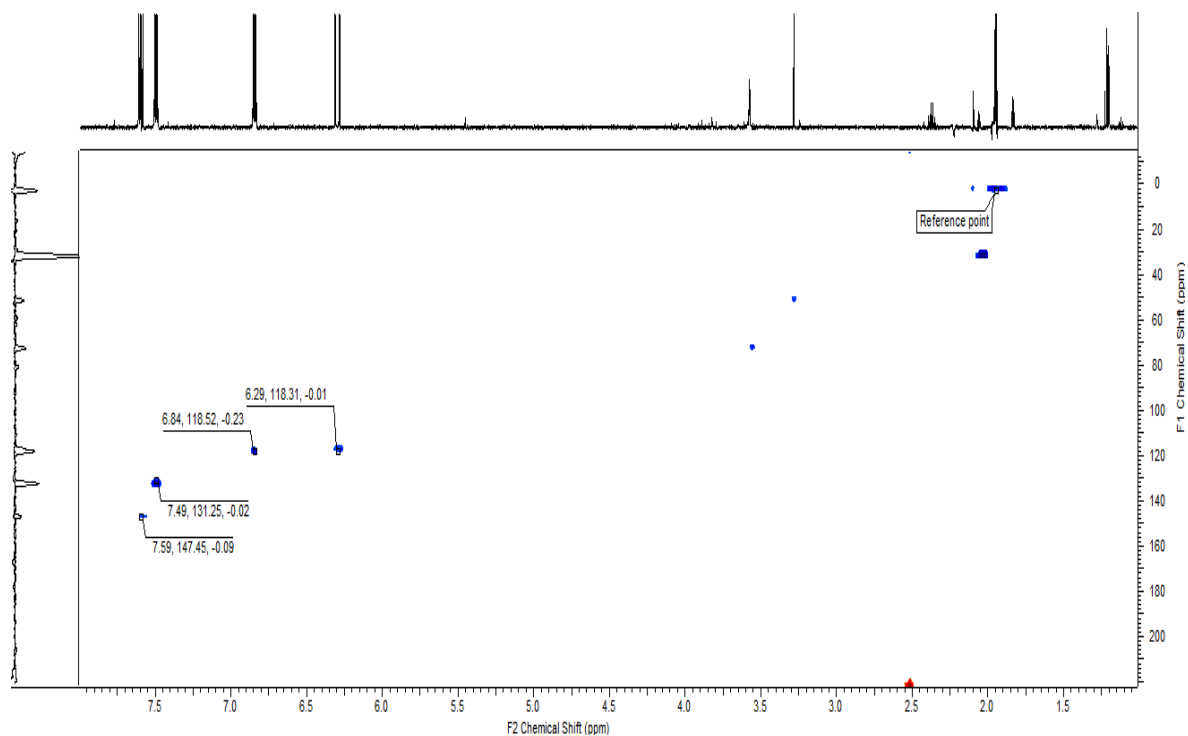


FIGURA 4.2.2.1.13 – Mapa de contorno HSQC do fenilpropanóide P-5 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz).

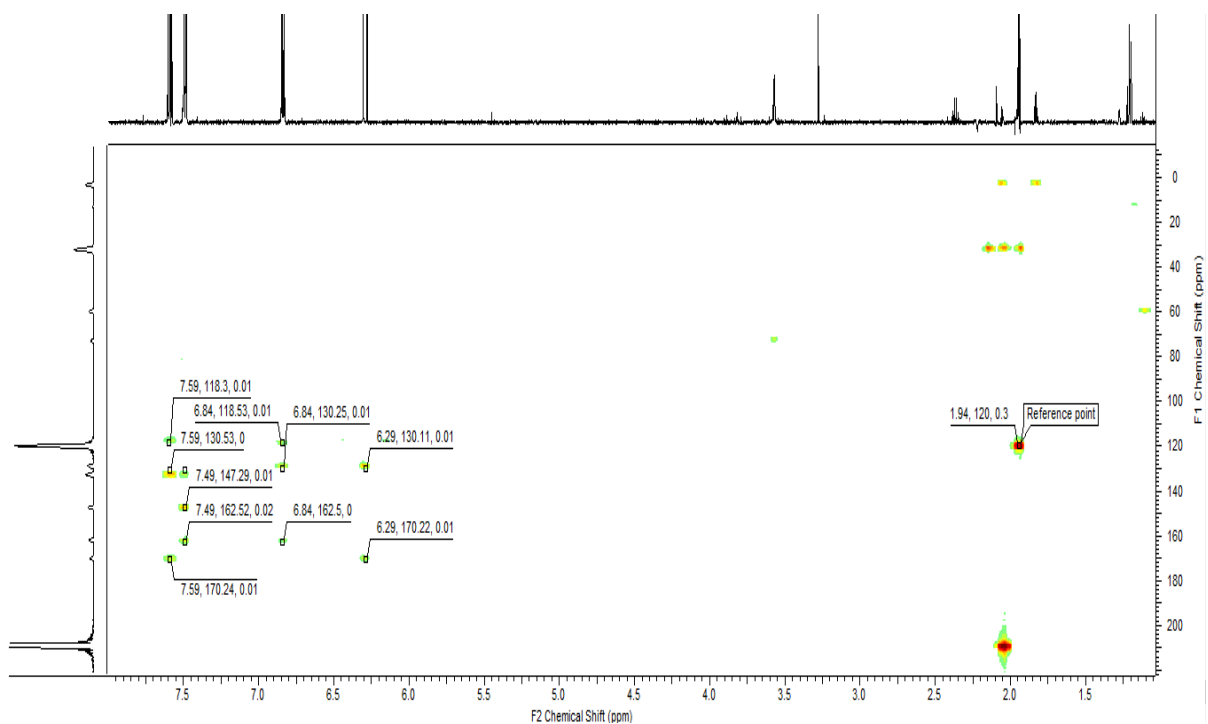


FIGURA 4.2.1.1.14 – Mapa de contorno HMBC do fenilpropanóide P-5 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz).

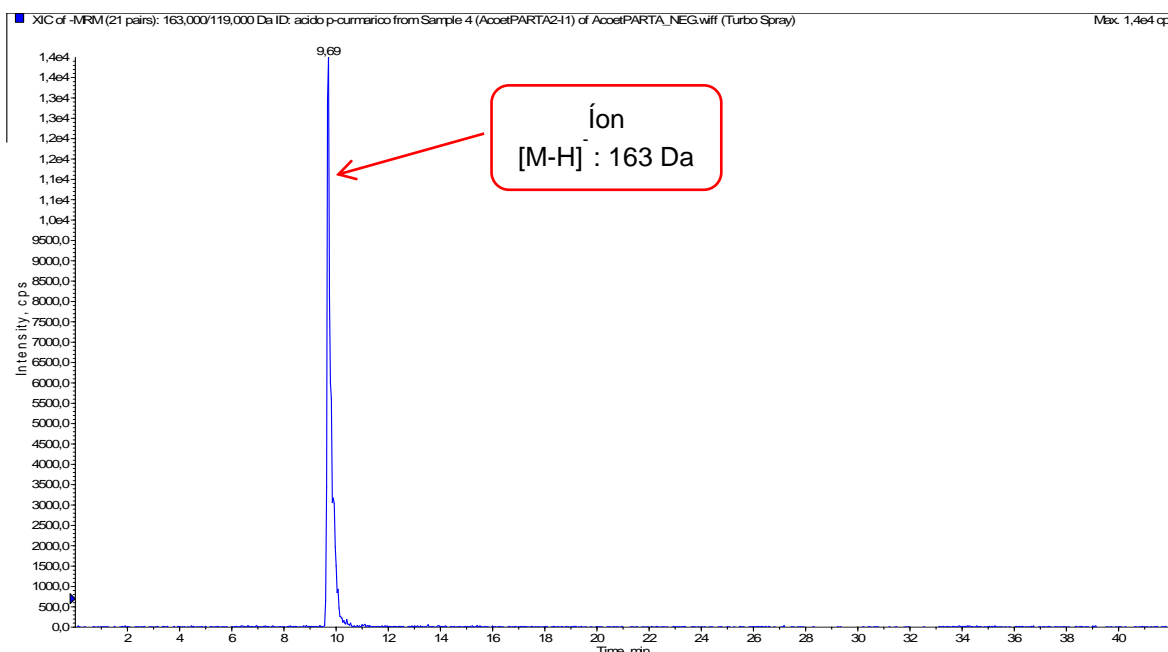


FIGURA 4.2.2.1.15 – Espectro de massas do fenilpropanóide P-5.

#### 4.2.2.2 – Determinação estrutural de P-6

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra P-6 (**FIGURA 4.2.2.2.1**) apresentou dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 (1H, *d*,  $J = 2,2$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6,44 (1H, *d*,  $J = 2,2$ ), correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, indicativos da presença de dois hidrogênios com orientação *meta* em um anel aromático tetrassubstituído. Apresentou também um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,46 (1H, *d*,  $J = 2,4$ ) correspondente ao hidrogênio H-2' sobreposto a um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 (1H, *dd*,  $J = 2,4$  e  $8,7$ ), correspondente ao hidrogênio H-6'. Pôde-se observar também, um dupleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,98 (1H, *d*,  $J = 8,7$ ), correspondente ao hidrogênio H-5', formando um sistema ABX, em outro anel aromático, sendo este 1,3,4-trissubstituído. Foi observada também a presença de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,62, correspondente ao hidrogênio H-3. Além dos sinais apresentados, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresentou também, sinais correspondentes a uma molécula osídica, caracterizada pelos multipletos entre  $\delta_{\text{H}}$  3,61 – 3,45 e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  5,14 (1H, *d*,  $J = 7,5$ ) atribuído ao hidrogênio anomérico, H-1"; sugerindo a presença do grupo glicuronídeo com configuração  $\beta$ .

O espectro de HSQC (**FIGURA 4.2.2.2**) apresentou correlações entre o hidrogênio H-6 ( $\delta_H$  6,76) e o carbono C-6 ( $\delta_C$  97,3), bem como entre os hidrogênio H-8 ( $\delta_H$  6,44) e o carbono C-8 ( $\delta_C$  102,4), permitindo, conseqüentemente, localizar a O-glicosilação na posição 7 do esqueleto da luteolina. Ainda no espectro de HSQC foram observadas correlações entre o hidrogênio em  $\delta_H$  7,46 e o carbono em  $\delta_C$  116,2 (C-2'); hidrogênio em  $\delta_H$  7,44 e o carbono em  $\delta_C$  122,2 (C-6'); hidrogênio em  $\delta_H$  5,14 e o carbono em  $\delta_C$  102 (C-1''); hidrogênio em  $\delta_H$  4,1 e carbono em  $\delta_C$  76 (C-5''); hidrogênios no intervalo de deslocamento entre  $\delta_H$  3,61 – 3,45 (*m*) e os carbonos em  $\delta_C$  78,4, 75 e 74 (C-2'', C-3'' e C-4'').

No espectro de HMBC (**FIGURA 4.2.2.3**) pode-se observar a correlação entre o hidrogênio H-3 em  $\delta_H$  6,62 e os carbonos em  $\delta_C$  185 a  $^2J$  (C-4),  $\delta_C$  167,5 a  $^2J$  (C-2),  $\delta_C$  125,5 a  $^3J$  (C-1') e  $\delta_C$  109,2 a  $^3J$  (C-10), contribuindo, portanto, para a localização dos demais substituintes na molécula. Ainda no espectro de HMBC puderam-se observar as correlações entre o hidrogênio H-2' em  $\delta_H$  7,46 e os carbonos em  $\delta_C$  167,5 a  $^3J$  (C-2),  $\delta_C$  151,5 a  $^3J$  (C-4'),  $\delta_C$  147,3 a  $^2J$  (C-3') e  $\delta_C$  122,2 a  $^3J$  (C-6'); hidrogênio H-6' em  $\delta_H$  7,44 e os carbonos em  $\delta_C$  167,5 a  $^3J$  (C-2),  $\delta_C$  151,5 a  $^3J$  (C-4'); hidrogênio H-5' em  $\delta_H$  6,98 e os carbonos em  $\delta_C$  151,5 a  $^2J$  (C-4'),  $\delta_C$  147,3 a  $^3J$  (C-3'),  $\delta_C$  125,5 a  $^3J$  (C-1') e  $\delta_C$  116,2 a  $^1J$  (C-5'); hidrogênio H-6 em  $\delta_H$  6,76 e os carbonos em  $\delta_C$  185 a  $^4J$  (C-4),  $\delta_C$  165 a  $^2J$  (C-7),  $\delta_C$  109,3 a  $^3J$  (C-10) e  $\delta_C$  102,4 a  $^3J$  (C-8); hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  6,44 e os carbonos em  $\delta_C$  165 a  $^2J$  (C-7),  $\delta_C$  109,3 a  $^3J$  (C-10) e  $\delta_C$  97,3 a  $^3J$  (C-6); hidrogênio H-1'' em  $\delta_H$  5,14 e o carbono em  $\delta_C$  165 a  $^3J$  (C-7); hidrogênio H-5'' em  $\delta_H$  4,1 e os carbonos em  $\delta_C$  171,3 a  $^2J$  (C-6'') e  $\delta_C$  102 a  $^3J$  (C-1''). Assim como para as amostras, não foi possível a obtenção do espectro de RMN de  $^{13}C$ , portanto, foram atribuídos valores aos carbonos da amostra, com base nos experimentos de HSQC e HMBC, conforme mostrado na **TABELA 4.2.2.2**.

Portanto, as análises no RMN aliadas aos experimentos de massa (**FIGURA 4.2.2.4**), que apresentou um íon pseudo-molecular a  $m/z$  461  $[M-H]^-$ , em comparação com os dados encontrados na literatura consultada (ÖZGEN et al., 2011), levou ao composto de fórmula molecular  $C_{21}H_{18}O_{12}$ , caracterizado como Lutelina-7-O- $\beta$ - glicuronídeo (**FIGURA 4.2.2.5**), comumente encontrado em folhas de espécies do gênero *Cyperus* (EL-HABASHY, 1989).

TABELA 4.2.2.2 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da flavona P6.

Nº C	$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	$^1\text{H}$ (d)*	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )*
1	–	–	–	–
2	–	167,5	–	165,1
3	6,62 s	106,2	6, 69 s	103,6
4	–	185	–	182,5
5	–	–	–	161,7
6	6,44 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)	102,4	6,39 (1H, <i>d</i> , 1,9 Hz)	100,2
7	–	165	–	163,6
8	6,76 (2H, <i>d</i> , 2,2 Hz)	97,3	6,74 (2H, <i>d</i> , 1,9 Hz)	95,2
9	–	–	–	157,6
10	–	109,3	–	105,9
1'	–	125,5	–	121,7
2'	7,46 (1H, <i>d</i> , 2,4 Hz)	116,2	7,40 (1H, <i>d</i> , 2 Hz)	114,1
3'	–	147,3	–	146,6
4'	–	151,5	–	150,8
5'	6,98 (1H, <i>d</i> , 8,7 Hz)	116,2	6,84 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	116,7
6'	7,44 (2H, <i>dd</i> , 2,4 e 8,7 Hz)	122,2	7,36 (2H, <i>dd</i> , 2 e 8,4Hz)	119,7
1''	5,14 (2H, <i>d</i> , 7,5 Hz)	102	5,06 (2H, <i>d</i> , 7,3 Hz)	100,2
H-2'', H-3'' e H-4''	3,61 – 3,45 (3H, <i>m</i> )	75; 78,3 e 74	3,39 – 3,14 (3H, <i>m</i> )	73,6; 77,1 e 72,6
5''	4,1 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	76	3,60 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	74,5
COOH	–	171,3	–	–

Nota: \* Dados obtidos da literatura, ÖZGEN et al., (2011).



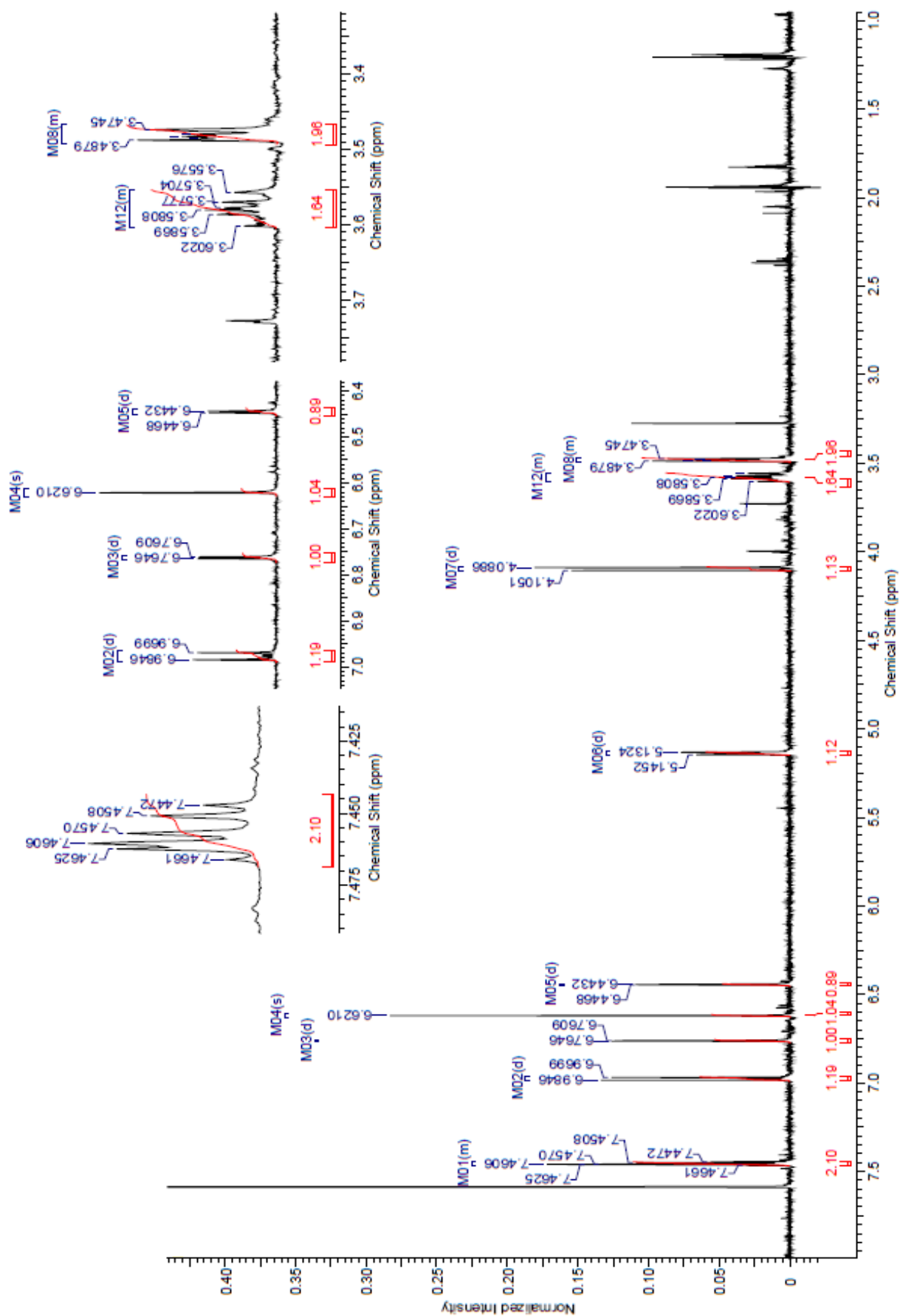


FIGURA 4.2.2.2.1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da flavona P-6 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 600 MHz). Solvente:  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

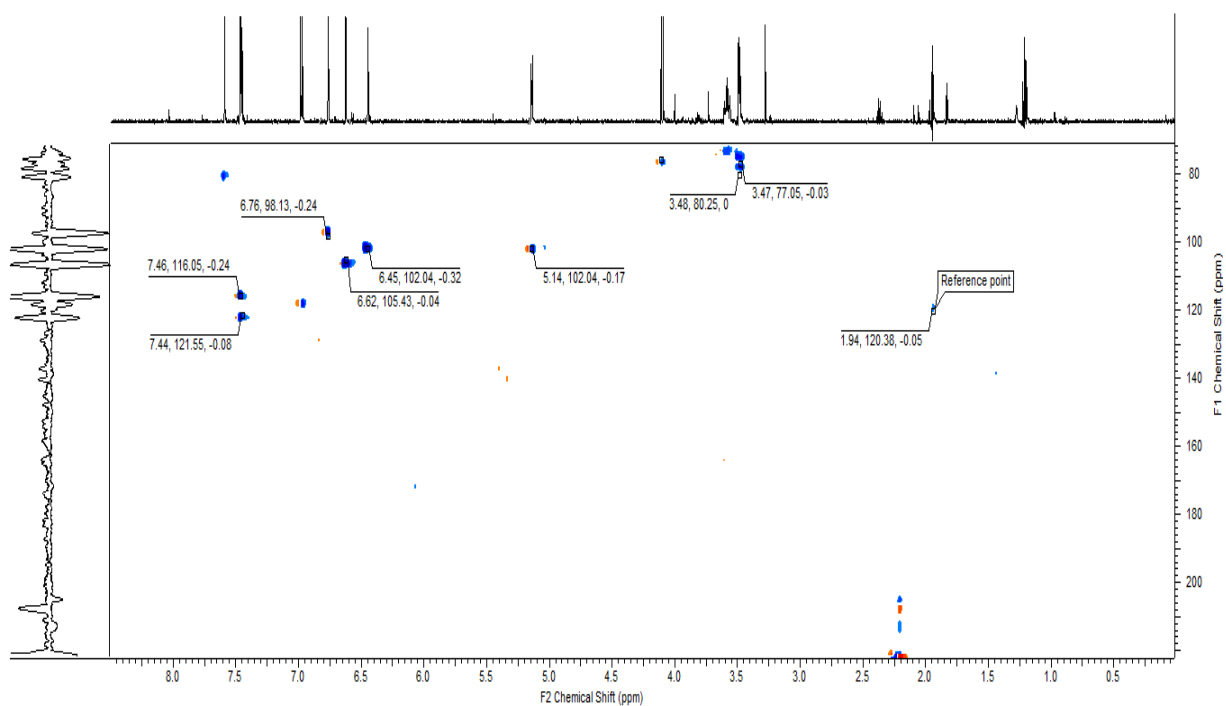


FIGURA 4.2.2.2.2 – Mapa de contorno HSQC da flavona P-6 (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz).

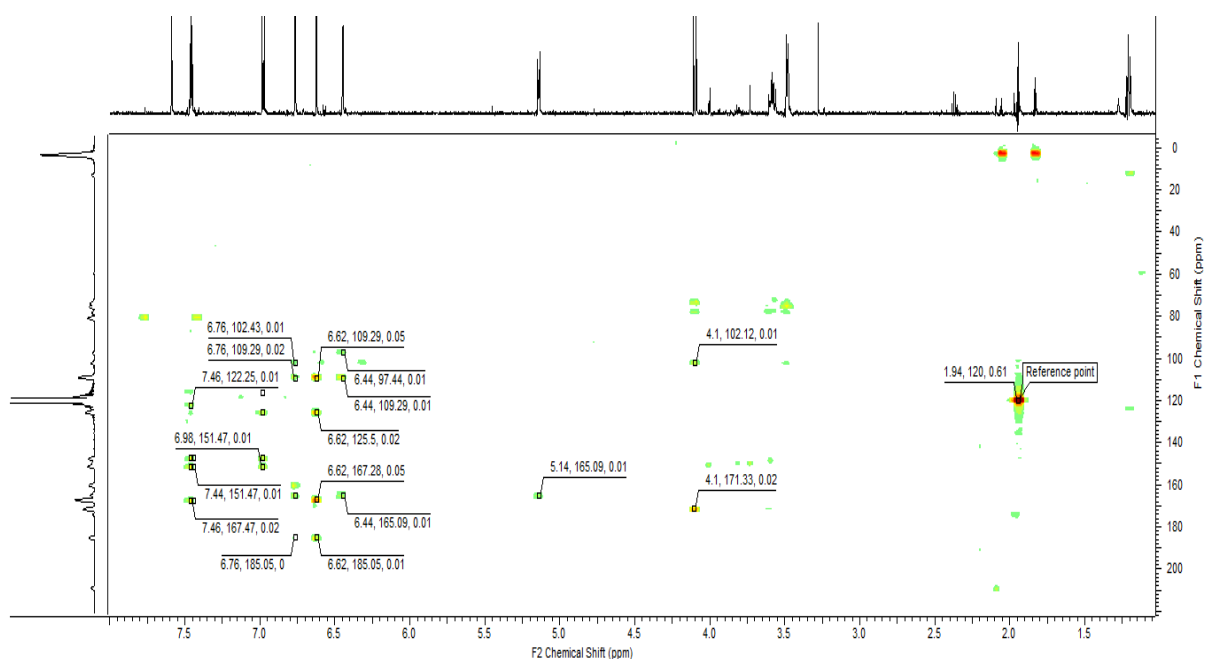


FIGURA 4.2.2.2.3 – Mapa de contorno HMBC da flavona P-6 (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz).

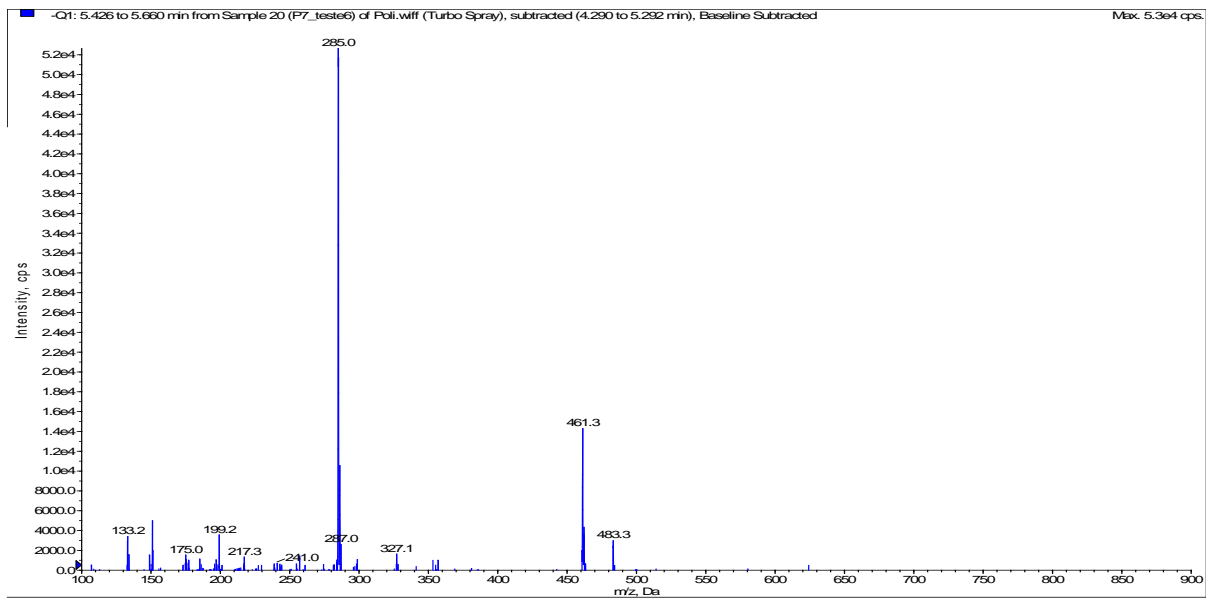


FIGURA 4.2.2.2.4 – Espectro de massas da flavona P-6.

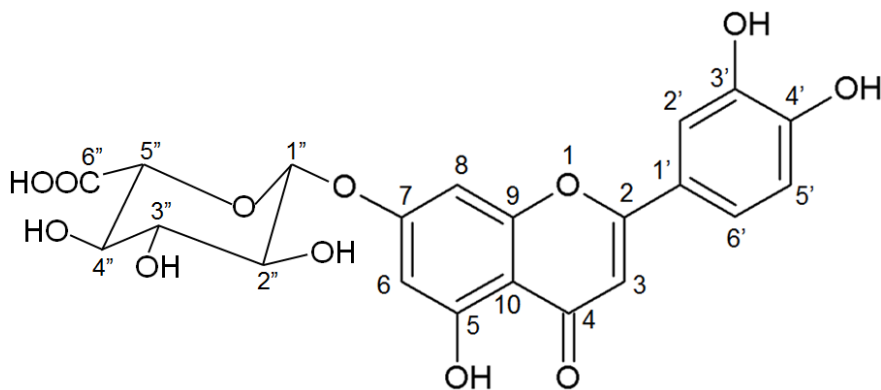


FIGURA 4.2.2.2.5 – Lutelina-7-*O*- $\beta$ - glicuronídeo (P-6).

***CONCLUSÕES***

***E***

***PERSPECTIVAS***

## 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo químico por RMN aliado à quimiometria das diferentes frações obtidas entre plantas da espécie *C. rotundus* coletadas na Mina do Sossego e em uma região adjacente permitiram confirmar, que aquelas que acumularam metais em seus diferentes tecidos sofreram variação no seu perfil químico referente ao metabolismo secundário.

Infelizmente o material vegetal obtido estava em pequena quantidade, dificultando as identificações dos metabólitos secundários que sofreram variação quanto à intensidade, ou mesmo aqueles que pareciam ser novos. As análises por HPLC-SPE-NMR e HPLC-MS de algumas frações em quantidades suficientes levaram a identificação dos ácidos *trans*-cafeico, *trans*-ferúlico, *p*-cumárico e do flavonóide luteolina-7-O- $\beta$ -glicuronídeo, os quais estavam presentes em maior intensidade nas amostras coletadas na Mina do Sossego, ou seja, contendo metais em seu interior.

As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações estudadas, no geral mostraram deslocamentos característicos de alguns açúcares e aminoácidos comuns em plantas, como  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, sacarose, rhaminose, ácido glutárico e treonina. Fazendo uma análise comparativa entre os estudos dos perfis químicos e os testes de determinação de metais obtidos por ICP-AES, pudemos observar que a planta contaminada apresentou diferentes repostas para diferentes frações frente (apenas para frações dos rizomas e partes aéreas vegetativas) à contaminação por metais, produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade, além de induzir a produção de metabólitos diferentes daqueles encontrados na planta não contaminada. Para as diferentes frações das partes aéreas reprodutivas, foi visto que estas provavelmente não sofrem alterações em função da contaminação por metais, haja vista que os mesmos, não foram translocados das partes aéreas vegetativas para estes tecidos, assim, as alterações sofridas por estas amostras podem estar ligadas a fatores desconhecidos e/ou efeitos sazonais.

Finalmente, concluiu-se que os objetivos do trabalho foram alcançados. Os estudos dos perfis químicos associado aos testes de determinação de metais permitiram diferenciar as plantas contaminadas das não contaminadas e os dados

obtidos sugerem o comportamento hiperacumulador de *C. rotundus*. Os dados obtidos também abriram portas para novos estudos, entre eles entender melhor a interação entre planta e metais e como estes últimos foram acumulados pela espécie em questão. Assim, pode-se pensar em alternativas biológicas que possam ser utilizadas como meios de recuperação de solos contaminados por metais.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***





## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. 2. ed., San Diego: Academic Press, 1999. 453 p.
- ALLAN, R.D.; CORRELL, R. L.; WELLS, R.J. “A new class of quinones from certain members of the family Cyperaceae”. *Tetrahedron Lett*, **53**: 4669-4672, 1969.
- ALLAN, R.D.; WELLS, R.J.; CORRELL, R.L.; MACLEOD, J.K. “The presence of quinones in the genus *Cyperus* as an aid to classification”. *Phytochemistry*, **17** (2): 263-266, 1978.
- AL-DAODY, A. C.; AL-HYALY, A. M. & AL-SOULTANY, A. A. “Chromatographic identification of some flavonoidS compounds from *Cyperus rotundus* growing In Iraq”. *Tikrit Journal of Pure Science*, **15** (1): 1813, 2010.
- ANDRADE, A. F. M. Avaliação de Estratégias Para Remediação de Solo Contaminado Por Chumbo e Bário Provenientes de Resíduos de Perfuração de Poço de Prospecção de Petróleo. Seropédica, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UFRRJ, 2010. Tese de Doutorado, 104 p.
- ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L. & MAHLER, C. F. “Fitorremediação, o uso de plantas na melhoria ambiental. São Paulo: Oficina de Textos, 2007, 176 p.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F. & JARDIM I. C. S. F. “Biorremediação de Solos Contaminados Por Petróleo e Seus Derivados”. *Ecl. Quím.*, **35** (3): 23, 2010.
- ANDREAZZA, R. Potencial Uso de Bactérias e Plantas Para Remediação de Cobre de Vitivinicultura e de Rejeito de Mineração de Cobre no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – UFRGS, 2009. Tese de Doutorado, 133 p.
- ANTONIO, D.; ELISEO, R.; PAOLA, S.; ANTONIA, S., ILDEFONSA, S. A. “Coumarins in *Cyperus incompletus*”. *Biochem. Syst. Ecol*, **21**(2): 305-312, 1993.
- ARAÚJO, B. S. Fitorremediação: tolerância e metabolismo de compostos xenobióticos por raízes de *Daucus carota* transformadas pela *Agrobacterium rhizogenes*. Alagoas, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas, 2000. Dissertação de Mestrado, 75 p.
- ASSUNÇÃO, S. J. R. Seleção de Plantas Para Fitorremediação de Chumbo, Cádmiio e Zinco, de Uma Área Contaminada na Bacia do Rio Subaé. Cruz das Almas, Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas – UFBA, 2012. Dissertação de Mestrado, 90 p.
- ASSIS, P. R. Estudo da Viabilidade do Uso de Métodos de Segunda Ordem e RMN na Elaboração de Fingerprint de *Bauhinia fortificata* baseado em Seu Extrato Bruto. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2014. Dissertação de Mestrado, 51 p.

- AWAAD, A.; SOLIMAN, G. A.; EL-SAYED, D. F.; EL-GINDI, O. D. & ALQASOUMI, S. I. "Hepatoprotective activity of *Cyperus alternifolius* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats". *Pharmaceutical Biology*, 50 (2): 155, 2012.
- BALCOM, I.; NEWMAN, LEE & ROCK, S. A. *Greenfields – A Field Guide to Phytoremediation*. 1. ed. Copyright: Youarethecity, 2011. 14 p.
- BENENDITO, V. A. & FIGUEIRA, A. V. de O. "Riscos e segurança ambiental – Efeitos potenciais da introdução de plantas transgênicas". *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 8 (34): 59, 2005.
- BELLETE, B. S. *Estudo da Variação do Perfil Químico de Citrus Com Greening e Sadios, Visando Obter Informações Sobre Mecanismo de Defesa*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 221 p.
- BHAGWAT, D., KHARYA, M. D.; BANI, S.; PANDEY, A.; CHAUHAN, P. S.; KOUR, K.; SURI, K.; SATTI, N. K. & DUTT, P. "*Cyperus scariosus* chloroform fraction inhibits T cell responses in Balb/C mice". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (5): 392, 2009.
- BITAR, O. Y. *Avaliação da Recuperação de Áreas Degradadas Por Mineração na Região Metropolitana de São Paulo*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mineral – Escola politécnica da USP, 1997. Tese de Doutorado, 184 p.
- BOFFO, E. F. *Utilização de Métodos Quimiométricos aliados a RMN na Análise de Méis e Aguardentes*. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2009. Tese de Doutorado, 245 p.
- BOFFO, F. E.; TAVARES, L. A.; TOBIAS, A. C. T.; FERREIRA, M. M. C. & FERREIRA, A. G. "Identification of components of Brazilian honey by <sup>1</sup>H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods". *Food Science and Technology*, **49**: 55, 2012.
- BOECHAT C. L. *Biorremediação de solos contaminados por metais pesados em áreas de beneficiamento de minério de ouro*. Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo – UFRGS, 2014. Tese de Doutorado, 105 p.
- BOOPATHY, R. "Factors limiting bioremediation technologies". *Bioresource Technology*, 74 (1): 64, 2000.
- BORGES, R. C. *Aplicação de Resíduo URA na Remediação Química de Solos Contaminados por Cd, Pb e Zn*. Seropédica, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UFRRJ, 2007. Tese de Doutorado, 99 p.
- BRADLEY, J. M.; DAVIES, K. M.; DEROLE, S.C.; BLORR, S. J.; LEWIS, D. H. "The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of Penunia". *The Plant Journal*, **13**: 381-392, 1998.

BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; NETO, A.L.O.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J.E.S.; PELEGRINI, R.T. "Biorremediação e controle ambiental". Anais do IV Fórum de Estudos Contábeis. Rio Claro – SP, 2004. vol. 1, p. 45-49, 2004.

CABRAL, E. C. Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais. São Paulo, Programa de Pós-Química – USP, 2010. Tese de Doutorado, 121 p.

CETESB. Procedimento para gerenciamento de áreas contaminadas. 2007. Decisão da Diretoria 103-2007-C-E, de 22 de junho de 2007. CETESB/SMA. Publicada no diário oficial do Estado de São Paulo em 27/06/2007, Poder Executivo –Seção I – p. 34-39.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. São Paulo. [S.I.]: 2013. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-areascontaminadas/7-manual-de-gerenciamento-das--acs>>. Acesso em: 12 de novembro de 2015.

CHANG, W. S.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; CHOI, S. U.; RYU, S. Y. & LEE, K. R. "Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*". *Natural Product Sciences*, 15 (5): 237, 2009.

CHO-RUK, K.; KURUKOTE, J.; SUPPRUNG, P. & VETAYASUPORN, S. "Perennial plants in the phytoremediation of leadcontaminated soils". *Biotechnology*, 5 (1): 1, 2006.

CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P.; TSENG, L-H & SPRAUL, M. "Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR)". *J. Agric. Food Chem.* 53 (12): 4669, 2005.

COULON, F., MCKEW, B. A., OSBORN, A. M., MCGENITY, T. J., TIMMIS, K. N. "Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters". *Environ Microbiol*, 9 (1): 176, 2007.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D. C. "Biorremediação: Tratamento para derrame de Petróleo". *Ciência Hoje* 179 (30): 32-37, 2002.

CRUVINEL, D. F. C. Avaliação da Fitorremediação Em Solos Submetidos à Contaminação Com Metais. Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – UNAERP, 2009. Tese de Doutorado, 79 p.

DAO, P. T. A.; HAI, N. X.; NHAN, N. T.; QUAN, T. L. & MAI, N. T. T. "Study on DPPH free radical scavenging and lipid peroxidation Inhibitory activities of vietnamese medicinal plants". *Natural Product Sciences*, 18 (1): 6, (2012).

DEWICK, P. M. "Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach". John Wiley & Sons, 2ª Ed., Inc., New York, 156-234 p., 2002.

DETTMER, K. D.; ARONOV, P. A. & HAMMOCK, B. Mass spectrometry-based metabolomics. Wiley Periodicals, **26**: 53, 2007.

DIAS, A.E.X. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISSINO, C.L.S. (Ed). RESÍDUOS SÓLIDOS, AMBIENTE E SAÚDE: UMA VISÃO MULTIDISCIPLINAR. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000.

DYMINSKI, A.S. Contaminação de solos e águas subterrâneas. [S.l.]: 2006, 7-13p. Disponível em:  
<[http://www.cesec.ufpr.br/docente/andrea/TC019\\_Contaminacao\\_de\\_solos.pdf](http://www.cesec.ufpr.br/docente/andrea/TC019_Contaminacao_de_solos.pdf)>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

EBBS, S. D.; BRADY, D. J.; CORNISH, J.; GORDON, R. & KOCHIAN, L.V. "Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil". Alliance of crop, soil, and Environmental Science Societies, 26 (5): 1426, 1996.

EL-HABASHY, I.; MANSOUR, R. M. A, ZAHRAN, M.A; EL-HADIDI, M.N; SALEH, A. M. Leaf flavonoids of *Cyperus* species in Egypt. Biochem. Syst. Ecol. 17 (3): 191, 1989.

EPA. Phytoremediation Resource Guide. [S.l.]: 1999, 2 p. Disponível em:  
<<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-4/documents/phytoresgude.pdf>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2015.

FANTI, F. P. Aplicação de Extratos de Folhas e de Tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) e de Auxinas Sintéticas na Estaquia Caulinar de *Duranta repens* L. (Verbenaceae). Curitiba, Programa de Pós-graduação em Botânica – UFPR, 2008. Dissertação de Mestrado, 58 p.

GERMAINE, K. J.; MCGUINNESS, M.; DOWLING, D. N. Improving phytoremediation through plant-associated bacteria. In: BRUIJN, F. J. DE (Ed.). Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere: Volume 1. 2a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p.963-974.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. de L. & MANFIO G. P. "Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da Biorremediação". Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 8 (34): 36, 2005.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons, New York: McGraw Hill, 1996. p. 697.

JAHAN, N.; RAHMAN, K-U.; ALI, S. & ASI, M.R. Phenolic acid and flavonol contents of gemmo-modified and native extracts of some indigenous medicinal plants. Pak. J. Bot., 45 (5): 1517, 2013.

JAKELAITIS, A. FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; AGNES, E. L.; MIRANDA, G. V.; MACHADO, A. F. L. Efeitos de sistemas de manejo sobre a população de tiririca. Planta Daninha, 21, (1): p. 90, 2003.

JEONG, S-J.; MYAMOTO, T.; INAGAKI, M.; KIM, Y-C. & HIGUCHI, R. "Rotundines A-C, Three Novel Sesquiterpene Alkaloids from *Cyperus rotundus*". J. Nat. Prod., 63 (5): 673, 2000.

HERDERICH, M.; RICHLING, E.; ROSCHER, R.; SCHNEIDER, C.; SCHAWB, W.; HUMPF, H.-U. & SCHREIER, P. "Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products" Chromatographia, 45: 127, 1997.

HINCHMAN, R R.; NEGRI, M. C. & GATLIFF, E. G. "Phytoremediation: using green plants to clean up contaminated soil, groundwater, and wastewater". Argonne National Laboratory Hinchman, Applied Natural Sciences, Inc, [S.I.]: 1995. Disponível em: <[http://www.treemediation.com/Technical/Phytoremediation 1998.pdf](http://www.treemediation.com/Technical/Phytoremediation%201998.pdf)>. Acesso em: 12 de janeiro de 2015.

HOAREAU, L. & DASILVA, E.J. "Medicinal plants: a re-emerging health aid". E.J.B. Electronic J. Biotechnol., 2 (2): 65, 1999.

HOSSAIN, M. A.; PIYATIDA, P.; SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. "Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation". Journal of Botany, **2012**: 3 p. 1-37, 2011.

IBRAM. Informações e análises da economia mineral brasileira, 7ª edição. [S.I.]: 2012, 24p. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>>. Acesso em: 12 de março de outubro de 2016.

JALALI-HERAVI, M., MASOUM, S., & SHAHBAZIKHAH, P. "Simulation of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of lignin compounds using principal component analysis and artificial neural networks". Journal of Magnetic Resonance **171**: 176, 2004.

JUWARKAR, A. A.; SINGH, S.K.; MUDHOO, A. "A Comprehensive overview of elements in bioremediation". Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 9 (3): 230, 2010.

KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, N.J. "Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation". Chemosphere, **41**: 198, 2000.

KESTING, J. R.; JOHANSEN, K. T. & JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR techniques", [S.I.]: 2011, 8-9 p. Disponível em: <[http://www.farma.ku.dk/uploads/media/Lecture11\\_background\\_reading.pdf](http://www.farma.ku.dk/uploads/media/Lecture11_background_reading.pdf)>. Acesso em: 19 de dezembro de 2015.

KILANI, S.; SGHAIER, M. B.; LIMEN, I.; BOUHLEL, I.; BOUBAKER, J.; BROURI, W.; SKANDRANI, I.; NEFFATTI, A.; AMMAR, R. B.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; HEDIRA, K. E CHEKIR-GHEDIRA, L. "In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*". Bioresource Technology, **99**: 9005, 2008.

KIM, S. J.; RYU, B.; KIM, H-Y.; YANG, Y.; HAM, J.; CHOI, J-Y. & JANG, D. S. "Sesquiterpenes from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* and Their Potential to

Inhibit LPS-induced Nitric Oxide Production”. Bull. Korean Chem. Soc., 34 (7): 2207, 2013.

KIRKBRIGHT, G. F.; WARD, A. F. & WEST, T.S. “The determination of sulphur and phosphorus by Atomic Emission Spectrometry with an Induction – Coupled High-Frequency Plasma Source”. Analytica Chimica Acta, **62**: 241, 1972.

KOICHIRO, K. & KUNIKAZU, U. “Secondary metabolic compounds in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and their plant growth inhibition”. Shokubutsu no Kagaku Chosetsu, 16 (1): 32–37, 1981.

KRISHNA, S. & RENU, S. “Isolation and identification of flavonoids from *Cyperus rotundus* Linn. in vivo and in vitro”. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 3 (2): 112, 2013.

KUMAR, K. H.; RAZACK, S.; NALLAMUTHU, I. & KHANUM, F. “Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus* L”. Industrial Crops and Products, 52: 819, 2014.

LAMBERT, L. F. de M.; SOUZA, R. P. da S. S. & SOUZA, S. C. “O uso da fitorremediação para recuperação de solos contaminados por petróleo”. Livro de resumos do III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Goiânia – Goiás. Resumo XI-065. [S.l.]: 2012. Disponível em:

Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2012/XI-065.pdf>>. Acesso em: 30 de outubro de 2015.

LASAT, M. M. “Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assesment of pertinent agronomic issues”. Journal of Hazardous Substance Research, **2**: 3, 2000.

LEE, S. S.; LAI Y. C.; CHEN C. K.; TSENG L. H. & WANG C. Y. “Characterization of Isoquinoline Alkaloids from *Neolitsea sericea* var. aurata by HPLC-SPE-NMR”. J. Nat. Prod., 70 (4): 637, 2007.

LEITE, A. B. de O.; MENDES M. F. & COELHO G. L. V. “Remediação de solo contaminado com btex e glifosato usando o CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico”. Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra, Seropédica, **24**: 44, 2005.

LIMA, A. M. Avaliação do Potencial Fitorremediador da Mamona (*Ricinus communis* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.) Quanto à Remoção de Chumbo e Tolueno em Efluentes Sintéticos. Natal, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química – UFRN, 2010. Tese de Doutorado, 110 p.

LIRA, T. O. Perfil Metabólico de Duas Variedades Transgênicas de Cana-de-Açúcar Modificadas Com os Genes Inibidores de Proteínase Bowman-Birk e Kunitz. São Carlos, Programa de Pós-Química – USP, 2010. Tese de Doutorado, 207 p.

LEO, P.; ALLI, R. de C. P.; LINHARES, D. do C.; SILVA, E. S. da; MATSUBARA, R. M. S & RODRIGUES, M. F. de A. Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas – Processos biológicos: biorremediação. 1. ed. São Paulo: IPT e BNDES, 2014. 231-266 p.

- MACHADO, C. Cyperaceae. [S.I.]: UC, 2007. Disponível em: <[http://www.uc.pt/herbario\\_digital/Flora\\_PT/Familias/cyperaceae](http://www.uc.pt/herbario_digital/Flora_PT/Familias/cyperaceae)>. Acesso em: 05 de, 2016.
- MAXIMIANO, A. M. de S. & MORAES, S. L. Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas – Investigação para remediação. 1. ed. São Paulo: IPT e BNDES, 2014. 136-150 p.
- MAZZUCO, K. T. M. Uso da *Canavalia ensiformis* Como Fitorremediador de Solos Contaminados Por Chumbo. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UFSC, 2008. Tese de Doutorado, 185 p.
- MEENA, A. K.; YADAV, A. K.; NIRANJAN, U. S.; SINGH, B.; NAGARIYA, A. K. & VERMA, M. “Review on *Cyperus rotundus* - A Potential Herb”. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2 (1): 20, 2010.
- MEJÍA, P. V. L.; ANDREOLI, F. de N.; ANDREOLI, C. V. & SERRAT, B. M. “Metodologia para Seleção de Técnica de Fitorremediação em Áreas Contaminadas”. Rev. Brasileira de Ciências Ambientais, 31: 98, 2014.
- MENDES, A. F. & VIEIRA, R. “Gestão ambiental na indústria de mineração no Brasil: técnicas para minimizar potenciais impactos ambientais na extração do cobre”. Livro de resumo do I Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Bauru – SP, 2010. vol. 1, p. 17-18.
- MICHALAK, A. “Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress”. Polish J. of Environ. Stud., 15 (4): 523, 2006.
- MME. Relatório Técnico 23: Perfil da Mineração de Cobre. [S.I.]: 2009, 3 p. Disponível em: <<http://www.simineral.org.br/arquivos/PerfildamineraodeCobrePlanoNacionaldeMinerao2030MME.pdf>>. Acesso em 25 de abril de 2016.
- MOHAMED. A. G.; KAMAL, M. K. H.; ELHADY, S. S. & IBRAHIM, R.M. S. “A Review: Compounds Isolated From *Cyperus* Species (Part I): Phenolics and Nitrogenous”. Inter. J. of Pharmacognosy and Phytochemical, 7 (1): 83, 2015.
- MOHAMED, A. G. “Iridoids and other constituents from *Cyperus rotundus* L. rhizomes”. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 53: 6, 2015.
- MONTASER A. & GOLIGHTLY D. W. Eds. “Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry”. Jam Soc Mass Spectrom, 4: 755, 1993.
- MORIMOTO, M.; FUJI, Y.; KOMAI, K. “Antifeedants in Cyperaceae: coumaran and quinones from *Cyperus spp*”. Phytochemistry; 51 (4): 605-608, 1999.
- MUASYA, A. M.; SIMPSON, D. A.; VERBOOM, G. A.; GOETGHEBEUR, P.; NACZI, R. F. C.; CHASE, M. W. & SMETS, E. “Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data: current progress and future prospects”. Bot. Rev., 75: 3, 2009.
- NASCIMENTO, C. W. A. & XING, B. “Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation”. Sci. Agric., 63 (3): 302, 2006.

NASSAR, M. I.; ABU-MUSTAFA E. A.; ABDEL-RAZIK, A.F.; DAWIDAR A.M. "A new flavanan isolated from *Cyperus conglomeratus*". *Pharmazie*, 53 (11): 806-807, 1998.

OHIRA, S.; HASEGAWA, T.; HAYASHI, K-I.; HOSHINO, T.; TAKAOKA, D & NOZAKI, H. "Sesquiterpenoids from *Cyperus rotundus*". *Phytochemistry*, 47 (8): 1577, 1998.

OLIVEIRA J.A.L.; FANTON, J., ALMEIDA A.J., LEVEILLE R.A., VIEIRA S. "Discovery and geology of the Sossego copper–gold deposit, Carajás District, Pará State". IUGS, International Geological Congress, [S.I.]: 2000. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/media/modelo\\_dep\\_co\\_liv.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/modelo_dep_co_liv.pdf)>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

ÖZGEN, U.; MAVI, A.; TERZI, Z.; KAZAZ, C.; KAYA Y. & SECEN, H. "Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*". *Rec. Nat. Prod.*, 5 (1): 15, 2011.

PARREIRA, T. F. Utilização de Métodos Quimiométricos em Dados de Natureza Multivariada. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química – UNICAMP, 2003, 91 p.

PASTRE, W. Controle de Tiririca (*Cyperus rotundus* L.) Com Aplicação de Sulfentrazone e Flazasulfuron Aplicados Isoladamente e em Mistura na Cultura da Cana-de-açúcar. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical – IAC, 2006. Dissertação de Mestrado, 53 p.

PAWLIK-SKOWRÓNSKA, B. & BACKOR, M. "Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats". *Environmental and Experimental Botany*, 72: 65, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. & VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 102 p.

PÉREZ, D. V. Química na agricultura – Sala de leitura, [S.I.]: 2011, 54 p. Disponível em: <[http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL\\_quimica\\_na\\_agricultura.pdf](http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_quimica_na_agricultura.pdf)>. Acesso em: 12 de maio de 2015.

PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES. Atomic spectroscopy: a guide to selecting the appropriate technique and system guide to inorganic analysis. [S.I.]: Perkinelmer Life and Analytical Sciences, 2004. Disponível em: <<http://library.certh.gr/libfiles/pdf/gen-papyr-apr8-the-guide-by-pe-in-manuals-pp-40-y-2000.pdf>>. Acesso em: 05 de junho de 2015.

PICCHI, A. R. Caracterização e Remediação de Passivos Ambientais em Empreendimentos Energéticos. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Energia – USP, 2011. Dissertação de Mestrado, 180 p.



PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; PROCÓPIO, S.O. & FERREIRA, L.R. "Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas". *Planta Daninha*, 21 (2): 336, 2003.

PEERZADA, A. M.; ALI, H. H.; NAEEM, M.; LATIF, M.; BUKHARJ, H. & TANVEER, A. "Cyperus rotundus L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities". *J. of Ethnopharmacology*, **174**: 543, 2015.

PROVIDENTI, M. A.; LEE, H. E.; TREVORS, J. T.; "Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds". *Journal of Industrial Microbiology*, **12**: 379-395, 1993.

REIS, E. A. Produção de Cápsulas de Liberação Controlada Para Fins de Biorremediação de Ambientes Contaminados Por Hidrocarbonetos do Petróleo. Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – UFRJ, 2009. Dissertação de Mestrado, 59 p.

RIEGER, P. H.; MEIER, H. M.; GERLE, M.; VOGT, U.; GROTH, T.; NACKMUSS, H. J. "Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence". *Journal of Biotechnology*, 94 (1): 101-123, 2002.

ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSONVIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTELA, K. "Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches". *Environmental Pollution*, **107**: 179-185, 2000.

SALT, D. E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N. P.B.A., DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B. D., CHET, I & RASKIN, I. "Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants". *Biol. Technol*, 13: 470-471, 1995.

SANTANA, A. L. B. D. Estudo Químico, Antitermítico e Antifúngico da Madeira de *Lei Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan Var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis Alt. (*Angico-de-caroço*). Recife, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPE, 2011. Tese de Doutorado, 132 p.

SÃO PAULO (Estado) Decreto nº 59.263, de 5 junho de 2013. Regulamenta a Lei nº 13.577, de 2009, que dispõe sobre diretrizes e procedimentos para a proteção da qualidade do solo e gerenciamento de áreas contaminadas, e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Estado*, São Paulo, 6 jun. 2013.

SAYED, H. M.; MOHAMED, M. H.; FARAG, S. F.; MOHAMED, G. A & PROKSCH, P. "A new steroid glycoside and furochromones from *Cyperus rotundus* L." *Natural Product Research*, 21 (4): 348, 2007.

SENA, M. M. DE; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S & VALARINI, P. J. "Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos". *Química Nova*, 23 (4): 548, 2000.

SILVA, A. A. et al. Controle de plantas daninhas. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO SUPERIOR - ABEAS. Curso de proteção de plantas Módulo 3. Brasília, 2001, 260 p.

SILVA, J. F. Prospecção de Plantas Fitorremediadoras em Solos Contaminados por Metais Pesados. Manaus, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFAM, 2012. Tese de Doutorado, 91.

SILVA, M. G. Biorremediação de Solo Contaminado Por Petróleo Por Diferentes Técnicas de Bioestimulação. Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica – FURG, 2007. Dissertação de Mestrado, 92 p.

SILVA, R. O. A Espectroscopia de RMN Como Ferramenta Elucidativa: Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e Metabonômica. Recife, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPE, 2010. Tese de Doutorado, 212 p.

SILVA, S. Fungos Micorrízicos Arbusculares no Crescimento, Extração de Metais Pesados e Características Anatômicas da *Brachiaria decumbens* Stapf. Em Solo Contaminado. Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UFLA, 2006. Tese de Doutorado, 82.

SINGH, N.; PANDEY, B. R.; VERMA, P. BHALLA, M. & GILCA, M. “Phyto-pharmacotherapeutics of *Cyperus rotundus* Linn. (Motha): An overview”. Indian Journal of Natural Products and Resources, 3 (4): 467-469, 2012.

SHIMIZU, V. K. Classificação e Caracterização de Tipos de Minérios de Cobre da Mina do Sossego – Região de Carajás. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências – Escola Politécnica da USP, 2012. Dissertação de Mestrado, 121 p.

SOARES, M. R. Coeficiente de Distribuição (kd) de Metais Pesados em Solos do Estado de São Paulo. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – ESALQ, 2004. Tese de Doutorado, 201 p.

SUBHASHINI, V & SWAMY, A. V. V.S. “PHYTOREMEDIATION OF CADMIUM AND CHROMIUM CONTAMINATED SOILS by *Cyperus rotundus*. LINN”. American International Journal of Research in Science, Technology, Engineering & Mathematics, 14 (338): 99, 2013.

SWISŁOCKA, R.; KOWCZYK-SADOWY, M.; KALINOWSKA, M.; AND LEWANDOWSKI, W. “Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and theoretical studies of p-coumaric acid and alkali metal p-coumarates”. Spectroscopy, **27**: 45, 2012.

TAVARES, L. A. Utilização de Métodos Quimiométricos aliados a RMN na Caracterização de diferentes tipos de cafés comerciais. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de Doutorado, 169 p.

TAVARES, S. R. L. T. Fitorremediação em Solo e Água de Áreas Contaminadas Por Metais Pesados Provenientes da Disposição de Resíduos Perigosos. Rio de Janeiro,

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, COPPE – UFRJ, 2009. Tese de Doutorado, 371 p.

THOMAS, R. Tutorial spectroscopy: A Beginner's Guide to ICP-OES – Part I. [S.I.]: Spectroscopy, 16 (4): 2001. Disponível em: <[http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/beginer\\_guide\\_icpms.pdf](http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/beginer_guide_icpms.pdf)>. Acesso em: 02 de novembro de 2015.

TUTIDA, D. & FOGAÇA, R. Como funciona a contaminação dos solos. [S.I.]: Howstuffworks, 2012. Disponível em: <<http://ambiente.hsw.uol.com.br/contaminacao-dos-solos1.htm>>. Acesso em: 24 maio de 2012.

VIANA, F.; CORREIA, T. M. B.; MACHADO, M. I.; COSTA, C. B. & BAISCH. “Utilização da Fitorremediação em Áreas Contaminadas por Petróleo e Seus Resíduos”. Anais do IV Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (4º PDPETRO). Campinas – SP, [S.I.]: 2007. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/1859/A%20utiliza%c3%a7%c3%a3o%20da%20fitorremedia%c3%a7%c3%a3o.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2015.

WANG, C.; GU, C.; WANG, X.; GUO, H.; GENG, J.; YU, H. & SUN, J. “Stress response and potential biomarkers in spinach (*Spinacia oleracea* L.) seedlings exposed to soil lead”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**: 41, 2011.

WOLFENDER, J-L. “HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue”. *Planta Med*, **75**: 719, 2009.

YADAV, S. K. “Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants”. *South African Journal of Botany*, **76**: 168, 2010.

YOSHIMURA, E.; KOBAYASHI, R.; FURIHATA, K.; KAJIWARA, H. & YAMAZAKI. “<sup>1</sup>H <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of phytochelatin”. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**: 142, 2000.

YU, K.S.H.; WONG, A.H.Y.; YAU, K.W.Y.; WONG, Y. S. & TAM, N. F. Y. “Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments”. *Marine Pollution Bulletin*, **51**: 1072, 2005.

ZAFAR, M.; AHMAD, M.; KHAN, M. A.; SULTANA, S.; JAN, G.; AHMAD, F.; JABEEN, A.; SHAH, G. M.; SHAHEEN, S.; SHAH, A.; NAZIR, A. & MARWAT, S. “Chemotaxonomic clarification of pharmaceutically important species of *Cyperus* L.”. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (1): 68, 2011.

ZEITOUNI, C. F. Eficiência de Espécies Vegetais Como Fitoextratoras de Cádmiu, Chumbo, Cobre, Níquel e Zinco de um latossolo vermelho amarelo distrófico. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Agricultura tropical e subtropical – IAC, 2003. Dissertação de Mestrado, 89 p.

ZHOU, Z. & FU, C. "A new flavanone and other constituents from the rhizomes of *Cyperus rotundus* and their antioxidant activities". *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (6): 964-965, 2013.

ZHOU, Z. & YIN, W. "Two Novel Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* L.". *Molecules*, **17**: 12637, 2012.