

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DOS
EXTRATOS DA AROEIRA-PRETA *Myracrodruon urundeuva*
Freire Allemão NO DESENVOLVIMENTO DAS SEMENTES
DAS BRAQUIÁRIAS *Urochloa decumbens* Stapf E *Urochloa*
brizantha (Hochst. ex A. Rich) Stapf”**

Jeniffer Miho Yoshioka*

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

Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Co-orientador: João Oiano Neto (Embrapa CPPSE)

*** bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jeniffer Miho Yoshioka, realizada em 20/12/2021.

Comissão Julgadora:

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

Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira (UNAERP)

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Aos meus queridos pais, Helena e Ciro,
por acreditarem em mim e serem o lar para onde sempre posso voltar.

Ao Thiago,
meu companheiro de todas as horas.

*“Embora eu saiba que de uma planta brota uma flor,
continuo surpreendida com os caminhos secretos da natureza”*

Clarice Lispector

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos por todo apoio e que, mesmo fisicamente distantes, sempre me acompanham.

Ao meu namorado Thiago, pelo carinho e companheirismo durante mais uma etapa importante na minha trajetória.

À orientadora Profa Dra. Maria Fátima que tanto nos inspira pela sua paixão à química de produtos naturais. Meu muito obrigada por todo o apoio neste projeto de pesquisa.

Ao co-orientador Dr. João Oiano, com quem venho trabalhando desde a minha iniciação científica. Meu muito obrigada pela idealização deste trabalho e por toda a contribuição que teve em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Química por todo auxílio para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Rafael Gusmão e ao Laboratório de Sementes da Embrapa Pecuária Sudeste pelo auxílio e suporte na execução dos ensaios biológicos.

Aos colegas do grupo de pesquisa, em especial à Dianne, Luciano Rodrigues e Luciano da Silva pelo conhecimento compartilhado e pelas ajudas nos momentos em que mais precisei; aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, em especial ao Luis Guillermo pela ajuda no LC-MS/MS.

Ao Prof Dr. Felipe e seu grupo de pesquisa por me acolherem nas reuniões de seu grupo. Em especial às minhas queridas amigas Josi, Lilian e Victoria pelo acolhimento, trocas de experiências e, principalmente, pela amizade.

À minha amiga Amanda Lyane, pelo companheirismo que se mantém desde o primeiro dia da graduação.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e à CAPES pelo apoio (Código de Financiamento 001).

E a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível, meu muito obrigada!

Abreviações

[M+H] ⁺	Molécula protonada
[M-H] ⁻	Molécula desprotonada
AcOEt	Acetato de etila
ACA	Extrato dos caules da aroeira-preta cultivada
ACE	Acetona
AFL	Extrato das folhas da aroeira-preta cultivada
AFO	Extrato das folhas da aroeira-preta coletada
ARM	Extrato dos ramos da aroeira-preta coletada
ARZ	Extrato das raízes da aroeira-preta cultivada
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
EIC	Cromatograma de íons extraídos
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FBMN	<i>Feature-based molecular networking</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatógrafo líquido acoplado a detector de massas <i>tandem</i>
LC-PDA	Cromatógrafo líquido acoplado a detector com arranjo de fotodiodos
LC-UV	Cromatógrafo líquido acoplado a detector ultravioleta
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MCL	Metanol:clorofórmio 75:25 v/v
MeOH	Metanol
MN	Rede molecular (<i>Molecular Networking</i>)
MS ¹	Íons precursores

MS ²	Íons fragmentos
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PSII	Fotossistema II
QTOF	Analisador de massas quadrupolo por tempo-de-voo
RDA	Retro Diels-Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
tr	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatógrafo líquido de ultra-eficiência

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 - Principais características de plantas invasoras.....	5
TABELA 4.1 - Código dos extratos obtidos e suas respectivas descrições	34
TABELA 4.2 - Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico dos extratos.....	35
TABELA 4.3 - Fases móveis utilizadas no fracionamento dos extratos brutos ACA, AFL e ARZ em cartuchos de SPE.....	37
TABELA 4.4 – Condições utilizadas no fracionamento por filtração <i>flash</i> dos extratos brutos.	38
TABELA 4.5 – Amostras preparadas para os testes de germinação das sementes das braquiárias e desenvolvimento das plântulas.....	39
TABELA 4.6 - Gradiente exploratório utilizado para análise no sistema UHPLC-ESI-QTOF.....	42
TABELA 4.7 - Energia de colisão utilizada na câmara de dissociação para a formação das fragmentações	43
TABELA 5.1 - Atividades observadas na germinação das sementes de <i>Urochloa brizantha</i> , <i>U. decumbens</i> e <i>Lactuca sativa</i> quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.....	71
TABELA 5.2 - Atividades observadas no crescimento do hipocótilo das plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> , <i>U. decumbens</i> e <i>Lactuca sativa</i> quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.....	72
TABELA 5.3 - Atividades observadas no crescimento da radícula das plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> , <i>U. decumbens</i> e <i>Lactuca sativa</i> quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.....	73
TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> utilizando a técnica de LC-MS/MS	79

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Espécies de braquiária	3
FIGURA 1.2 - <i>Myracrodruon urundeuva</i> Freire Allemão	8
FIGURA 1.3 - Mapa de ocorrência da aroeira-preta (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.) no Brasil.....	9
FIGURA 1.4 - Estruturas químicas dos compostos: (a) juglona, aleloquímico isolado da noqueira-preta <i>Juglans nigra</i> L., (b) sorgoleona, aleloquímico produzido pelo sorgo <i>Sorghum ssp</i> e (c) plastoquinona.	14
FIGURA 1.5 - Representação esquemática do processo de criação da rede molecular através do MN Clássico	22
FIGURA 1.6 - Métodos para a construção da rede molecular a partir de dados de espectrometria de massas <i>non-target</i> utilizando a plataforma do GNPS	23
FIGURA 3.1 - Imagem de satélite da Fazenda Nova Serrana	30
FIGURA 3.2 – Mudas cultivadas da aroeira-preta utilizadas na obtenção das amostras dos caules (ACA), folhas (AFL) e raízes (ARZ).	31
FIGURA 4.1 - Etapas do preparo da amostra vegetal cultivada para o preparo de extratos.	34
FIGURA 4.2 - <i>Vials</i> contendo os extratos brutos diluídos, submetidos à uma análise preliminar do perfil químico	35
FIGURA 4.3 - Sistema de extração em fase sólida e as frações coletadas no fracionamento do extrato das folhas da aroeira-preta cultivada (AFL).	36
FIGURA 4.4 - Fluxograma das etapas de (1) preparo de amostra, (2) aquisição de dados por LC-MS/MS, (3) pré-processamento, (4 e 5) processamento dos dados e (6) construção da rede molecular	45
FIGURA 5.1 - Influência dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Urochloa brizantha</i>	48
FIGURA 5.2 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> a 100 mg/mL no desenvolvimento de <i>Urochloa brizantha</i>	50
FIGURA 5.3 - Influência dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL, no desenvolvimento de <i>Urochloa decumbens</i>	52
FIGURA 5.4 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> a 100 mg/mL no desenvolvimento de <i>Urochloa decumbens</i>	54
FIGURA 5.5 - Influência dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Lactuca sativa</i>	56

FIGURA 5.6 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> a 100 mg/mL no desenvolvimento da alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	58
FIGURA 5.7 - Influência dos extratos das caules e raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Urochloa brizantha</i>	60
FIGURA 5.8 - Influência das frações dos extratos das caules e raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Urochloa brizantha</i>	62
FIGURA 5.9 - Influência dos extratos das caules e raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Urochloa decumbens</i>	64
FIGURA 5.10 - Influência das frações dos extratos das caules e raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no desenvolvimento da <i>Urochloa decumbens</i>	65
FIGURA 5.11 - Contaminação por fungos das sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) observadas durante o ensaio biológico com os extratos da aroeira-preta.....	67
FIGURA 5.12 – Evolução da contaminação das sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) por fungos durante o ensaio biológico com (a) extratos brutos das raízes, (b) fração acetato de etila das raízes e (c) fração metanólica das raízes de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	69
FIGURA 5.13 - Contaminação por fungos observada nos tratamentos com os extratos das raízes e suas respectivas frações.....	70
FIGURA 5.14 – Cromatogramas dos extratos brutos de (a) caules (b) folhas e (c) raízes	76
FIGURA 5.15 – Representação de um nodo na rede molecular.....	77
FIGURA 5.16 - <i>Cluster</i> dos taninos hidrolisáveis (N1)	86
FIGURA 5.17 - <i>Cluster</i> dos flavonoides glicosilados (N2)	89
FIGURA 5.18 - <i>Cluster</i> de nodo único (N3) formado pelo íon de m/z 431,10, observado na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização	90
FIGURA 5.19 - Mecanismo proposto para a quebra do anel de glicose da isovitexina levando ao íon fragmento m/z 311,05.....	91
FIGURA 5.20 - <i>Cluster</i> das agliconas quercetina e miricetina (P1)	92
FIGURA 5.21 - <i>Cluster</i> dos flavonoides glicosilados (P2)	94
FIGURA 5.22 - <i>Cluster</i> do ácido elágico (N4).....	95
FIGURA 5.23 - <i>Cluster</i> das catequinas e derivados (N5)	97
FIGURA 5.24 - Quebra da ligação entre os carbonos C2 e C1' da diidromiricetina levando à formação dos fragmentos m/z 125 e 193.....	98
FIGURA 5.25 - <i>Cluster</i> das catequinas e derivados (P3).....	99
FIGURA 5.26 - <i>Cluster</i> dos policetídeos (N6).....	101

FIGURA 5.27 - <i>Cluster</i> do ácido quínico e derivados (N7).....	103
FIGURA 5.28 - <i>Cluster</i> do ácido quínico e derivados (P4).....	104
FIGURA 5.29 - <i>Cluster</i> das chalconas (N8).....	106
FIGURA 5.30 - <i>Cluster</i> das chalconas (N9).....	107
FIGURA 5.31 - Estrutura química das urundeuvinas A, urundeuvina J e matosina. .	108
FIGURA 5.32 - Estrutura química das urundeuvinas C e G.	109
FIGURA 5.33 - Proposta de fragmentação da chalcona eriodictiol.	109
FIGURA 5.34 - Estrutura química das urundeuvinas B, D e F.	110
FIGURA 5.35 - Estrutura química das urundeuvinas E e H.....	111
FIGURA 5.36 - <i>Cluster</i> dos derivados de ácido gálico (N10)	112
FIGURA 5.37 - <i>Cluster</i> do ácido gálico (N11).....	114
FIGURA 5.38 - <i>Cluster</i> dos ácidos anacárdicos (N12)	115
FIGURA 5.39 - Distribuição dos taninos hidrolisáveis nos tecidos da aroeira-preta.	117
FIGURA 5.40 - Distribuição dos flavonoides nos tecidos da aroeira-preta.	117
FIGURA 5.41 - Distribuição das catequinas e derivados nos tecidos da aroeira-preta	118
FIGURA 5.42 - Distribuição dos ácidos graxos nos tecidos da aroeira-preta.....	118
FIGURA 5.43 - Distribuição das chalconas nos tecidos da aroeira-preta	119
FIGURA 5.44 - Distribuição dos ácidos anacárdicos nos tecidos da aroeira-preta ...	120
FIGURA 5.45 - Comparação da distribuição dos íons nas diferentes amostras via processamentos de dados por <i>MS-Dial</i>	122
FIGURA 5.46 - Distribuição do tanino hidrolisável pentagalolil hexosídeo nas frações ativas no ensaio biológico <i>in vitro</i>	123
FIGURA 5.47 - Distribuição dos flavonoides nas frações ativas no ensaio biológico <i>in vitro</i>	124
FIGURA 5.48 - Distribuição dos derivados do ácido quínico nas frações ativas no ensaio biológico <i>in vitro</i>	126
FIGURA 5.49 - Distribuição das chalconas nas frações ativas no ensaio biológico <i>in vitro</i>	127
FIGURA 5.50 - Estrutura química das chalconas diméricas urundeuvinas, produzidas pela aroeira-preta	130
FIGURA 5.51 - Estruturas das chalconas inibidoras da PEPC de plantas C4.....	131

Resumo

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS DA AROEIRA-PRETA *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão NO DESENVOLVIMENTO DAS SEMENTES DAS BRAQUIÁRIAS *Urochloa decumbens* Stapf E *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf. As braquiárias possuem grande importância no setor pecuário, porém essas gramíneas são também consideradas invasoras agressivas, causando prejuízos à produtividade de algumas culturas e degradação de áreas de conservação. Observações de campo indicam que a espécie *Myracrodruon urundeuva* pode apresentar interações alelopáticas com as espécies de *Urochloa*. No entanto, não existem estudos na literatura descrevendo a ação alelopática dos diferentes tecidos da aroeira-preta frente às braquiárias e as possíveis classes de compostos envolvidas nessa interação. Neste trabalho, foi avaliado o potencial alelopático dos extratos brutos e frações preparadas a partir das folhas, ramos, caules e raízes da aroeira-preta na germinação e desenvolvimento das sementes das braquiárias *U. brizantha*, *U. decumbens* e *Lactuca sativa*. A composição química dessas amostras foi determinada via UHPLC-ESI-QTOF. Este foi o primeiro estudo realizado com a aroeira-preta utilizando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e a criação da rede molecular via *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) como ferramentas metabolômicas para anotação dos metabólitos secundários. Foi anotado um total de 55 metabólitos, distribuídos em 8 classes, sendo que 20 foram anotados pela primeira vez para a espécie *M. urundeuva*. Os extratos avaliados inibiram significativamente a germinação e o desenvolvimento das plântulas das braquiárias, destacando-se a fração acetato de etila das raízes que inibiu a germinação nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e o desenvolvimento das radículas nas concentrações de 100, 50 e 25mg/mL. Essa fração apresentou como componentes majoritários as chalconas diméricas urundeuvinas.

Abstract

ALLELOPATHIC ACTIVITIES OF *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão EXTRACTS ON DEVELOPMENT OF BRACHIARIA GRASSES *Urochloa decumbens* Stapf AND *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf. SEEDS. Brachiaria grasses have great importance in the livestock sector, however, these grasses are considered weeds that affect negatively the productivity of many crops. Field observations indicate that *Myracrodruon urundeuva* shows allelopathic effects on *Urochloa* species. However, there are no data on literature describing the allelopathic effects for different tissues of aroeira-preta, neither the classes of secondary metabolites involved on those interactions. In this study, the allelopathic effect of the crude extracts and fractions of leaves, branches, stems and roots of *M. urundeuva* was evaluated into seeds germination and seedlings growing of *U. brizantha*, *U. decumbens* and *Lactuca sativa*. Chemical composition of these extracts were analyzed by UHPLC-ESI-QTOF. This was the first study of aroeira-preta using the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform and Feature-Based Molecular Networking (FBMN) as metabolomics tools for compounds annotation. Fifty-five secondary metabolites, distributed in eight different classes of compounds, were annotated, which twenty were annotated for the first time for *M. urundeuva*. Crude extracts and fractions inhibited seeds germination and development. The ethyl acetate fraction of roots showed a higher activity, inhibiting seeds germination at concentrations of 100 and 50 mg/mL and roots development in all tested concentrations, i.e., 100, 50 and 25 mg/mL. This fraction was characterized by dimeric chalcones urundevines as their majoritary compounds.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Introdução da braquiária no Brasil	1
1.2. <i>Urochloa brizantha</i> e <i>Urochloa decumbens</i>	2
1.3. <i>Myracrodruon urundeuva</i> Freire Allemão	7
1.3.1. Estudos alelopáticos envolvendo a aroeira-preta	11
1.4. Alelopatia.....	13
1.4.1. Alelopatia e a busca por produtos naturais com potencial atividade herbicida .	15
1.5. Processamento de dados utilizando o <i>molecular networking</i> (MN) e <i>feature-based molecular networking</i> (FBMN)	19
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. Materiais	27
3.1. Solventes.....	27
3.2. Colunas	27
3.3. Filtros.....	27
3.4. Cartuchos para extração em fase sólida (SPE)	27
3.5. Micropipetas	28
3.6. Papel de germinação.....	28
3.7. Equipamentos	28
3.7.1. Evaporadores rotativos	28
3.7.2. Balanças analíticas	28
3.7.3. Cromatógrafos	29
3.7.4. Câmara de germinação	29
3.7.5. Liofilizador.....	29
3.7.6. Ultrassom	29
3.8. Material vegetal	30
3.8.1. <i>Myracrodruon urundeuva</i> – amostra coletada	30
3.8.2. <i>Myracrodruon urundeuva</i> – amostra cultivada.....	30
3.8.3. Acesso ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado	31
3.8.4. Sementes utilizadas nos ensaios biológicos	32
4. Metodologia	33
4.1. Preparo dos extratos e análises iniciais.....	33

4.1.1.	Preparo dos extratos da aroeira-preta	33
4.1.2.	Análise do perfil químico dos extratos da aroeira-preta por LC-PDA.....	35
4.1.3.	Fracionamento por extração em fase sólida (SPE).....	36
4.2.	Investigação do efeito alelopático de <i>Myracrodruon urundeuva</i> sob as espécies <i>Urochloa brizantha</i> e <i>Urochloa decumbens</i>	37
4.2.1.	Fracionamento do extrato bruto por filtração <i>flash</i>	37
4.2.2.	Ensaio biológico	38
4.3.	Análise dos metabólitos secundários e sua distribuição nos tecidos da planta	40
4.3.1.	Aquisição de dados de MS ² por UHPLC-ESI-QTOF	41
4.3.2.	Pré-processamento dos dados por <i>MSDial</i> , anotação dos compostos por <i>MSFinder</i> e construção da rede molecular por FBMN	43
5.	Resultados e Discussões	47
5.1.	Avaliação do efeito alelopático dos extratos da aroeira-preta.....	47
5.1.1.	Ensaio com as amostras coletadas (ARM, AFO) e subfrações	47
5.1.2.	Ensaio com as amostras cultivadas (ACA, ARZ) e subfrações	59
5.1.3.	Resumo dos resultados obtidos nos ensaios biológicos	70
5.2.	Anotação dos metabólitos secundários de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	75
5.2.1.	Taninos hidrolisáveis.....	85
5.2.2.	Flavonoides	87
5.2.3.	Catequinas e derivados.....	95
5.2.4.	Ácidos graxos.....	100
5.2.5.	Ácido quínico e derivados.....	101
5.2.6.	Chalconas	105
5.2.7.	Ácido gálico e derivados	111
5.2.8.	Ácidos anacárdicos.....	114
5.3.	Distribuição dos metabólitos secundários nos tecidos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> 116	
5.3.1.	Distribuição dos metabólitos secundários pelas frações ativas possivelmente associados com a ação alelopática	120
6.	Conclusões	133
7.	Referências Bibliográficas	135
8.	Apêndice.....	145

1. Introdução

A espécie *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão, família Anacardiaceae, é uma planta popularmente conhecida como aroeira-preta, nativa do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro^{1,2}. Em áreas de pastagens é possível observar uma dificuldade no crescimento das braquiárias sob a copa da aroeira. Devido à altura de sua copa, a supressão da luz solar não deve ser considerada um fator determinante que justifique a observação anterior e, portanto, suspeita-se da presença de interação alelopática entre as duas espécies.

Apesar das braquiárias *Urochloa decumbens* Stapf e *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf serem amplamente empregadas na pecuária como pastagem devido ao seu rápido e fácil cultivo, essas gramíneas vêm sendo descritas como espécies exóticas altamente invasoras, prejudicando a produtividade de algumas das principais cultivares (ex. trigo e milho)³ e dificultando a conservação de biomas naturais⁴⁻⁹. Tendo em vista a potencial atividade alelopática da aroeira-preta¹⁰⁻¹³ e sua possível interação com a braquiária, o estudo das interações alelopáticas entre essas espécies abre possibilidades na busca de novos compostos para controle das espécies *U. decumbens* e *U. brizantha*.

1.1. Introdução da braquiária no Brasil

As forrageiras tropicais nativas não produzem massa suficiente para o pastoreio em algumas épocas do ano. Assim, as gramíneas exóticas passaram a ser utilizadas com a finalidade de aumentar a produção de forragem em épocas críticas de seca.

Algumas espécies africanas de braquiárias foram introduzidas no Brasil ainda na época colonial, como é o caso da *Urochloa mutica* Stapf. Porém foi apenas a partir da década de 1950 que as braquiárias passaram a ser utilizadas como forrageira na pecuária^{14,15}. Apesar de muitas outras espécies

exóticas de gramíneas serem utilizadas no país (ex. *Panicum maximum* cv. centenário, *Paspalum notatum*, *Andropogon gayanus*, etc), atualmente as braquiárias são os capins mais utilizados na pecuária, com maiores destaques *Urochloa decumbens*, *U. brizantha* e a *U. humidicola*¹⁴.

A importância econômica das braquiárias está na sua utilização no setor pecuário, sendo utilizadas como pastagens durante várias décadas. A utilização das braquiárias como forrageira resultou em um impacto revolucionário na produtividade de vastas áreas que anteriormente estavam em desuso devido à sua baixa fertilidade, como é o caso do Cerrado⁴.

Atualmente a pecuária brasileira representa cerca de 8,5% do PIB nacional. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil encontra-se como o principal exportador e o segundo maior produtor de carne bovina do mundo¹⁶. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), o faturamento do agronegócio na Pecuária foi de 618,50 bilhões de reais em 2019¹⁷.

1.2. *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens*

Pertencente à família Poaceae, o gênero *Brachiaria* abrange cerca de 100 espécies distribuídas entre os trópicos, especialmente na África. Crescem em uma grande variedade de habitats, desde pântanos à semidesertos, sendo tipicamente encontrados em savanas. Algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Brachiaria* encontram-se atualmente no gênero *Urochloa*^{14,18}.

As cinco principais espécies introduzidas na América tropical pertencem atualmente ao gênero *Urochloa*, são elas: *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. dictyoneura*, *U. humidicola* e *U. ruzinensis*. *Urochloa* também é um gênero paleotropical e inclui 12 espécies provenientes principalmente da savana africana¹⁸. Devido à essa mudança de classificação, em referências mais

antigas, é comum as braquiárias *Urochloa decumbens* e *U. brizantha* serem descritas com o nome *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha* respectivamente¹⁸.

O principal interesse econômico das braquiárias está no seu bom desempenho como forrageira¹⁹. *U. brizantha* e *U. decumbens* (FIGURA 1.1) são as espécies mais utilizadas na produção de carne no Brasil. Ambas toleram razoavelmente bem a escassez de luz e a falta de água e são capazes de se adaptarem rapidamente aos solos de baixa fertilidade das savanas sul-americanas²⁰.

FIGURA 1.1 - Espécies de braquiária: (a) campim-braquiária (*Urochloa decumbens*) e (b) braquiarão (*Urochloa brizantha*). Fonte: Bayer Brasil Silvicultor. Disponível em: <<https://www.environmentalscience.bayer.com.br/floresta/o-que-controlar#filter=.>>



Urochloa decumbens cv. Basilisk (ou *U. decumbens*; FIGURA 1.1.a), também conhecida como capim-braquiária, é uma cultivar bem adaptada a solos ácidos inférteis. Essa espécie forma um pasto agressivo, altamente produtivo e capaz de suportar pisoteio e pastagem pesada^{4,21}. Apesar de muito utilizada na pecuária, estudos mostram que quando utilizada para alimentação do gado, o capim-braquiária pode ser responsável por causar fotossensibilidade nos ruminantes^{22,23}.

Urochloa brizantha cv. Marandu (ou *U. brizantha*; FIGURA 1.1.b), também conhecido como braquiarão, possui valor nutritivo similar a *U. decumbens* cv. Basilisk. Seu principal atrativo está em sua resistência às cigarrinhas-das-pastagens. Apesar dessa resistência, o cultivar não é tolerante a

solos com pouca drenagem e requer melhores condições de fertilidade quando comparado ao capim-braquiária^{4,21}.

A utilização dessas braquiárias se estende há mais de quatro décadas e contribuiu para um impacto positivo no crescimento do setor pecuário. Apesar de ser uma importante forrageira, devido ao manejo inadequado das braquiárias aliado à fertilização descontrolada das vastas áreas de Cerrado destinadas para pastagens, a utilização dessas gramas exóticas resultou em milhões de hectares severamente degradados⁴. Além disso, atualmente as braquiárias são consideradas invasoras agressivas e vem prejudicando a produtividade de algumas produções agrícolas. As cultivares mais afetadas pelas gramíneas invasoras são trigo, soja, arroz, milho, algodão e batata, com reduções de produtividade em 23, 37, 37, 40, 36 e 30%, respectivamente³.

As espécies exóticas possuem grande potencial para se tornarem plantas invasoras. Isso acontece porque quando introduzidas em um novo ecossistema, a planta é inserida em um ambiente com interações distintas daquelas que se encontraria em seu ecossistema de origem e, dessa forma, pode encontrar condições mais favoráveis para sua reprodução e estabelecimento²⁴. Esta observação nem sempre é capaz de explicar por si só a razão pela qual a espécie exótica torna-se uma invasora agressiva e outras características e mecanismos de invasão devem ser levados em consideração.

De acordo com Radosevich e Holt (1984)²⁵, existem 12 aspectos principais que caracterizam uma planta invasora (TABELA 1.1). As braquiárias cumprem 11 características dentre aquelas descritas, com exceção da característica número 4.

As braquiárias são plantas do tipo C4 e consideradas invasoras agressivas devido às características que incluem: alta capacidade fotossintética; alocação da biomassa para produção das folhas; reprodução vegetativa e sexual; uso eficiente dos nutrientes disponíveis no solo; capacidade de resistir aos solos

ácidos, à baixa fertilidade e escassez de água; alta produção e fácil dispersão das sementes e alta taxa de germinação^{4,5,20}. Além disso, as sementes das braquiárias apresentam dormência inicial, resultando em uma germinação irregular e viabilidade das sementes por até oito anos no solo²⁶.

TABELA 1.1 - Principais características de plantas invasoras. Adaptado de RADOSEVICH, S. R. & HOLT, J. S.²⁵

1.	Os requisitos de germinação cumpridos em muitos ambientes;
2.	Germinação descontínua e grande longevidade das sementes;
3.	Rápido crescimento;
4.	Produção contínua de sementes enquanto as condições de cultivo permitem;
5.	Autocompatibilidade, mas não autogamia completa ou apomixia;
6.	Polinização cruzada, quando ocorre, por visitantes não especializados ou vento;
7.	Alta produção de sementes em condições favoráveis e circunstâncias ambientais;
8.	Produção de sementes em uma ampla gama de condições ambientais; tolerância e plasticidade;
9.	Adaptações para dispersão à curta distância e longa distância;
10.	Perenes: reprodução vegetativa vigorosa ou regeneração de fragmentos;
11.	Fragilidade para não serem retiradas do chão facilmente;
12.	Capacidade de competir interespecificamente por meios especiais.

A capacidade das braquiárias em produzir uma densa camada no solo também pode ser considerada uma vantagem competitiva em relação às demais espécies. Tal comportamento resulta em uma redução significativa da incidência de luz na superfície do solo, dificultando a germinação de sementes de outras espécies que podem estar presentes no solo⁶. Alguns estudos mostraram que as braquiárias produzem compostos alelopáticos que inibem o estabelecimento e crescimento de outras espécies, aumentando ainda mais o sucesso de sua invasão²⁷⁻²⁹. A liberação de aleloquímicos pela espécie exótica contribui ainda mais para o sucesso de sua predominância, uma vez que as plantas nativas da região geralmente não estão adaptadas às fitotoxinas produzidas pelas espécies introduzidas²⁴.

Estudos mostraram que a densidade de *Urochloa decumbens* no solo influencia diretamente na riqueza de espécies nativas da região⁷. Além

disso, a presença de *U. decumbens* tem efeito excludente sobre as espécies de gramíneas nativas. Pivello e colaboradores (1999)⁵ demonstraram que um dos principais fatores que levam ao empobrecimento de espécies nativas no Cerrado de Emas dá-se devido à expansão de gramíneas exóticas como *U. decumbens*. Ainda no mesmo trabalho, a *Rhynchospora exaltata*, uma grama nativa da família Cyperaceae, mostrou-se dominante em áreas de cerrado *sensu stricto*, exceto em trechos em que *U. decumbens* esteve presente⁵.

Um estudo realizado na Floresta Nacional de Carajás por Ferreira e colaboradores (2016)⁶ mostra que a presença de *U. decumbens* possui efeito negativo na riqueza de espécies e na regeneração natural da região estudada. Das 40 espécies de árvores presentes nos lotes avaliados, apenas duas espécies (5% do total) crescem em lotes onde *U. decumbens* esteve presente; dentre as 26 espécies de lianas (ex. cipós e trepadeiras), apenas uma espécie (4% do total) cresce na presença de *U. decumbens* e as três espécies de palmeiras encontradas ocorreram exclusivamente em áreas isentas da braquiária.

Devido à agressividade da espécie, a dispersão das braquiárias vem acontecendo com tamanha magnitude que podem ser encontradas em praticamente todo fragmento de Cerrado, competindo com espécies nativas^{5,6}. É possível que com o tempo a espécie invasora perca a dominância. Porém o que foi observado no Cerrado de Emas por Pivello e colaboradores (1999)⁵ é que, enquanto *Melinis minutiflora* (espécie africana da família Poaceae) foi perdendo força de dominância com o passar do tempo, *U. decumbens* foi capaz de substituí-la e com uma dominância ainda maior.

A presença dessas plantas invasoras altera também a quantidade de massa seca no ambiente. Apesar da ocorrência de queimas naturais serem essenciais para o equilíbrio do ecossistema no cerrado, o aumento de massa seca pela presença dessas gramíneas exóticas modifica drasticamente o

comportamento do fogo, comprometendo a regeneração natural das plantas nativas deste bioma⁸.

A fim de se estudar a influência do fogo na predominância das espécies invasoras *Melinis minutiflora* e *Urochloa brizantha* no cerrado, Damasceno & Fidelis (2020)³⁰ observaram que enquanto a biomassa de *M. minutiflora* diminui com o fogo, a biomassa de *U. brizantha* não foi afetada pela queimada. Apesar das duas espécies pertencerem à família Poaceae, o fogo pode ser utilizado como ferramenta de controle da *M. minutiflora* mas não de *U. brizantha*. Essa diferença de comportamento pode ser explicada pelas características de *U. brizantha* que incluem a rápida reprodução e propagação por propágulos, resistência das sementes ao fogo e alta capacidade de rebrota após distúrbios³⁰.

Atualmente a presença das braquiárias em áreas de conservação representa um problema à diversidade da flora local que vem sendo discutido desde os anos 90⁵. A degradação do terreno está intimamente relacionada à presença de espécies invasoras^{7,30}, uma vez que altera as características do solo, a disponibilidade de luz e, de forma mais geral, a dinâmica original do ecossistema. Portanto, a restauração dos ecossistemas pode ser considerada um passo fundamental para garantir a conservação da biodiversidade.

1.3. *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão

Myracrodruon urundeuva Freire Allemão (anteriormente classificado como *Astronium urundeuva* Engl.), popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (FIGURA 1.2), é uma planta arbórea pertencente à família Anacardiaceae presente nos biomas Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica³¹. É uma planta nativa do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (FIGURA 1.3, p. 9), mas não endêmica do Brasil, e está presente no continente americano desde o México até a Argentina^{1,2}.

FIGURA 1.2 - *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão. Foto: Gerda Nickel Maia, do livro “Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial”



Devido à grande resistência mecânica de sua madeira, a aroeira-preta tem um alto valor econômico, sendo utilizada para construção de cercas, tacos para assoalho e vigas. Sua madeira é resistente à insetos e microrganismos, possui baixa permeabilidade à umidade e produtos químicos, sendo considerada praticamente imputrescível^{2,32}. Tais características levaram à extração descontrolada da madeira e, atualmente, a aroeira-preta está incluída na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente³³ e pelo Centro Nacional de Conservação da Flora¹.

A aroeira-preta apresenta diversas atividades farmacológicas sendo amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de infecção nos rins, gastrite, diarreia, alergias, úlceras, como cicatrizante, expectorante e anti-inflamatório^{31,34}.

Estudos envolvendo *M. urundeuva* são relativamente recentes. A procura pelos termos “*Astronium urundeuva*” ou “*Myracrodruon urundeuva*” no banco de dados Scopus, o primeiro artigo encontrado data de 1986 e relata a atividade antiúlcera da aroeira³⁵.

Tal atividade está atribuída à presença de lectinas que interferem diretamente no processo metabólico do inseto, levando à morte da larva por privação nutricional⁴⁰. Ainda sobre sua atividade contra o *A. aegypti*, o *m*-pentadecadienilfenol isolado das sementes da aroeira mostrou-se eficiente contra estágios imaturos do vetor da dengue⁴¹.

Extratos preparados a partir das folhas e dos caules de *M. urundeuva* apresentaram efeito ovicida contra o nematoide *Haemonchus contortus*. Tal atividade é dependente da concentração, sendo os extratos das folhas mais efetivo com 97,73% de inibição da eclosão dos ovos na concentração de 1,25 mg/mL. A atividade anti-helmíntica do extrato está provavelmente relacionada aos taninos presentes, uma vez que a adição de polivinilpolipirrolidona (PVPP, um inibidor de taninos) provocou redução substancial da atividade observada⁴². Estudo realizado por Soares et al.⁴³ mostrou que os inibidores de proteases, chitinases e lipases exudados pelas sementes de *M. urundeuva* interferem negativamente no ciclo de vida do nematoide *H. contortus*.

Trentin e colaboradores⁴⁴ propuseram que os taninos presentes nas cascas da aroeira-preta foram responsáveis pela inibição da formação de biofilme e por danificar a membrana da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Sabe-se que a atividade anti-adesiva e antibiofilme está intimamente relacionada à propriedade antimicrobiana. A atividade bacteriostática encontrada justifica alguns usos da planta na medicina popular que incluem tratamento de doenças infecciosas como tosse, bronquite e infecções urinárias⁴⁴. O óleo obtido a partir da hidrodestilação das folhas da aroeira-preta apresentou atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*. A atividade foi menos pronunciada nas bactérias gram-negativas (*E. coli*, *P.*

aeruginosa e *S. enteritidis*), provavelmente devido à complexidade de sua parede celular⁴⁵.

Além de suas propriedades mecânicas e fitoterápicas, a espécie é ainda recomendada para recuperação de solos degradados^{32,46}. Devido à sua ocorrência em sítios de mineração, Asensio e colaboradores⁴⁷ investigaram o poder fitorremediador de *M. urundeuva*. Quando submetida ao solo contaminado artificialmente com sulfato de cobre, a aroeira-preta apresentou comportamento hiperacumulador de cobre >300mg/kg de Cu em seu tecido, extraindo quantidade considerável de cobre do solo em apenas dois meses. Apesar da necessidade de testes em campo para confirmar sua aplicabilidade na prática, a espécie mostra-se promissora para recuperação de solos contaminados com cobre⁴⁷.

1.3.1. Estudos alelopáticos envolvendo a aroeira-preta

Em áreas de pastagem observa-se uma dificuldade no crescimento das braquiárias próximo à aroeira-preta. Uma vez que a copa dessa espécie arbórea é alta, a supressão da luz solar não é um fator determinante que justifique a inibição do desenvolvimento da forragem. A partir disso, suspeita-se da interação alelopática entre essas espécies vegetais.

Alguns trabalhos investigam o potencial alelopático dos extratos da aroeira-preta. Vieira e colaboradores¹¹ avaliaram o potencial alelopático de extratos hexânicos e metanólicos de caules e folhas da aroeira-preta nos estágios iniciais de crescimento das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), repolho (*Brassica oleracea* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Apesar dos extratos não interferirem significativamente na taxa de germinação, os extratos metanólicos diminuíram o crescimento das raízes da alface e de repolho. Além disso, as sementes de repolho na presença do extrato desenvolveram plântulas com anomalias que incluíam extremidade da raiz primária necrosada, ausência

de epicótilo e sementes intumescidas. Os extratos apresentaram efeitos estimulatórios no crescimento das plântulas de tomate, indicando que o efeito alelopático varia conforme a espécie receptora.

Resultado similar foi encontrado por Silva¹² que analisou potencial alelopático de extratos aquosos da casca da aroeira na germinação e desenvolvimento de repolho (*B. oleracea* L.), tomate (*S. lycopersicum* L.), cebola (*Allium cepa*), capim-braquiária (*Urochloa decumbens*) e picão-preto (*Bidens pilosa*). Os bioensaios apresentaram diminuição significativa na germinação das sementes de tomate e picão-preto, enquanto que o desenvolvimento da radícula foi negativamente afetado nas espécies estudadas exceto para o repolho.

Quando testados com sementes de cebolinha (*Allium fistulosum* L.), os extratos aquosos da aroeira-preta não alteraram significativamente a germinação das sementes, mas foi observada uma influência sobre o comprimento e massa seca da parte aérea da plântula¹⁰.

No caso específico de *U. decumbens*, apesar de não se observar diminuição no percentual de germinação na presença do extrato aquoso das cascas da aroeira-preta, foi verificado efeito negativo significativo na velocidade de germinação e desenvolvimento da radícula e hipocótilo¹².

Apesar dos trabalhos citados, que buscaram estudar a interação alelopática de *M. urundeuva* sobre outras espécies¹⁰⁻¹², até o presente momento nenhum estudo foi realizado referente ao possível potencial alelopático dos extratos preparados a partir das raízes da aroeira-preta. Também não se tem conhecimento de quais compostos são responsáveis por tais atividades. É interessante identificar os compostos responsáveis pelo efeito negativo no crescimento de uma planta, pois além da possibilidade de se conhecer novos mecanismos de inibição, abre a possibilidade de formulação de um novo

herbicida, seja ele produzido a partir do produto natural ou análogo sintético (estrutura básica da molécula original, porém com pequenas derivatizações).

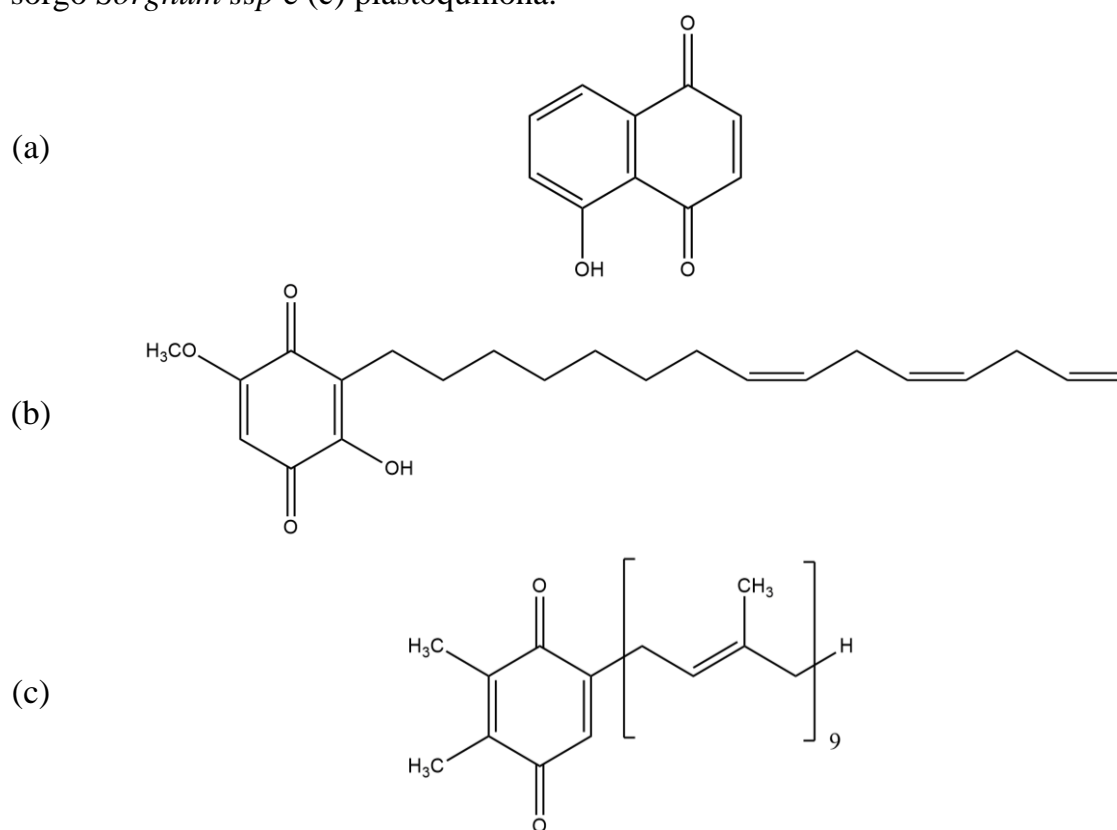
1.4. Alelopatia

As plantas são potencialmente capazes de produzir compostos químicos para se defender de inimigos naturais e aumentar a probabilidade de sucesso de crescimento⁴⁸. A observação mais antiga sobre esse tipo de interação química entre plantas data de 300 a.C., onde Theophrastus, conhecido como “o pai da botânica”, escreveu em um de seus estudos que a “exaustão” do solo causada pelo cultivo de grão-de-bico levou ao extermínio das plantas invasoras na área destinada ao cultivo⁴⁹. Apesar da interação planta-planta ser conhecida há séculos, o termo “alelopatia” surgiu apenas em 1937. O termo “alelopatia”, introduzido por Molish em 1937, refere-se às interações químicas entre plantas e/ou planta-microrganismo e engloba efeitos tanto inibitórios quanto estimulatórios⁵⁰. Em 1992, foram incluídas ao termo alelopatia as interações entre planta-inseto e animal-plantas superiores⁵¹. Atualmente, a Associação Internacional de Alelopatia define alelopatia como sendo o processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas de agricultura e sistemas biológicos²⁴.

Neste contexto é importante ressaltar a diferença entre competição e alelopatia entre plantas. Enquanto que a competição envolve a remoção ou redução de fatores ambientais necessários para o desenvolvimento da planta (ex.: luz, água, nutrientes, etc), a alelopatia é uma interação química mediada por metabólitos secundários produzidos por um organismo e liberados no meio. Após a liberação desses compostos, eles são reconhecidos por um segundo organismo e essa interação química entre as espécies influencia diretamente no comportamento/crescimento da espécie receptora^{24,52}.

Algumas observações de campo dão indícios da ocorrência da alelopatia. Espécies de plantas que são particularmente agressivas em interação com outras espécies podem muitas vezes apresentar ação alelopática. Outro indício de alelopatia é a ausência de vegetação ou vegetação esparsa ao redor de uma espécie⁵³. Um bom exemplo disso é a dificuldade observada no crescimento de espécies de plantas ao redor da noqueira-preta (*Juglans nigra* L.)⁵⁴; tal observação levou à descoberta do aleloquímico juglona (FIGURA 1.4.a.)⁵⁵.

FIGURA 1.4 - Estruturas químicas dos compostos: (a) juglona, aleloquímico isolado da noqueira-preta *Juglans nigra* L., (b) sorgoleona, aleloquímico produzido pelo sorgo *Sorghum ssp* e (c) plastoquinona.



A juglona é um dos primeiros exemplos de aleloquímico descritos na literatura. A degradação do composto pelas bactérias do solo é incompleta e, conseqüentemente, a substância acumula-se no solo em concentrações altas o suficiente para causar efeito tóxico quando absorvida por uma segunda espécie de planta^{24,56}. Quando a juglona foi testada contra espécies invasoras de plantações de trigo e cevada, o composto mostrou-se prejudicial às espécies invasoras testadas *Sinapis arvensis* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Papaver*

rhoeas L. e *Lamium amplexicaule* L., porém não apresentou efeito negativo no crescimento do trigo e da cevada. A partir desse resultado, os autores do trabalho propuseram que a juglona afeta diferentemente monocotiledôneas (trigo e cevada) e dicotiledôneas (espécies invasoras testadas)⁵⁶.

Outro exemplo facilmente observado em campo é a dificuldade de crescimento de espécies quando plantadas em campos anteriormente utilizados no cultivo de outras espécies⁵³. Esse tipo de situação pode ser exemplificado pela dificuldade de crescimento observada em sistemas de rotação de culturas utilizando o sorgo (*Sorghum ssp*). O plantio do sorgo afeta negativamente o crescimento de uma segunda cultura em sistemas de rotação. Isso se deve principalmente à sorgoleona, substância produzida e secretada por uma glândula especializada presente em suas raízes. A sorgoleona é um análogo da plastoquinona (FIGURA 1.4) e compete pelo mesmo sítio ativo no fotossistema II (PSII). Devido ao seu caráter hidrofóbico, a substância é fortemente absorvida pelo solo e permanece em níveis detectáveis por até sete semanas após sua incorporação^{56,57}.

1.4.1. Alelopatia e a busca por produtos naturais com potencial atividade herbicida

Um dos maiores desafios na restauração ecológica está no controle de espécies invasoras. Estudos mostram que a aplicação do herbicida glifosato foi eficaz na diminuição da cobertura de *Urochloa decumbens* no solo, porém mostrou-se necessária a aplicação repetida do herbicida para evitar o restabelecimento da espécie invasora⁷.

O uso de herbicidas sintéticos comerciais na restauração de ecossistemas tem sido questionado devido aos impactos causados na fauna e na flora nativa das regiões protegidas para conservação⁵⁸. Além disso, o uso contínuo e irrestrito de herbicidas sintéticos pode levar ao desenvolvimento de

resistência pelas plantas invasoras³. Nesse sentido, bioherbicidas e agroquímicos baseados em produtos naturais vêm despertado interesse por serem minimamente prejudiciais ao meio ambiente e facilmente degradados pela biota do solo ou por processos físicos^{3,58}.

A diversidade de metabólitos secundários produzidos na interação química entre os seres vivos representa uma rica fonte de diversidade estrutural e atividades biológicas. Diferentes tipos de compostos orgânicos foram identificados como aleloquímicos produzidos por microrganismos e plantas superiores. Esses compostos são classificados como⁵⁹:

- Ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas;
- Lactonas insaturadas;
- Ácidos graxos de cadeias longas e poliacetilenos;
- Naftoquinonas, antraquinonas e complexos de quinonas;
- Fenóis simples, ácidos benzoicos e derivados;
- Ácido cinâmico e derivados
- Cumarinas;
- Flavonoides;
- Taninos hidrolisáveis e condensados;
- Terpenoides e esteroides;
- Aminoácidos e polipeptídeos;
- Alcaloides e cianoidrinas;
- Purinas e nucleotídeos.

Um dos principais argumentos que vai contra a viabilidade da utilização de produtos naturais como herbicidas está na baixa quantidade isolada a partir de fontes naturais e na dificuldade de síntese desses compostos devido à sua complexidade estrutural. Por outro lado, a principal vantagem no estudo de

compostos alelopáticos está na possibilidade de se descobrir novos mecanismos de ação herbicida. Atualmente, cerca de 270 herbicidas estão disponíveis no mercado e possuem 17 modos de ação. Apesar desses 17 modos de ação, quase metade dos herbicidas disponíveis agem em três sítios ativos: fotossistema II (PSII), acetolactato sintase (ALS) e inibição protox²⁴.

Ao longo dos anos, a planta é capaz de se adaptar e contornar os efeitos fitotóxicos de um agente herbicida. A substituição de um herbicida com o mesmo mecanismo de ação é muitas vezes ineficiente e por isso há a necessidade de vários modos de ação. Além disso, a utilização de dois ou mais modos de ação herbicida simultaneamente dificulta o desenvolvimento de resistência pelas plantas ao longo do tempo.

Existem duas estratégias principais para descoberta de produtos naturais com potencial atividade herbicida: (1) testar compostos já isolados para outros propósitos, (por exemplo, testar a atividade herbicida de compostos isolados para testes farmacológicos) e (2) realizar o isolamento direcionado por bioensaios a partir de uma matriz promissora^{53,57}.

A primeira estratégia para a descoberta de produtos naturais com potencial atividade herbicida é explicada pela “economia de recursos” durante a síntese de metabólitos secundários pela planta. A síntese de um produto químico por um organismo vivo é um investimento de energia e recurso. Portanto, um metabólito de defesa é mais “barato” em termos de recursos (ex: carbono, energia, etc.) se puder exercer mais de uma função. Por esse motivo é comum observar uma variedade de atividades biológicas relacionadas ao mesmo composto²⁴.

O isolamento guiado por ensaios biológicos é a abordagem mais comum entre os químicos que trabalham com alelopatia. Porém, deve-se ter em mente que nem todos os compostos resultantes deste tipo de estudo são de fato agentes alelopáticos, uma vez que tais substâncias podem não ser liberadas no

solo em concentrações ótimas ou sofrerem modificações químicas em condições naturais^{24,57}. Em alguns casos, o efeito alelopático pode estar relacionado ao sinergismo de dois ou mais compostos liberados pela planta doadora, o que pode dificultar o processo de isolamento e determinação dos compostos responsáveis pela atividade^{53,60}.

A escolha da espécie a ser utilizada para isolamento de um novo composto com potencial alelopático pode ser feita com base em conhecimentos em ecologia química, estudos etnobiológicos e observações de campo. A descoberta da sorgoleona é exemplo de estudos de interação planta-planta que levaram à descoberta de uma potente fitotoxina^{57,61}.

Ensaio de campo são de difícil execução e compreensão devido aos diversos parâmetros que podem influenciar a condução do experimento. Assim, os bioensaios laboratoriais (ensaio *in vitro*) permitem eliminar possíveis interferências através do controle e manipulação desses parâmetros. Os bioensaios têm como propósito (a) demonstrar o potencial alelopático dos extratos ou substâncias isoladas das plantas e (b) determinar a concentração ativa do composto. A germinação de sementes é um dos parâmetros amplamente utilizados para estudos desse tipo. Sabe-se, porém, que a germinação não é o único fenômeno que pode ser afetado nas interações alelopáticas. Outros fatores como o desenvolvimento das radículas e das plântulas podem ser monitorados nos ensaios *in vitro*. Alguns trabalhos indicam a análise de massa seca da radícula⁶², o comprimento e peso das raízes frescas como sendo estatisticamente mais precisos^{63,64}.

O isolamento guiado por bioensaios é útil para encontrar as frações ativas e os compostos responsáveis pela atividade de interesse. Tal estratégia muitas vezes leva à redescoberta de compostos já conhecidos. O uso da bioinformática pode eliminar a redescoberta de compostos com perfis de atividades já conhecidas e acelerar o processo de isolamento de novos

compostos. Porém, tal ferramenta deve ser utilizada com cautela, evitando que compostos muito similares às substâncias já conhecidas sejam ignorados durante esse processo⁵⁷.

1.5. Processamento de dados utilizando o *molecular networking* (MN) e *feature-based molecular networking* (FBMN)

A rede molecular (MN, *molecular networking*) como ferramenta para a análise de espectros de massas em tandem foi introduzida em 2012⁶⁵. Desde então, tal ferramenta vem facilitando significativamente a visualização, organização e derreplicação de milhares de espectros de MS² obtidos nas análises de uma amostra complexa. O processamento de dados parte da observação fundamental de que moléculas estruturalmente relacionadas compartilham padrões de fragmentação similares quando sujeitas aos métodos de fragmentação de MS², como é o caso da dissociação induzida por colisão (CID). Dessa forma, compostos estruturalmente relacionados tendem a se agrupar em uma rede formando um *cluster*⁶⁵⁻⁶⁷.

A *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS; <http://gnps.ucsd.edu>) é uma plataforma de armazenamento, análise e visualização de dados de espectrometria de massas. A infraestrutura do GNPS permite ainda a comparação dos dados com a biblioteca, derreplicação *online* da amostra e criação da rede molecular^{68,69}.

A rede molecular permite não só identificar compostos conhecidos através da utilização de padrões ou por comparação espectral com o banco de dados, mas também permite fazer uma anotação dos compostos análogos desconhecidos com maior eficiência⁶⁶. Vale lembrar que todas as anotações de compostos feitas através de comparações espectrais são anotações putativas até que sejam caracterizadas experimentalmente⁶⁵.

A anotação dos compostos feita pela plataforma do GNPS pode ser classificada como ouro, prata ou bronze de acordo com a qualidade do espectro de referência. A referência de classificação ouro pode ser submetida apenas por usuários aprovados na plataforma e os dados espectrais devem ser provenientes de compostos com caracterização completa, sejam eles compostos isolados ou sintéticos. Uma classificação prata significa que o espectro foi submetido com uma publicação associada. As referências remanescentes, como é o caso das anotações putativas ou parciais, incluem-se na classificação bronze^{65,68}.

Para a construção da rede molecular, inicialmente são obtidos os espectros de MS² das espécies ionizadas da amostra. Os dados são enviados para a plataforma do GNPS e submetidos a um alinhamento dos espectros de MS² para formar o conjunto de dados para cada espécie encontrada. Na etapa subsequente é feito um alinhamento espectral entre os agrupamentos, buscando encontrar similaridade entre os espectros de MS² de diferentes íons. Cada íon (molécula desprotonada no modo negativo ou protonada no modo positivo de ionização) é representado por nodos que se conectam devido à similaridade no padrão de fragmentação, formando a rede molecular⁶⁵. A FIGURA 1.5 (p. 22) apresenta um esquema do processo de criação da rede molecular para melhor entendimento.

Inicialmente a rede molecular (MN clássico) foi desenvolvida para utilização na proteômica. Baseada na premissa de que, em cromatografia líquida, peptídeos isobáricos raramente eluem em tempos de retenção (tr) diferentes, o algoritmo do *MS-Cluster* implementado na plataforma GNPS não leva em consideração a informação sobre tempo de retenção para o agrupamento de MS². Porém, na metabolômica a separação dos isômeros durante sua eluição na coluna cromatográfica é bastante comum. Por esse motivo, quando os dados das análises de pequenas moléculas são processados via rede molecular clássica,

um grupo de isômeros inevitavelmente formarão um mesmo nodo, mesmo possuindo tempos de retenção diferentes⁶⁶ (FIGURA 1.6, p. 23).

Diante desse problema foi desenvolvido o método de *feature-based molecular networking* (FBMN) para a criação da rede molecular. FBMN nada mais é do que um MN “aprimorado”. No método de FBMN é incorporada uma etapa adicional de pré-processamento dos dados adquiridos via LC-MS/MS que consiste em diferenciar isômeros com tempos de retenção distintos. Durante o pré-processamento, cada banda cromatográfica passa por uma deconvolução levando em consideração a abundância do sinal de MS¹^{65,70}. Dessa forma, o processamento de dados por FBMN consiste em duas etapas principais: (1) detecção e alinhamento de dados com base na abundância de MS¹ em um *software* de pré-processamento (ex. *MZmine*, *MS-Dial*, *XCMS*, *OpenMS*, *Progenesis QI* ou *MetaboScape*) e (2) alinhamento dos dados espectrais de MS² para a criação da rede molecular na plataforma do GNPS⁷⁰ (FIGURA 1.6, p. 23).

A construção de uma rede molecular é fortemente influenciada pela qualidade dos dados de MS² adquiridos. Por isso, as condições experimentais das análises no espectrômetro de massas devem estar devidamente otimizadas para a obtenção de uma rede molecular significativa e representativa da amostra. Os parâmetros instrumentais importantes que requerem atenção são: janela de detecção de MS¹ e MS², resolução de massa e energia de colisão. Vale ressaltar que o espectrômetro de massas deve ser devidamente calibrado antes da obtenção dos dados^{65,67}.

FIGURA 1.5 - Representação esquemática do processo de criação da rede molecular através do MN Clássico. Adaptado de ARON, A. T.; et al. (2020)⁶⁵

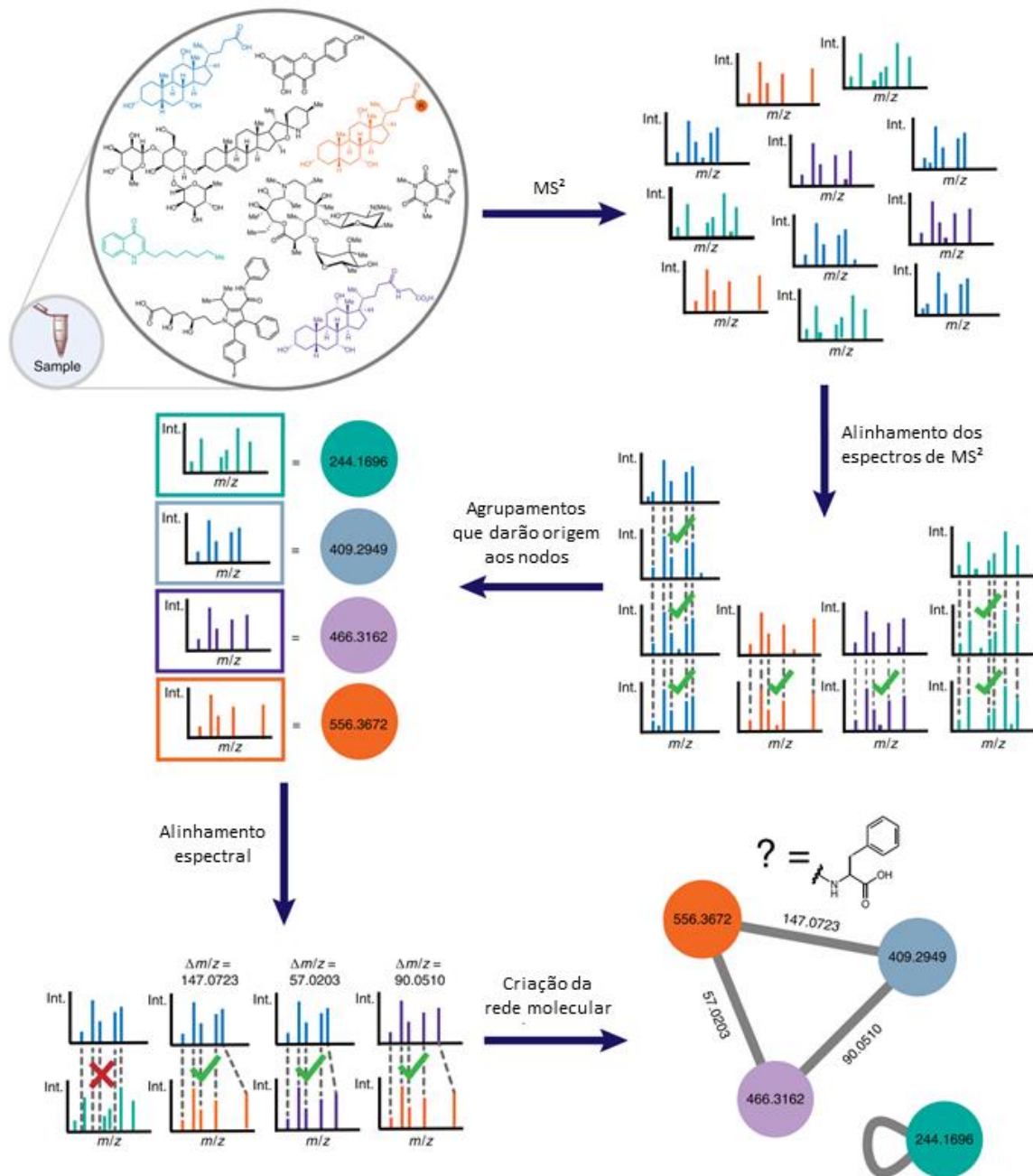
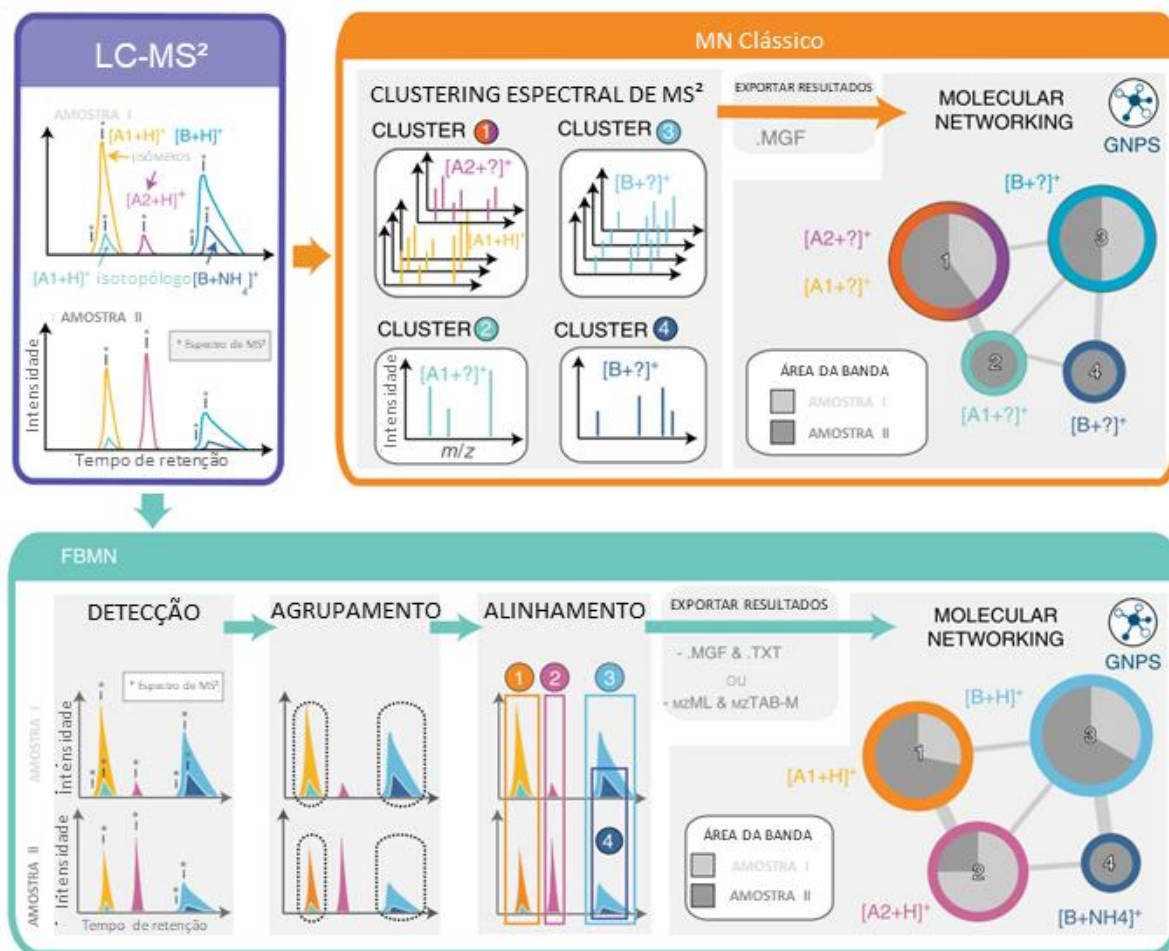


FIGURA 1.6 - Métodos para a construção da rede molecular a partir de dados de espectrometria de massas *non-target* utilizando a plataforma do GNPS. Adaptado de Nothias, L. F.; et al. (2020)⁷⁰



2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial alelopático dos extratos dos diferentes tecidos da aroeira-preta *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão no desenvolvimento *in vitro* das sementes de braquiárias *Urochloa decumbens* Stapf e *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf bem como analisar a composição química dos extratos utilizando processamento de dados por FBMN.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial alelopático dos extratos brutos de *Myracrodruon urundeuva* e suas respectivas frações no desenvolvimento das gramíneas *Urochloa decumbens* e *U. brizantha*;
- Analisar o perfil químico dos diferentes extratos de *M. urundeuva*;
- Analisar as diferenças de composição química das frações ativas;
- Associar o efeito alelopático observado à composição dos extratos e frações.

3. Materiais

3.1. Solventes

- Solventes destilados: metanol, acetona, acetato de etila, etanol, diclorometano, clorofórmio, hexano;
- Solventes grau HPLC (Merck, Tedia, Panreac): metanol, acetonitrila e isopropanol;
- Solventes grau LC/MS (LiChrosolv LC-MS Grade): metanol, acetonitrila, isopropanol, água;
- Água ultrapura obtida em Ultra purificador Master System MS 2000 (Gehaka)[®].

3.2. Colunas

- Coluna analítica Phenomenex – Gemini[®] C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5,0 μm);
- Coluna analítica Phenomenex – Gemini[®] C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5,0 μm);
- Coluna analítica Zorbax[®] Eclipse Plus C₁₈ Rapid Resolution HD (50 x 2,1 mm; 1,8 μm).

3.3. Filtros

- Papel de filtro qualitativo 80 g e diâmetro 18,5cm, Unifil[®];
- Filtro de seringa PVDF com tamanho de poro 0,20 μm.

3.4. Cartuchos para extração em fase sólida (SPE)

- Cartucho SPE Purifica-X[®] com volume interno de 6 mL, 100 mg de resina C₁₈, tamanho de partícula 25-53 μm e capacidade de carga de 25-100 mg;

- Cartucho SPE C₁₈ Supelclean[®], Supelco, com volume interno de 60 mL, 10 g de resina C₁₈, tamanho de partícula 45 µm e capacidade de carga de 0,5-1 g.

3.5. Micropipetas

- Micropipeta automática Eppendorf[®] 500-5000 µL;
- Micropipeta automática Axygen[®] 50-100 µL;
- Micropipeta automática Axygen[®] 100-500 µL.

3.6. Papel de germinação

- Papel filtro qualitativo para substrato mata borrão 10,5 x 10,5 cm, J. Prolab.

3.7. Equipamentos

3.7.1. Evaporadores rotativos

- Evaporadores rotativos BUCHI[®] R-200 e BUCHI[®] R-205 com banho de aquecimento BUCHI[®] B-490, bomba de vácuo Vacuubrand[®] MZ 2C NT e refrigerador de recirculação Neslab[®] CFT-25;

3.7.2. Balanças analíticas

- Balança analítica Shimadzu[®] modelo AY220 (e = 1mg / d = 0,1 mg);
- Balança semi-analítica Ohaus[®] Adventure Pro modelo AV8101P (e = 1 g / d = 0,1 g);
- Balança analítica Shimadzu[®] modelo AUX220 (e = 1mg / d = 0,1mg).

3.7.3. Cromatógrafos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector PDA: Shimadzu[®] Corporation modelo LC-20AR Prominence[®], equipado com degaseificador DGU-20A5R, bomba quaternária LC-20AR Prominence[®], módulo de comunicação CBM-20A, amostrador automático SIL-10AF e coletor de frações FRC-10A, e detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de UV: Agilent Technologies[®] modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e forno de coluna G1316A, acoplado a detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B;
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector QTOF: Agilent Technologies[®] modelo 1260 Infinity[®] II equipado com bomba quaternária G7104A, amostrador automático G7167B, termostato de amostra G7167-60101 e forno de coluna G7116B, acoplado a espectrômetro de massas QTOF G6545B.

3.7.4. Câmara de germinação

- Câmara de germinação Conviron[®] modelo G1000, equipada com controlador CMP6010, sistema de refrigeração R-134a e compressor R.L.A. 6.7A.

3.7.5. Liofilizador

- Liofilizador de bancada Liobrás[®] modelo Liotop[®] L 108.

3.7.6. Ultrassom

- Banho ultrassônico Ultrasonic[®] cleaner TDR FORCE;

- Banho ultrassônico Thornton® modelo T50.

3.8. Material vegetal

3.8.1. *Myracrodruon urundeuva* – amostra coletada

Os ramos e folhas da aroeira-preta foram coletados na Fazenda Nova Serrana (FIGURA 3.1) no município de São João da Ponte – MG (15°49'07.32''S e 43°52'18.23''W).

FIGURA 3.1 - Imagem de satélite da Fazenda Nova Serrana. Em amarelo a posição exata da localização da aroeira-preta coletada.



3.8.2. *Myracrodruon urundeuva* – amostra cultivada

Foram adquiridas 20 mudas da aroeira-preta no estabelecimento Verde Flora e mantidas em casa de vegetação até o momento do preparo dos extratos (FIGURA 3.2). As mudas cultivadas apresentaram cerca de 1,50 m de altura.

FIGURA 3.2 – Mudas cultivadas da aroeira-preta utilizadas na obtenção das amostras dos caules (ACA), folhas (AFL) e raízes (ARZ).



3.8.3. Acesso ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado

As amostras de aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva*) utilizadas nesse estudo fazem parte do projeto guarda-chuva denominado “Caracterização química micromolecular de espécies naturais potencialmente ativas no controle de pragas da agropecuária e com propriedades nutraceuticas” e foram cadastradas junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen em 17/09/2018, no. AFE8151, finalidade da autorização: pesquisa científica.

3.8.4. Sementes utilizadas nos ensaios biológicos

- *Urochloa brizantha* cv. Marandu, safra 2020, 100 sementes \approx 1,0 g, obtido do banco de germoplasma da Embrapa;
- *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, pureza 90%, Tz 85%, germinação 60% SGM Seeds Unipasto®;
- Sementes de alface (*Lactuca sativa*) var. americana, 1105 sementes \approx 1,0 g, Grandes Lagos Americana (código 043), lote: 135574-021-S2, germinação: 98%, pureza: 99,8%, validade: 08/22, safra: 2017. Isla Sementes Ltda (Porto Alegre – RS).

4. Metodologia

A metodologia foi dividida em três partes principais: (1) preparo dos extratos e análises iniciais; (2) avaliação do efeito alelopático dos extratos da aroeira-preta sob as espécies *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* e (3) análise de metabólitos secundários.

4.1. Preparo dos extratos e análises iniciais

A primeira parte do trabalho é composta por três etapas: (a) preparo dos extratos da aroeira-preta; (b) análise do perfil cromatográfico dos extratos por LC-PDA e (c) fracionamento por extração em fase sólida

4.1.1. Preparo dos extratos da aroeira-preta

O material vegetal de *Myracrodruon urundeuva* foi separado em ramos e folhas para o material coletado e em caules, folhas e raízes para o material cultivado. Entende-se como “caules” todo material remanescente após remoção das folhas e das raízes da planta. As amostras das raízes foram lavadas com água corrente em abundância e secas com papel toalha.

Os ramos, folhas e caules foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 50 °C. As raízes foram cortadas em pedaços menores, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 101 horas à temperatura de -65 °C e pressão de 20 µHg.

Após a secagem do material, as folhas foram moídas em moinho analítico; os ramos, caules e as raízes foram moídos em um liquidificador industrial. A FIGURA 4.1 representa as etapas de separação, moagem e extração do material vegetal cultivado.

FIGURA 4.1 - Etapas do preparo da amostra vegetal cultivada para o preparo de extratos.



Os materiais vegetais moídos foram extraídos por maceração estática a frio com uma mistura de acetona:metanol na proporção 1:1 v/v. A cada três dias, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro. Foram realizadas três extrações consecutivas para cada matriz utilizando a mesma mistura de solventes. As soluções resultantes de cada extração foram evaporadas em evaporador rotativo e transferidas para um frasco de vidro previamente pesado e etiquetado. Ao final obteve-se um total de cinco extratos brutos (TABELA 4.1). Os extratos foram armazenados tampados e mantidos sob refrigeração em geladeira.

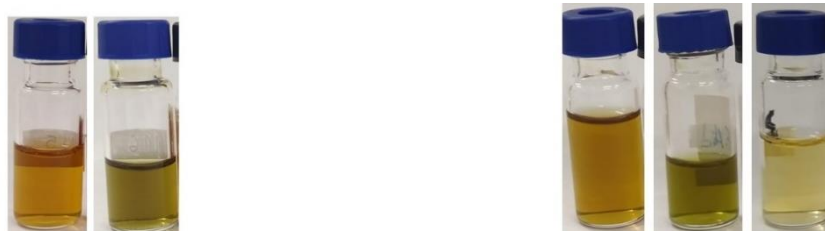
TABELA 4.1 - Código dos extratos obtidos e suas respectivas descrições

Código	Matriz	Coletada ou cultivada
ARM	Ramos	Coletada
AFO	Folhas	Coletada
ACA	Caulos	Cultivada
AFL	Folhas	Cultivada
ARZ	Raízes	Cultivada

4.1.2. Análise do perfil químico dos extratos da aroeira-preta por LC-PDA

Cada extrato ARM, AFO, ACA, AFL e ARZ (FIGURA 4.2) foi analisado em um cromatógrafo LC-20AR Prominence® Shimadzu® com detector PDA de modo a investigar o perfil cromatográfico da amostra.

FIGURA 4.2 - *Vials* contendo os extratos brutos diluídos, submetidos à análise preliminar do perfil químico. Da esquerda para direita: ARM, AFO, ACA, AFL e ARZ.



O modo reverso de eluição foi escolhido utilizando solvente (A) H₂O + 0,1% ácido fórmico v/v e (B) acetonitrila + 0,1% ácido fórmico v/v. A separação foi feita em eluição gradiente de 5% a 100% de B em 45 min., seguido de 5 minutos em eluição isocrática com 100% de B para limpeza e 10 min. no modo isocrático com 5% de B para acondicionamento da coluna (TABELA 4.2); fluxo de 0,700 mL/min., volume de injeção de 15 µL e concentração das amostras de 10 mg/mL. As amostras foram filtradas em um filtro de seringa PVDF 0,20 µm antes da injeção. Utilizou-se o mesmo gradiente para a análise inicial dos cinco extratos. A coluna utilizada para essa separação foi a Phenomenex – Gemini® C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm).

TABELA 4.2 - Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico dos extratos.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
45,00	0	100
50,00	0	100
50,01	95	5
60,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Solvente B = acetonitrila + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Os dados de LC-PDA foram obtidos utilizando o software *Lab Solution Shimadzu*[®].

4.1.3. Fracionamento por extração em fase sólida (SPE)

Para os extratos ACA, AFL e ARZ foram feitos fracionamentos para obtenção de frações menos complexas, com o intuito de melhorar a detecção dos compostos presentes nas análises posteriores por LC-MS/MS. O fracionamento foi realizado aplicando cerca de 1g de extrato bruto em cartucho de extração em fase sólida (SPE) C₁₈ Supelclean[®] (Supelco[®]), com volume interno de 60 mL e capacidade de carga de 0,5-1 g (FIGURA 4.3).

FIGURA 4.3 - Sistema de extração em fase sólida e as frações coletadas no fracionamento do extrato das folhas da aroeira-preta cultivada (AFL).



Antes da aplicação da amostra, foi feita a limpeza e ativação do cartucho SPE eluindo-se 40 mL de acetonitrila. O acondicionamento foi feito utilizando 80 mL da mistura de solventes da primeira fração a ser coletada (5% ou 10% de ACN + 0,1% ácido fórmico v/v a depender do extrato). Para a aplicação da amostra, cerca de 1 g do extrato foi dissolvido em 40mL da mistura de solventes da primeira fase móvel. A escolha das fases móveis utilizadas na eluição foi feita com base nas informações obtidas no cromatograma exploratório de cada extrato bruto e estão descritas na TABELA 4.3. Após a coleta das frações, foi feita a limpeza do cartucho utilizando 80 mL de uma mistura de MeOH:DCM 1:1 v/v.

TABELA 4.3 - Fases móveis utilizadas no fracionamento dos extratos brutos ACA, AFL e ARZ em cartuchos de SPE. As fases móveis foram escolhidas levando em consideração os cromatogramas exploratórios para cada extratos.

Frações coletadas	Fase móvel para eluição		
	ACA	AFL	ARZ
F0	5% B	10% B	10% B
F1	17% B	20% B	20% B
F2	28% B	30% B	45% B
F3	100% B	45% B	100% B
F4	-----	100% B	-----

B = ACN + 0,1% de ácido fórmico (v/v)

Para cada fração coletada foi utilizado 40 mL do eluente descrito.

Após o fracionamento, cada fração foi analisada utilizando o gradiente de eluição descrito na TABELA 4.2 em um sistema de LC-UV (Agilent® 1200), coluna Phenomenex – Gemini® C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm), λ = 250 nm para avaliar a eficiência de cada fracionamento.

Os dados de LC-UV foram obtidos utilizando o software *OpenLAB Control*.

4.2. Investigação do efeito alelopático de *Myracrodruon*

urundeuva sob as espécies *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens*.

Para a investigação do efeito alelopático de *Myracrodruon urundeuva*, os extratos brutos preparados (secção 4.1.1) foram submetidos aos ensaios biológicos *in vitro* frente às sementes de três espécies diferentes: *Urochloa brizantha*, *U. decumbens* e *Lactuca sativa*. Posteriormente, os extratos brutos remanescentes foram fracionados por filtração *flash* e novamente submetidos ao ensaio biológico *in vitro* a fim de se determinar as frações ativas.

4.2.1. Fracionamento do extrato bruto por filtração *flash*

Os extratos brutos ARM, AFO, ACA e ARZ foram fracionados por cromatografia *flash* para obtenção das frações utilizadas nos ensaios biológicos

in vitro. Foi preparado um leito de sílica gel 60 mesh (63-200 μm) em um funil de placa sinterizada de 11,5 cm de diâmetro. Após aplicação da amostra, a eluição foi realizada com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, metanol e água para as amostras ARM e AFO e hexano, acetato de etila, metanol e água para as amostras ACA e ARZ. As frações resultantes desse fracionamento foram evaporadas para obtenção das frações concentradas. As frações acetato de etila e metanol foram submetidas ao ensaio biológico conforme descrito na seção 4.2.2. A massa dos extratos brutos utilizados e a proporção de sílica utilizada para o fracionamento estão descritas na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 – Condições utilizadas no fracionamento por filtração *flash* dos extratos brutos.

Amostra	Massa da amostra (g)	Proporção de sílica	Altura do leito (cm)
ARM	20,6	1:15	5,0
AFO	22,6	1:15	5,0
ACA	5,34	1:40	4,0
ARZ	25,74	1:15	7,8

4.2.2. Ensaio biológico

Para os bioensaios de alelopatia com os extratos e as frações da aroeira-preta foram realizados testes de germinação das sementes e desenvolvimento da plântula acompanhando o crescimento da radícula e do hipocótilo com base no protocolo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁷¹. Foram preparadas soluções diluídas dos extratos brutos e soluções diluídas das suas respectivas frações para os testes: 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL para os extratos ARM e AFO e soluções de 100mg/mL para suas respectivas frações; e soluções de 100, 50 e 25 mg/mL para os extratos ACA e ARZ e suas respectivas frações. O solvente utilizado no preparo de cada solução teste está descrito na TABELA 4.5. Acetona, metanol e a mistura MeOH:CHCl₃ (75:25 v/v) foram utilizados como controle negativo e água como branco.

A unidade experimental utilizada nos ensaios biológicos consistiu de uma caixa gerbox de acrílico transparente com tampa (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo dois papéis mata-borrão (10,5 x 10,5 cm), ambos previamente esterilizados. As caixas e tampas foram esterilizadas com etanol 70% e os papéis mata-borrão foram envoltos em um papel alumínio e autoclavados a 120 °C durante 40 minutos. Após a esterilização, aplicou-se 3,0 mL da solução a ser testada (TABELA 4.5) sobre as folhas de papel mata-borrão que foram mantidas abertas e cobertas por papel pardo durante 12 horas para evaporação do solvente à temperatura ambiente.

TABELA 4.5 – Amostras preparadas para os testes de germinação das sementes das braquiárias e desenvolvimento das plântulas.

Matriz	Amostra	Concentrações testadas (mg/mL)	Solvente*
Ramos coletados (ARM)	Extrato bruto	100; 50; 25; 12,5 e 6,25	Metanol:clorofórmio
	Fração DCM	100	Acetona
	Fração MeOH	100	Metanol:clorofórmio
Folhas coletadas (AFO)	Extrato bruto	100; 50; 25; 12,5 e 6,25	Acetona
	Fração DCM	100	Acetona
	Fração MeOH	100	Metanol:clorofórmio
Caules cultivados (ACA)	Extrato bruto	100; 50 e 25	Metanol
	Fração AcOEt	100; 50 e 25	Metanol
	Fração MeOH	100; 50 e 25	Metanol
Raízes cultivadas (ARZ)	Extrato bruto	100; 50 e 25	Metanol
	Fração AcOEt	100; 50 e 25	Metanol:clorofórmio
	Fração MeOH	100; 50 e 25	Metanol

*Solventes utilizados na solubilização e diluição dos extratos brutos e frações.

Após a evaporação do solvente, aplicou-se 15 mL de água deionizada em cada gerbox contendo os papéis de germinação previamente tratados com as soluções dos extratos e foram distribuídas 50 sementes em cada unidade experimental. As sementes utilizadas foram: *Lactuca sativa*, *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens*. Os gerbox foram tampados e levados para a câmara de germinação por um período de 7 dias para *L. sativa* e 14 dias para as espécies *U. brizantha* e *U. decumbens*. O experimento foi conduzido em condições controladas de temperatura (35 °C na luz e 20 °C no escuro), umidade relativa (90-100%) e foto período (8L:16D h).

Os papéis de germinação foram umedecidos diariamente com água deionizada e as posições dos gerbox, dentro da câmara de germinação, foram alternadas a fim de se obter uma incidência de luz de forma homogênea.

No quarto dia de incubação das sementes, foi feita a primeira avaliação da germinação dos tratamentos com alface. No sétimo dia de incubação, os tratamentos contendo alface foram avaliados quanto à germinação (%) e comprimento (mm) da radícula e hipocótilo. Para os tratamentos com as braquiárias, a germinação foi avaliada a partir do quarto dia de incubação. No décimo quarto dia de incubação, os tratamentos com as braquiárias foram avaliados quanto à germinação (%) e o crescimento (mm) da radícula e hipocótilo. Durante a contagem das sementes germinadas e avaliação do crescimento das plântulas, os gerbox permaneceram expostos à luz artificial do laboratório.

Para a avaliação do crescimento da radícula e hipocótilo, para cada unidade experimental, foi calculada a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo utilizando 10 plântulas escolhidas aleatoriamente. Para os tratamentos com um número de sementes germinadas inferior que 10, foram utilizadas todas as sementes germinadas, tanto na medição do comprimento da radícula e hipocótilo, quanto para o cálculo das médias.

Ao final dos ensaios biológicos, os dados de taxa de germinação, crescimento do hipocótilo e da radícula foram submetidos à análise de variância e as médias das variáveis dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) com base no procedimento PROC-GLM (SAS, 2010).

4.3. Análise dos metabólitos secundários e sua distribuição nos tecidos da planta

A análise do perfil metabolômico da aroeira-preta foi realizada através da ferramenta do GNPS. Para isso, a terceira parte da metodologia foi

dividida em duas etapas: (a) aquisição de dados via LC-MS/MS e (b) pré-processamento dos dados e construção da rede molecular.

4.3.1. Aquisição de dados de MS² por UHPLC-ESI-QTOF

Os extratos brutos foram submetidos a um pré-tratamento em um cartucho de extração em fase sólida Purifica-X[®] com volume interno de 6,0 mL, 100 mg de resina C₁₈, tamanho de partícula 25-53µm e capacidade de carga de 25-100 mg. Após ativação e acondicionamento do cartucho com 8,0 mL de acetonitrila, aplicou-se aproximadamente 100 mg do extrato bruto dissolvido em 4,0 mL de acetonitrila. Após a eluição da amostra no cartucho, o solvente da amostra resultante foi evaporado em um evaporador rotativo. Esse procedimento foi repetido para os cinco extratos brutos: ARM, AFO, ACA, AFL e ARZ.

Para análise da composição química dos extratos brutos no sistema UHPLC-ESI-QTOF, foram preparadas soluções de 0,1 mg/mL utilizando os extratos brutos submetidos ao tratamento em SPE e as frações obtidas no fracionamento descrito na secção 4.1.3. Ao todo foram obtidas 17 amostras: ARM, AFO, ACA, ACA F0, ACA F1, AFL F2, ACA F3, AFL, AFL F1, AFL F2, AFL F3, AFL F4, ARZ, ARZ F0, AFL F1, AFL F2 e AFL F3.

As amostras preparadas foram analisadas em cromatógrafo líquido de ultra-eficiência Agilent[®] 1290 Infinity[®] II acoplado a espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização *Electrospray* (ESI) e analisador quadrupolo por tempo-de-voo, QTOF Agilent[®] G6545B. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Zorbax Eclipse[®] Plus C₁₈ Rapid Resolution HD (2,1 x 50 mm; 1,8 µm), Agilent.

As análises foram realizadas no modo reverso de eluição utilizando solvente A (água + 0,1% de ácido fórmico v/v) e solvente B (acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico v/v). A separação foi feita no modo gradiente de 5% a 100% de B de 0 a 17 min., mantido em 100% de B até 20 min. e retornando à condição

inicial de 5% de B, que foi mantida até 25 min. para recondicionamento da coluna (TABELA 4.6); fluxo de 0,300 mL/min., volume de injeção de 3,0 µL e temperatura da coluna 30 °C.

TABELA 4.6 - Gradiente exploratório utilizado para análise no sistema UHPLC-ESI-QTOF.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
17,00	0	100
20,00	0	100
20,50	95	5
25,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Solvente B = acetonitrila + 0,1% ácido fórmico (v/v)

A análise cromatográfica foi realizada seis vezes para cada amostra, permitindo a aquisição de dados de espectros de massas nos modos positivo e negativo de ionização, em três níveis de energias de fragmentação (alto, médio e baixo) para cada modo.

A detecção no espectrômetro de massas foi feita nos modos positivo e negativo utilizando o método de aquisição autoMS/MS. Os íons foram monitorados no intervalo de m/z 150 a m/z 1500 para o MS¹ e m/z 70 a m/z 1500 para MS². Os parâmetros utilizados na ionização foram: temperatura do gás de secagem de 320 °C, fluxo de gás de secagem 12 L/min., nebulizador 35 psi, temperatura do *sheath gas* 300 °C e fluxo do *sheath gas* de 10 L/min. Parâmetros da fonte: voltagem do capilar 3000 V, voltagem do *nozzle* 1500 V e a energia da câmara de dissociação de 20 a 60 eV, de acordo com a massa do íon precursor (TABELA 4.7).

Os dados obtidos nos modos positivo e negativo, em alta energia de fragmentação, foram utilizados para a construção da rede molecular do tipo *feature-based molecular networking* (FBMN) e anotação dos compostos. Cada íon anotado durante a análise da rede molecular foi verificado cuidadosamente

utilizando os perfis de fragmentação obtidos nas três energias de fragmentação (alta, média e baixa).

Os dados de LC-MS/MS foram obtidos pelo *software Mass Hunter Acquisition*[®] B.08.00 e analisados no *software MassHunter Qualitative Navigator*[®] B.08.00 Agilent[®] Technologies.

TABELA 4.7 - Energia de colisão utilizada na câmara de dissociação para a formação das fragmentações

Alta energia		Média energia		Baixa energia	
Massa	Energia (eV)	Massa	Energia (eV)	Massa	Energia (eV)
150	20	150	10	150	5
500	30	500	15	500	10
1000	50	1000	30	1000	20
1500	60	1500	50	1500	40

O mesmo procedimento foi repetido para a aquisição dos dados de LC-MS/MS para as amostras obtidas por filtração *flash* (seção 4.2.1), a fim de analisar a distribuição dos metabólitos secundários nas frações ativas.

4.3.2. Pré-processamento dos dados por *MSDial*, anotação dos compostos por *MSFinder* e construção da rede molecular por FBMN

O processamento de dados para a construção da rede molecular do tipo *feature-based molecular networking* (FBMN) foi feito a partir dos dados adquiridos em alta energia de colisão, nos modos negativo e positivo.

Os dados adquiridos durante as análises via UHPLC-ESI-QTOF, com alta energia de colisão (seção 4.3.1), foram originalmente obtidos na extensão “.d”. Os arquivos foram convertidos para o formato “.mzML” no programa *MSConvertGUI* (disponível em: <http://proteowizard.sourceforge.net/download.html>) utilizando o filtro *Peak Picking* e níveis de MS1-2.

Após conversão dos dados brutos, os arquivos em formato “.mzML” foram pré-processados no programa *MSDial* versão 4.24 (disponível em <http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>). Os dados foram convertidos para centroide tanto para os íons precursores (MS^1) quanto para os íons fragmentos (MS^2). A tolerância de massa escolhida foi de 0,02 Da para MS^1 e 0,06 Da para MS^2 . A intensidade mínima para detecção foi ajustada para 10000 de amplitude e a amplitude da abundância de *cutoff* do MS/MS para 30. Os parâmetros de alinhamento foram ajustados para 0,5 minutos de tolerância em relação ao tempo de retenção e 0,02 Da de tolerância para o MS^1 .

As informações de alinhamento dos espectros obtidos no *software MSDial* foram extraídos no formato “.msp” para posterior processamento no *MSFinder* filtrando-se apenas os íons com MS^2 adquiridos.

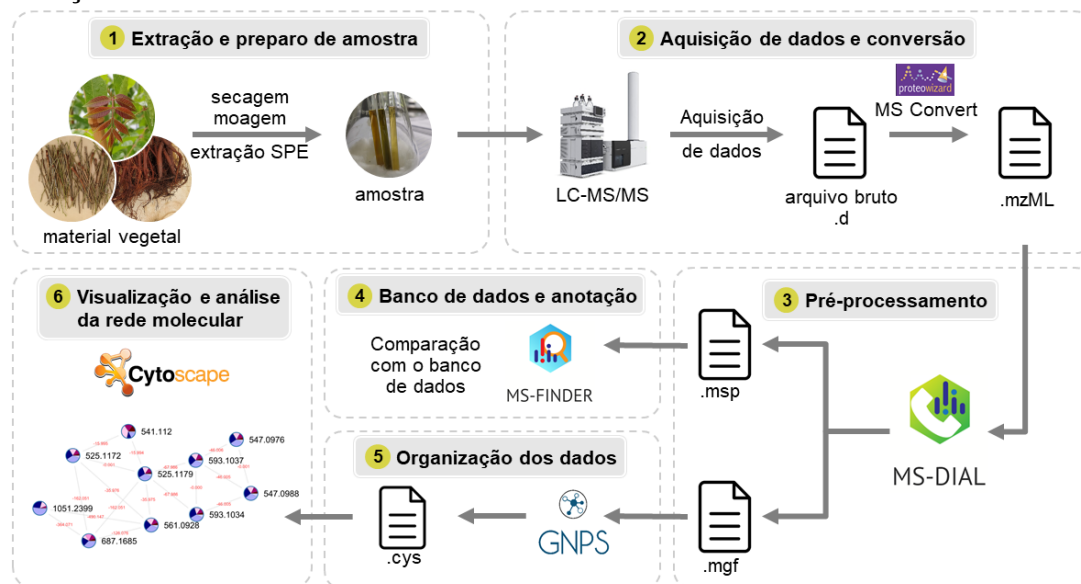
As anotações dos íons foram feitas no programa *MSFinder* versão 3.44 (disponível em <http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>). A tolerância de massa foi ajustada para 5 ppm para MS^1 e 15 ppm para MS^2 . Os bancos de dados selecionados para a busca foram: *LipidMAPS*, *DrugBank*, *FooDB*, *PlantCyc*, *ChEBI*, *T3DB*, *STOFF*, *KNAPSAcK*, *NANPDB*, *PubChem* e *UNPD*.

Para submeter os dados na plataforma GNPS para a montagem da rede molecular (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>), os dados alinhados no programa *MSDial* foram exportados no formato “.mgf” utilizando os filtros “MS/MS included matrix” e “GNPS export”.

Os parâmetros para a criação da rede molecular foram ajustados para tolerância de massa de 0,02 Da para o íon precursor e 0,06 Da para o íon fragmento; mínimo de pares cossenos de 0,7 e 4 para fragmentos semelhantes. A rede molecular gerada foi importada e analisada no *software* Cytoscape® versão 3.8.1.

O resumo das etapas, desde o preparo dos extratos até a construção da rede molecular, está representado na FIGURA 4.4.

FIGURA 4.4 - Fluxograma das etapas de (1) preparo de amostra, (2) aquisição de dados por LC-MS/MS, (3) pré-processamento, (4 e 5) processamento dos dados e (6) construção da rede molecular



Ao todo, foram criadas três redes moleculares, sendo: (1) uma rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização em alta energia, (2) uma rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização em alta energia e (3) uma rede molecular criada utilizando apenas os dados dos extratos brutos e brancos da amostra adquiridos no modo negativo de ionização em alta energia. As redes moleculares 1 e 2 foram utilizadas para anotação dos compostos, enquanto que a rede molecular 3 foi utilizada para análise da distribuição dos metabólitos secundários pelos tecidos da planta.

Adicionalmente, os dados de LC-MS/MS adquiridos para as frações ativas foram processadas no *MS-Dial*, utilizando os mesmos parâmetros já descritos, para a comparação da distribuição dos metabólitos secundários entre as frações ativas.

5. Resultados e Discussões

5.1. Avaliação do efeito alelopático dos extratos da aroeira-preta

Os experimentos para avaliação do potencial alelopático foram conduzidos em duas etapas: (1) ensaios com os extratos brutos e as frações das amostras coletadas (ARM e AFO) e (2) ensaios com os extratos brutos das amostras cultivadas (ACA e ARZ) e suas respectivas frações.

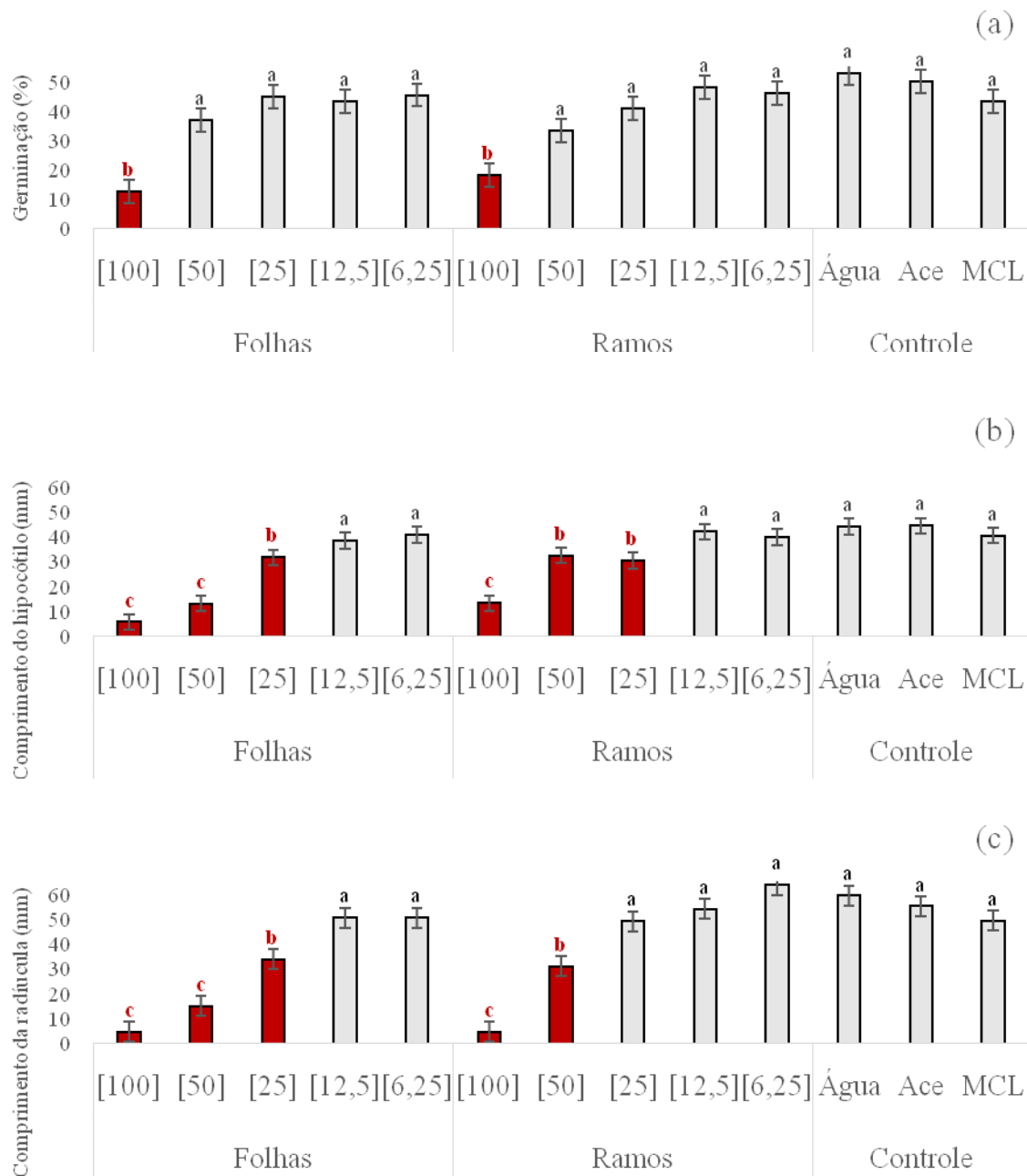
5.1.1. Ensaio com as amostras coletadas (ARM, AFO) e subfrações

Os extratos das folhas e ramos coletados (AFO e ARM) foram avaliados nos ensaios biológicos *in vitro* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL. Os extratos brutos remanescentes foram fracionados por cromatografia *flash* como descrito na seção 4.2.1 e as frações diclorometano e metanol das amostras ARM e AFO foram submetidas a novos ensaios biológicos. Os resultados desta seção estão apresentados na forma de gráfico e os valores de cada ensaio biológico utilizados na elaboração dos gráficos estão descritos nas TABELAS A1 a A10 do Apêndice.

a) Ensaios com a braquiária *Urochloa brizantha*

A partir dos resultados obtidos durante os testes com *Urochloa brizantha* (FIGURA 5.1), observou-se uma inibição na taxa de germinação dessa espécie quando tratadas com soluções dos extratos das folhas e ramos na concentração de 100 mg/mL (FIGURA 5.1.a). Além da influência negativa sobre a germinação das sementes de *U. brizantha*, os extratos das folhas e dos ramos também apresentaram inibição significativa no desenvolvimento do hipocótilo nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL (FIGURA 5.1.b) e no desenvolvimento da radícula nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL para o extrato das folhas e 100 e 50 mg/mL para o extrato dos ramos (FIGURA 5.1.c).

FIGURA 5.1 - Influência dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa brizantha* após 14 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes [100], [50], [25], [12,5] e [6,25] indicam as concentrações em mg/mL testadas.

**A água foi utilizada como branco e a acetona (ACE) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

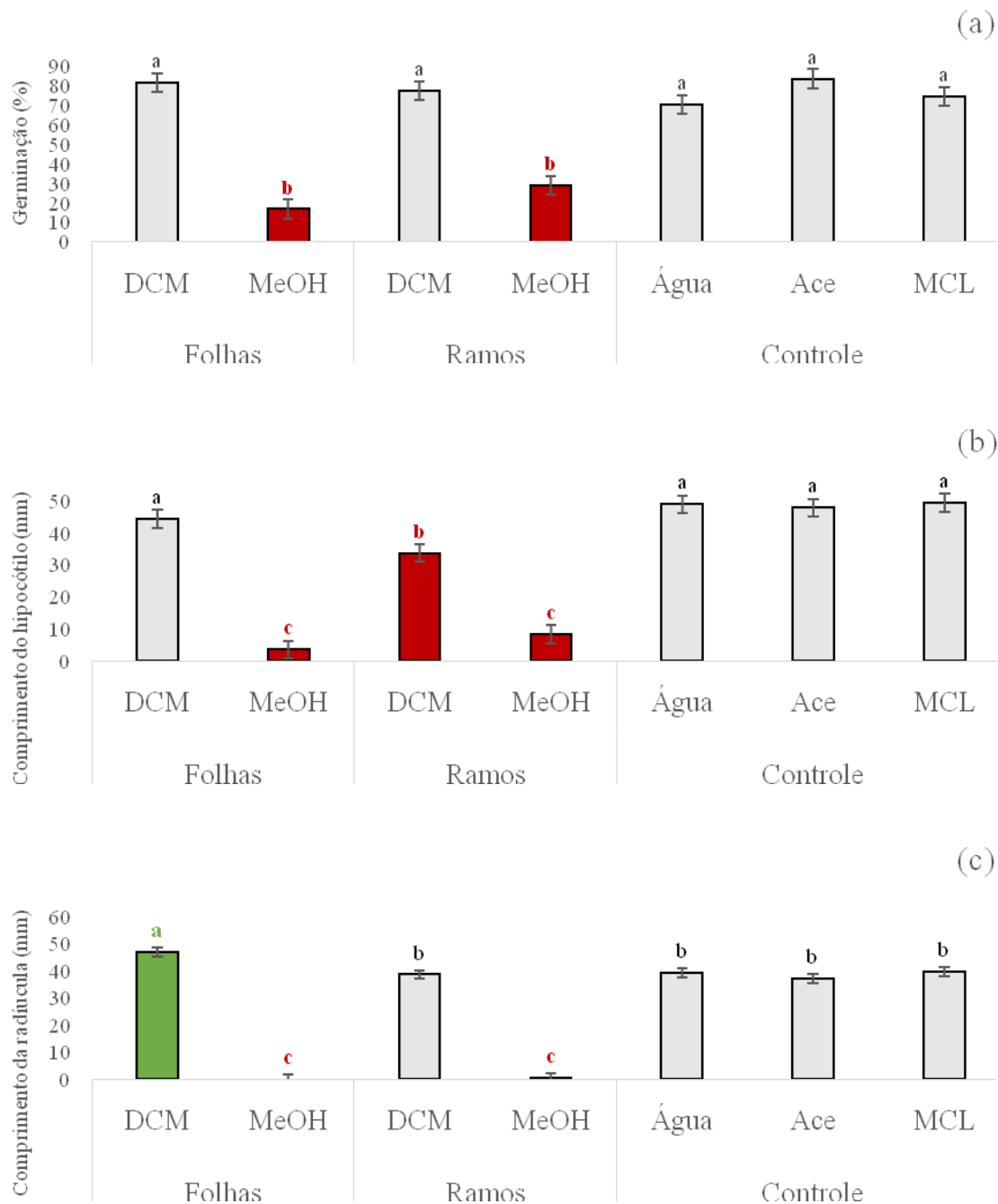
***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os resultados que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

Ambos os extratos brutos das folhas e ramos apresentaram atividade inibitória a 100 mg/mL para os três parâmetros analisados. Após o fracionamento desses extratos, a atividade inibitória concentrou-se principalmente nas frações metanólicas como observado na FIGURA 5.2.

A inibição da germinação foi observada apenas na fração metanólica das folhas e dos ramos (FIGURA 5.2.a). O comprimento do hipocótilo foi influenciado com maior intensidade pela fração metanólica das folhas e ramos e em menor intensidade pela fração diclorometano dos ramos (FIGURA 5.2.b). O crescimento da radícula foi significativamente inibido pela fração metanólica das folhas e ramos, enquanto que a fração diclorometano das folhas apresentou um efeito estimulante no crescimento da radícula (FIGURA 5.2.c). Todas as frações foram avaliadas apenas na concentração de 100 mg/mL devido à falta de material suficiente para o preparo das frações nas demais concentrações.

FIGURA 5.2 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva* a 100 mg/mL na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa brizantha* após 14 dias de incubação das sementes.



*A água foi utilizada como branco e a acetona (ACE) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

**Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles e em verde estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito estimulante.

****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

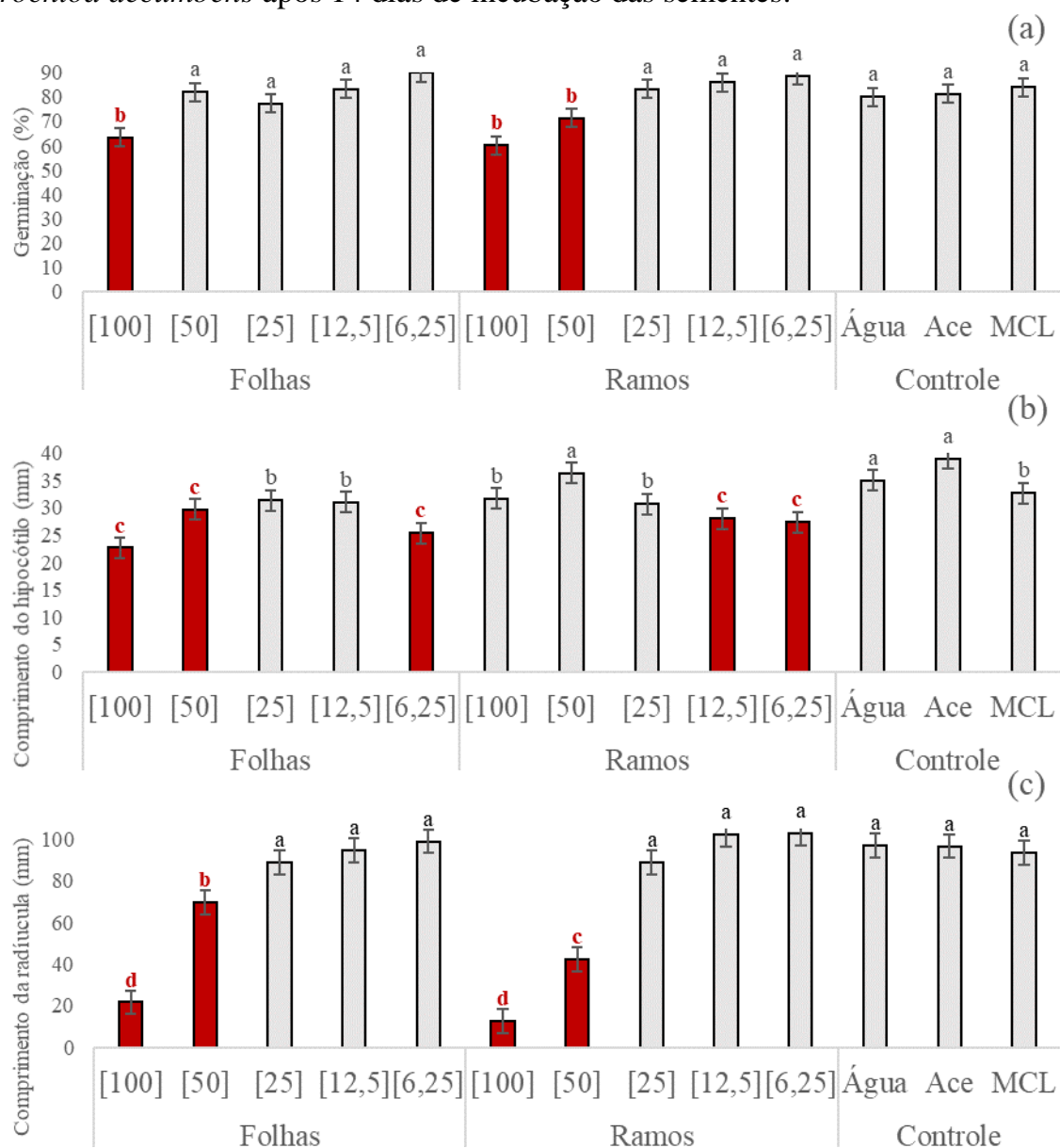
b) Ensaio com a braquiária *Urochloa decumbens*

Quando testados com as sementes de *U. decumbens*, os extratos das folhas e ramos apresentaram efeito negativo no desenvolvimento das sementes nos três parâmetros analisados (FIGURA 5.3).

O extrato bruto das folhas inibiu a germinação das sementes de *U. decumbens* na concentração de 100 mg/mL e o desenvolvimento do hipocótilo e das radículas nas concentrações de 100 e 50 mg/mL (FIGURA 5.3).

O extrato bruto dos ramos inibiu a germinação nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. A inibição do crescimento do hipocótilo foi observada apenas nas concentrações mais baixas de 12,6 e 6,25 mg/mL. O extrato dos ramos também inibiu o crescimento das radículas nas concentrações de 100 e 50 mg/mL (FIGURA 5.3).

FIGURA 5.3 - Influência dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa decumbens* após 14 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e a acetona (ACE) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

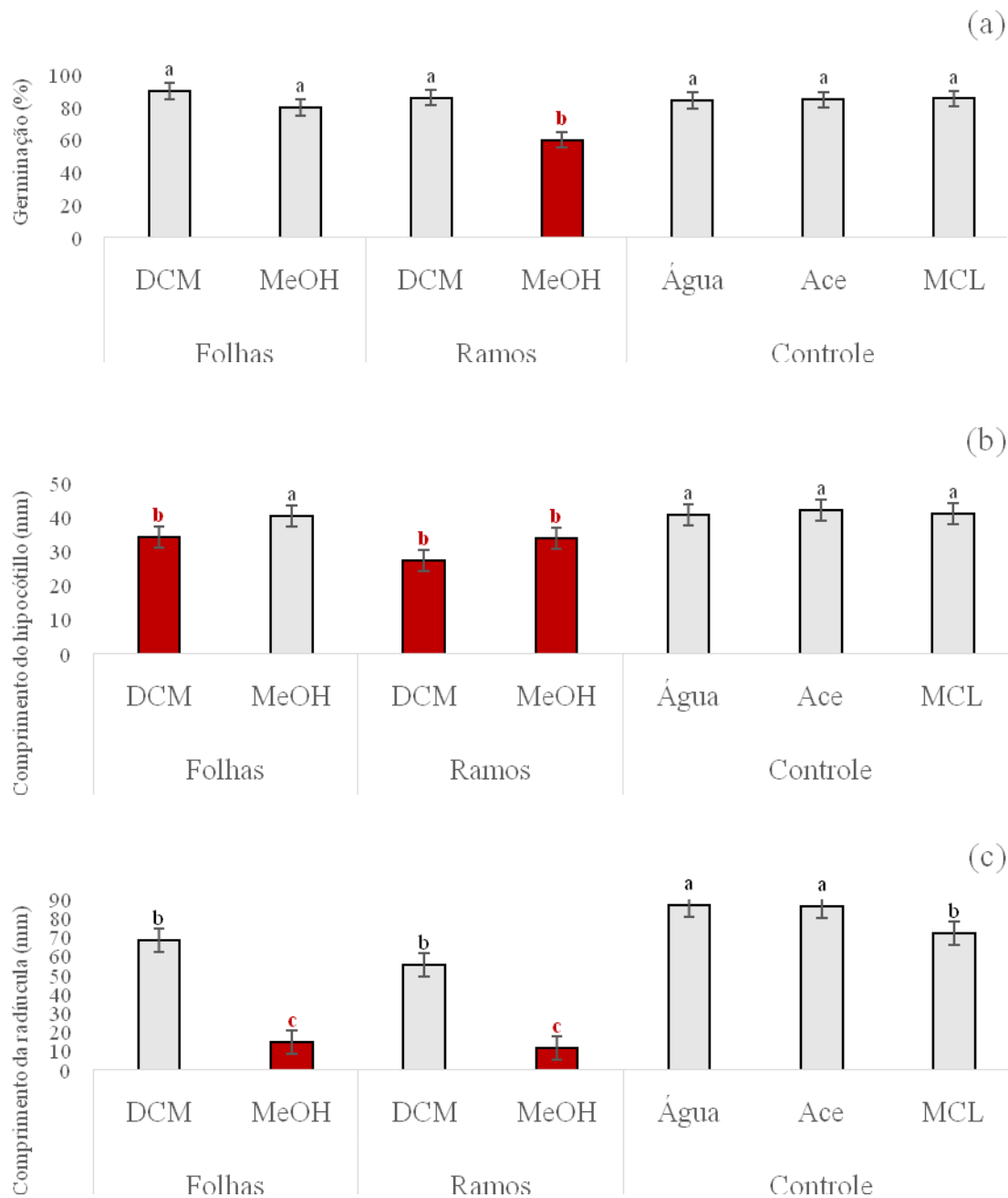
A inibição da germinação, observada anteriormente para o extrato dos ramos em 100 e 50 mg/mL, foi também observada na fração metanólica após o fracionamento do extrato bruto (FIGURA 5.4). Por outro lado, as frações

diclorometano e metanol do extrato das folhas não inibiram a germinação das sementes de *Urochloa decumbens*. Provavelmente, a inibição da germinação observada para o extrato bruto das folhas a 100 mg/mL é resultante de um efeito sinérgico dos metabólitos secundários presentes na amostra, o qual foi perdido após o fracionamento^{49,72}.

Em relação ao comprimento do hipocótilo (FIGURA 5.4), a ação inibitória foi observada para as frações diclorometano das folhas e diclorometano e metanol dos ramos.

Os extratos brutos das folhas e dos ramos inibiram significativamente o desenvolvimento da radícula e, após o fracionamento cromatográfico, a atividade inibitória concentrou-se nas respectivas frações metanólicas (FIGURA 5.4).

FIGURA 5.4 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva* a 100 mg/mL na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa decumbens* após 14 dias de incubação das sementes.



*A água foi utilizada como branco e a acetona (ACE) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

**Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

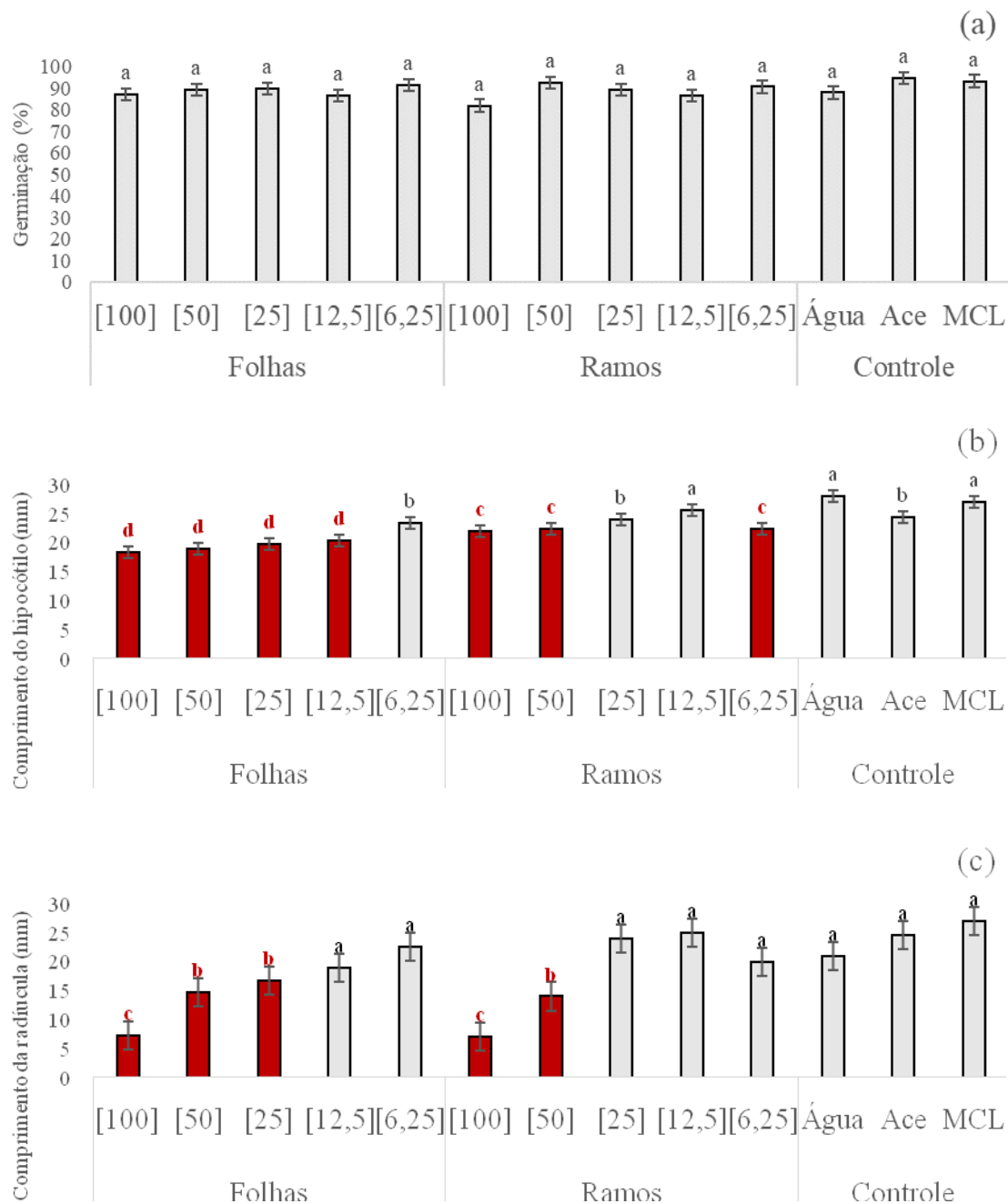
c) Ensaio com a alface *Lactuca sativa*

As sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram testadas como comparativo aos resultados observados frente às espécies de braquiárias e os resultados desses ensaios biológicos estão apresentados na FIGURA 5.5.

Os extratos das folhas e ramos não afetaram a taxa de germinação das sementes da alface em nenhuma das concentrações testadas (FIGURA 5.5.a). Por outro lado, o extrato das folhas inibiu o crescimento do hipocótilo em todas as concentrações avaliadas (100, 50, 25 e 12,5 mg/mL) e o crescimento da radícula nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL (FIGURA 5.5).

O extrato dos ramos inibiu o crescimento do hipocótilo nas concentrações de 100, 50 e 6,25 mg/mL e o crescimento das radículas nas concentrações 100 e 50 mg/mL (FIGURA 5.5).

FIGURA 5.5 - Influência dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula da *Lactuca sativa* após 7 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e a acetona (Ace) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

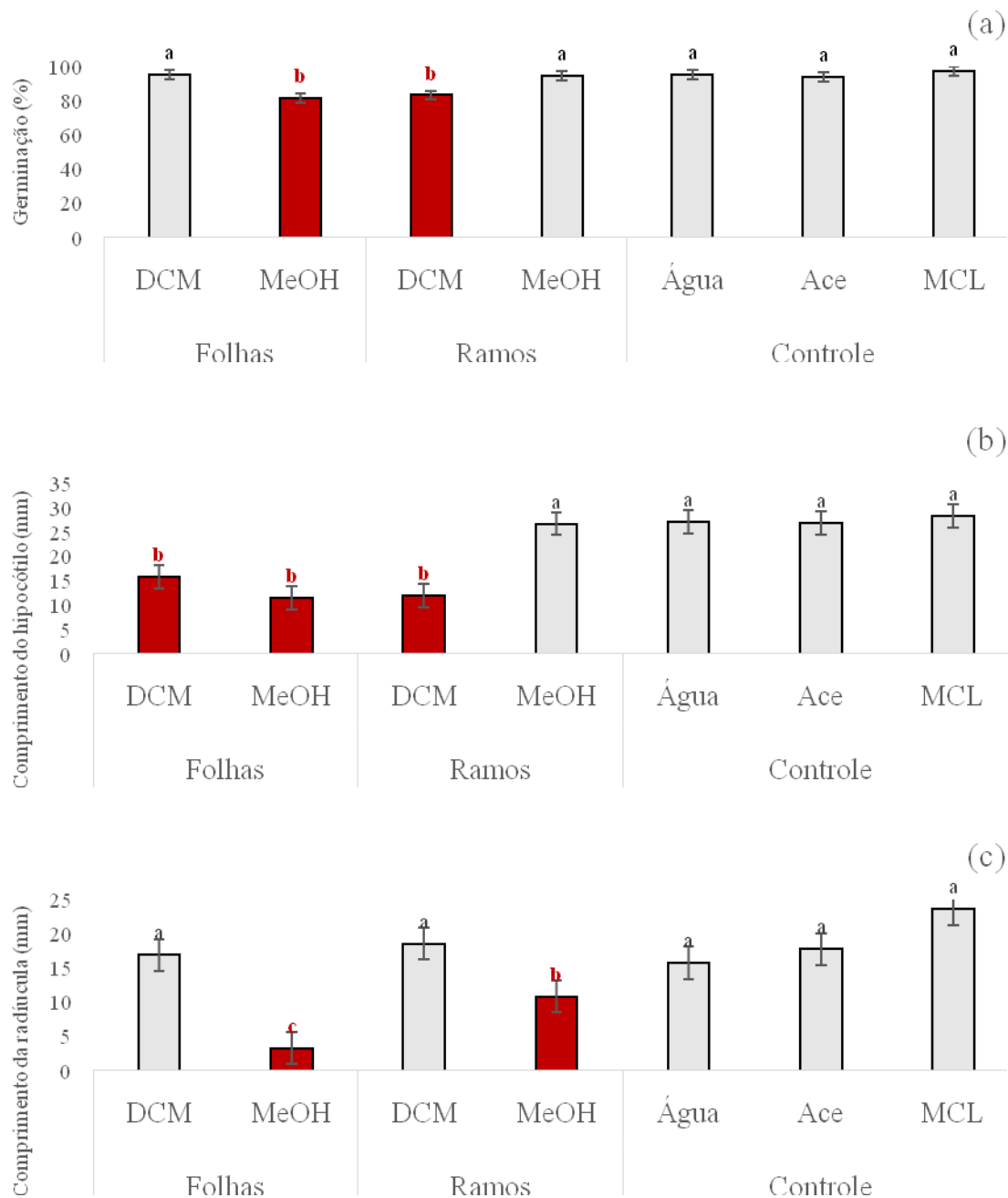
****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

Apesar dos extratos brutos não apresentarem efeito na germinação das sementes, porém, após o fracionamento cromatográfico, observou-se inibição significativa para a fração metanólica das folhas e diclorometano dos ramos (FIGURA 5.6).

A atividade inibitória do desenvolvimento do hipocótilo, observada para o extrato bruto das folhas, também esteve presente em ambas as frações obtidas no fracionamento cromatográfico. Por outro lado, somente a fração diclorometano do extrato bruto dos ramos apresentou atividade inibitória (FIGURA 5.6.).

Os extratos brutos das folhas e ramos inibiram o crescimento da radícula e, após o fracionamento cromatográfico, esta atividade presente apenas nas frações metanólicas (FIGURA 5.6).

FIGURA 5.6 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos das folhas e ramos de *Myracrodruon urundeuva* a 100 mg/mL na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula da alface (*Lactuca sativa*) após 7 dias de incubação das sementes.



*A água foi utilizada como branco e a acetona (ACE) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

**Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

5.1.2. Ensaio com as amostras cultivadas (ACA, ARZ) e subfrações

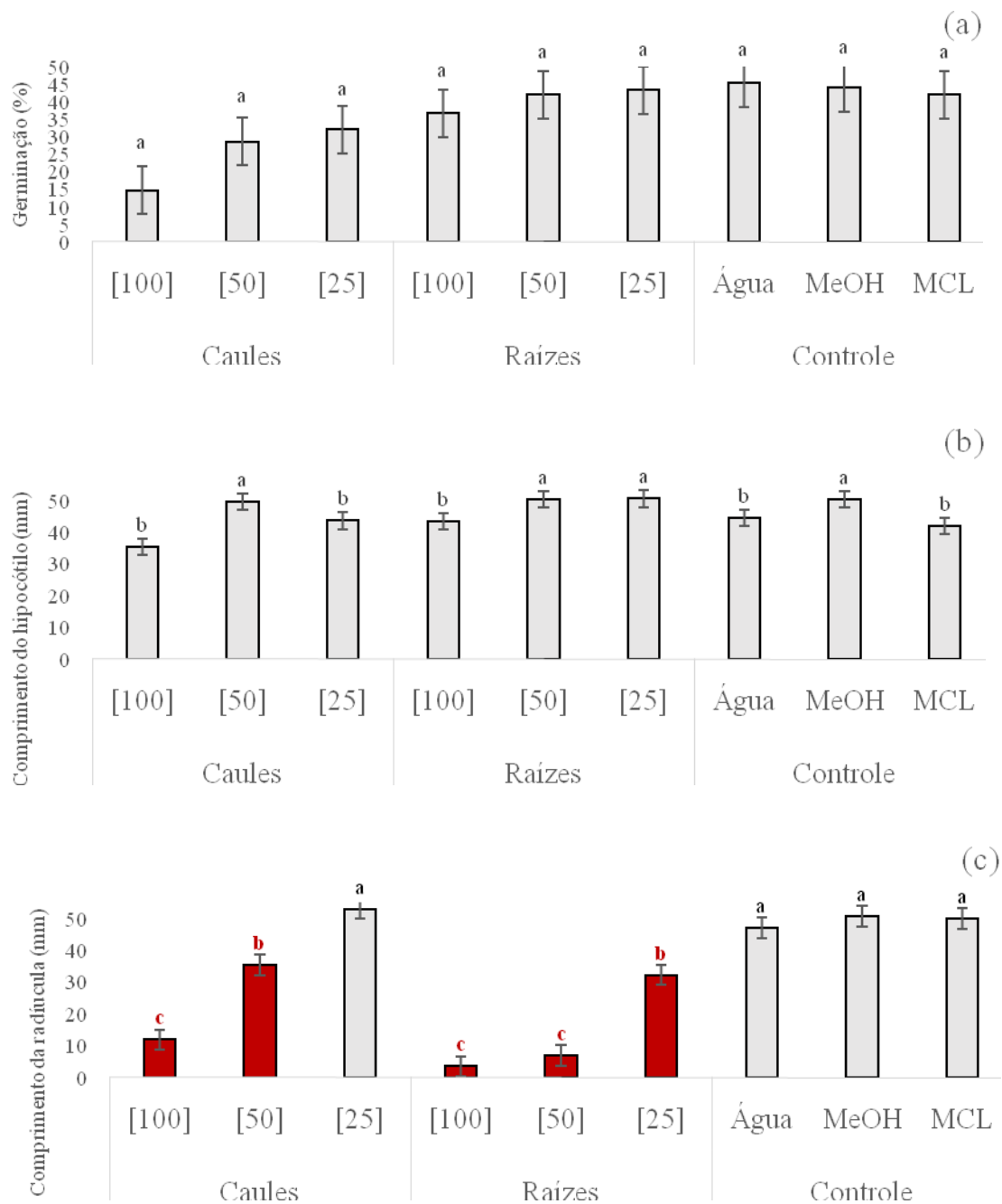
Os extratos dos caules e raízes cultivados (ACA e ARZ) foram avaliados nas concentrações de 100, 50 e 25mg/mL. Os extratos brutos remanescentes foram fracionados por cromatografia *flash*, como descrito na seção 4.2.1, e apenas as frações acetato de etila e metanol das raízes e fração metanólica dos caules foram obtidas em quantidade suficiente para a realização dos bioensaios.

a) Ensaios com a braquiária *Urochloa brizantha*

Quando avaliada a influência dos extratos brutos dos caules e das raízes na germinação das sementes de *U. brizantha*, nenhum dos tratamentos influenciou significativamente a taxa de germinação das sementes e o crescimento do hipocótilo das plântulas. Entretanto, o comprimento da radícula foi afetado negativamente (FIGURA 5.7).

Para o extrato dos caules, a redução do comprimento da radícula foi observada nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, porém o extrato das raízes inibiu o crescimento da radícula nas três concentrações avaliadas (FIGURA 5.7).

FIGURA 5.7 - Influência dos extratos dos caules e raízes de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa brizantha* após 14 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e o metanol (MeOH) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles.

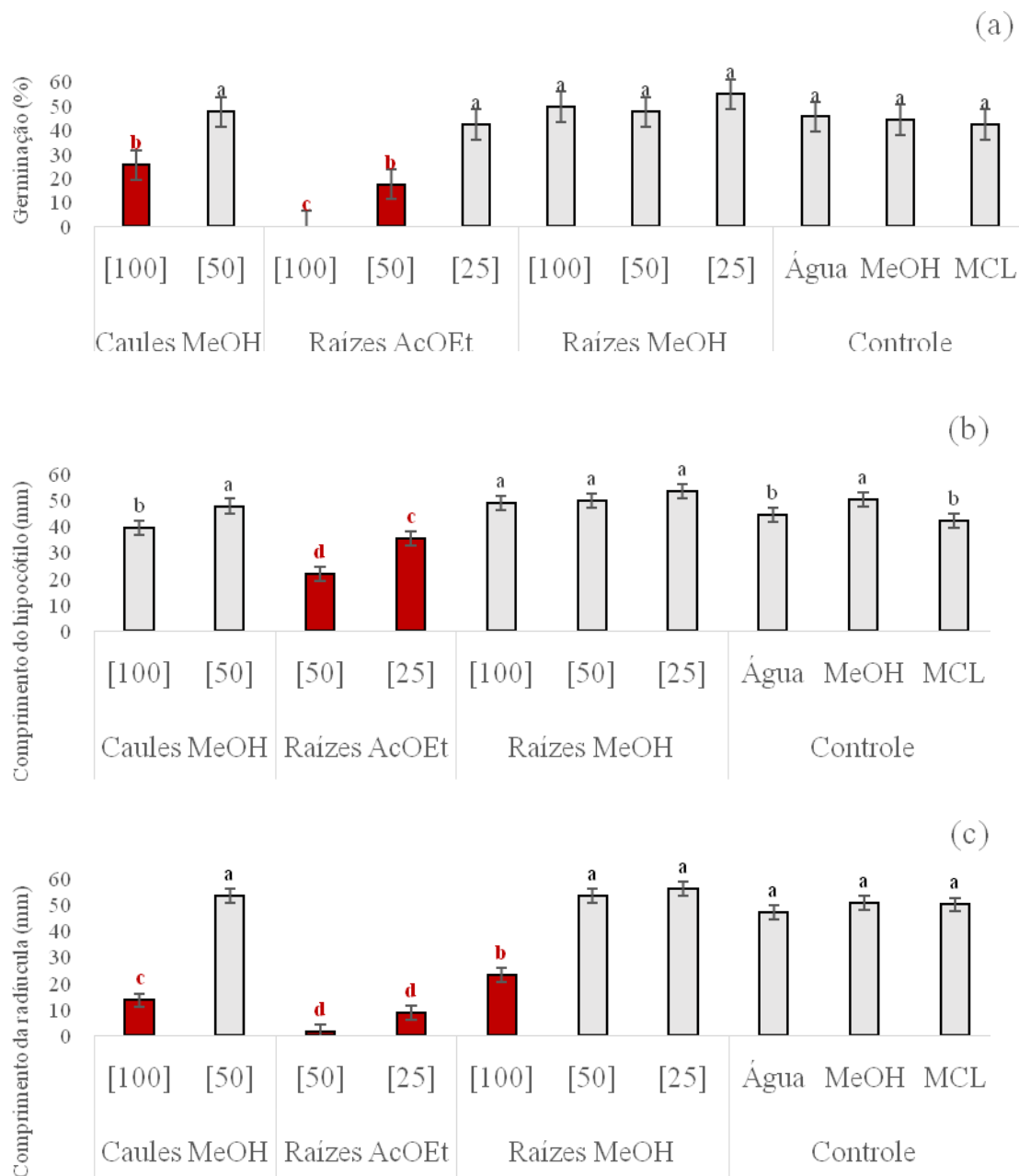
****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

Quando as frações dos extratos brutos foram testadas, nenhuma semente tratada com a fração acetato de etila das raízes a 100mg/mL germinou. Além disso, a germinação também foi significativamente inibida pela fração acetato de etila das raízes a 50 mg/mL e pela fração metanólica dos caules a 100 mg/mL (FIGURA 5.8).

Os extratos brutos dos caules e raízes não afetaram o crescimento do hipocótilo de *U. brizantha* (FIGURA 5.7), porém após o fracionamento cromatográfico, observou-se um efeito negativo no comprimento do hipocótilo nos tratamentos contendo a fração acetato das raízes a 50 e 25 mg/mL (FIGURA 5.8).

Além disso, o efeito inibitório no crescimento da radícula foi mais intenso para a fração acetato de etila das raízes, quando comparado ao seu extrato bruto (FIGURA 5.8). As frações metanólicas das raízes e dos caules a 100 mg/mL também inibiram o desenvolvimento radicular, porém essa inibição foi menos intensa quando comparada com os tratamentos utilizando a fração acetato de etila (FIGURA 5.8).

FIGURA 5.8 - Influência das frações dos extratos dos caules e raízes de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa brizantha* após 14 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e o metanol (MeOH) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles

****A fração AcOEt dos caules não foram testadas devido à quantidade insuficiente de amostra.

*****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

Obs: Os tratamentos com a fração AcOEt a 100 mg/mL não aparecem na avaliação do comprimento do hipocótilo e da radícula devido à inibição total da germinação.

b) Ensaio com a braquiária *Urochloa decumbens*

Durante a avaliação da influência dos extratos brutos em *U. decumbens* (FIGURA 5.9), observou-se uma diminuição da germinação das sementes nos tratamentos com extrato dos caules a 100 e 25 mg/mL e do extrato das raízes a 100 mg/mL. Em relação ao desenvolvimento do hipocótilo, observou-se uma influência estimulante nos tratamentos, como é o caso do extrato dos caules a 50 e 25mg/mL e o extrato das raízes nas três concentrações testadas de 100, 50 e 25mg/mL (FIGURA 5.9).

Apesar do efeito estimulante no crescimento do hipocótilo, o mesmo não foi observado para o desenvolvimento da radícula, onde o extrato dos caules apresentou atividade inibitória nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. Por outro lado, os tratamentos com os extratos das raízes apresentaram comportamento inibitório sobre o desenvolvimento radicular nas três concentrações avaliadas, sendo os tratamentos de concentração 100 e 50 mg/mL aqueles com efeito inibitório mais intenso (FIGURA 5.9.c).

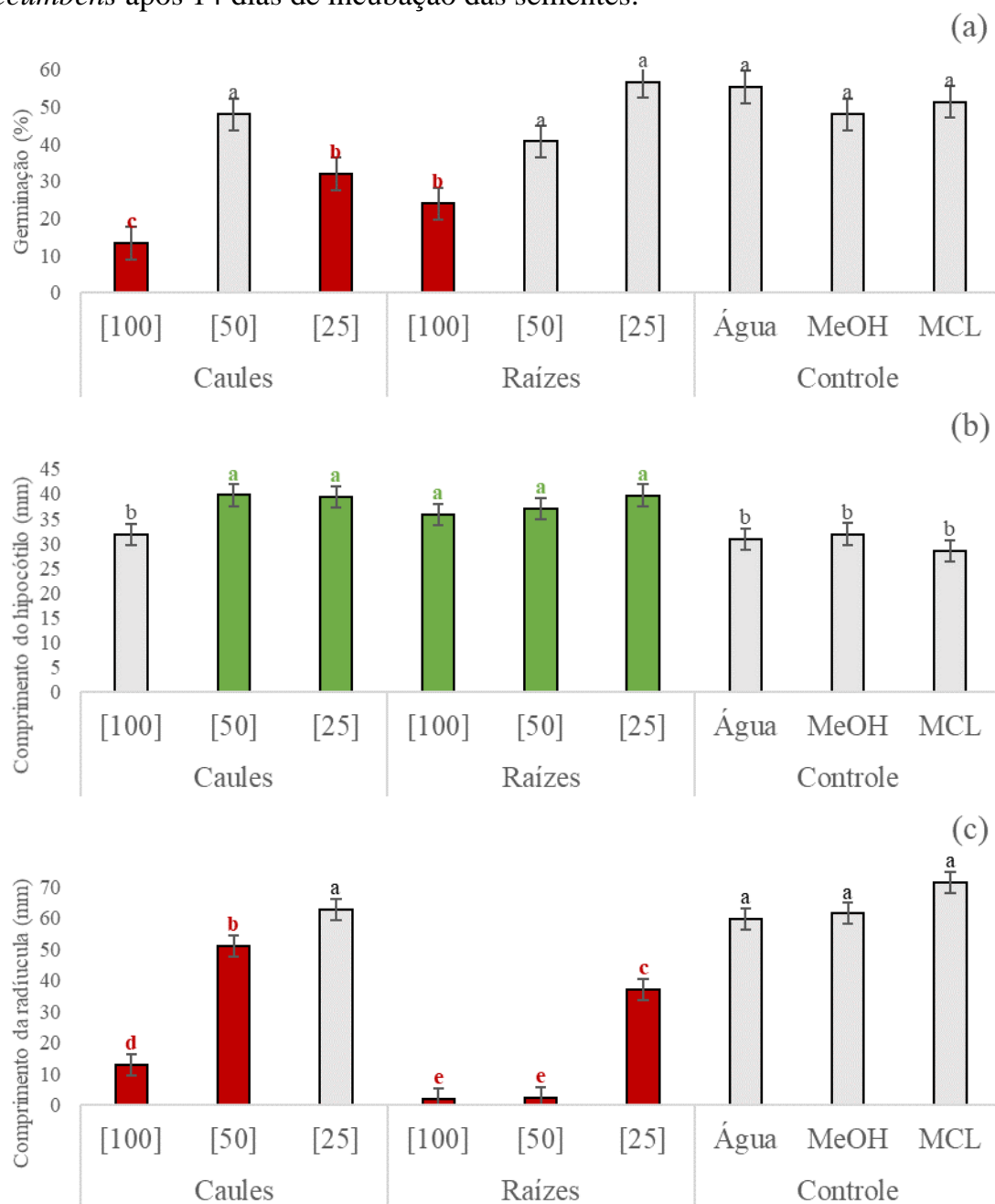
Quando testadas as frações dos extratos brutos, a fração acetato de etila das raízes nas concentrações de 100 e 50 mg/mL apresentaram efeito inibitório na germinação de *U. decumbens*. O mesmo efeito foi observado para a fração metanólica dos caules na concentração de 100mg/mL (FIGURA 5.10.a).

Diferente das plântulas de *U. brizantha*, que apresentaram um menor crescimento do hipocótilo no tratamento com a fração acetato de etila das raízes, as plântulas de *U. decumbens* não foram afetadas quando tratadas com a mesma fração e apresentaram um estímulo no crescimento do hipocótilo quando tratadas com a fração metanólica das raízes nas concentrações de 100 e 50 mg/mL (FIGURA 5.10.b).

Novamente, a fração acetato de etila das raízes apresentou maior inibição no crescimento da radícula em comparação com os demais tratamentos,

porém os tratamentos com as frações metanólicas das raízes e dos caules também apresentaram inibição significativa (FIGURA 5.10.c).

FIGURA 5.9 - Influência dos extratos dos caules e raízes de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa decumbens* após 14 dias de incubação das sementes.

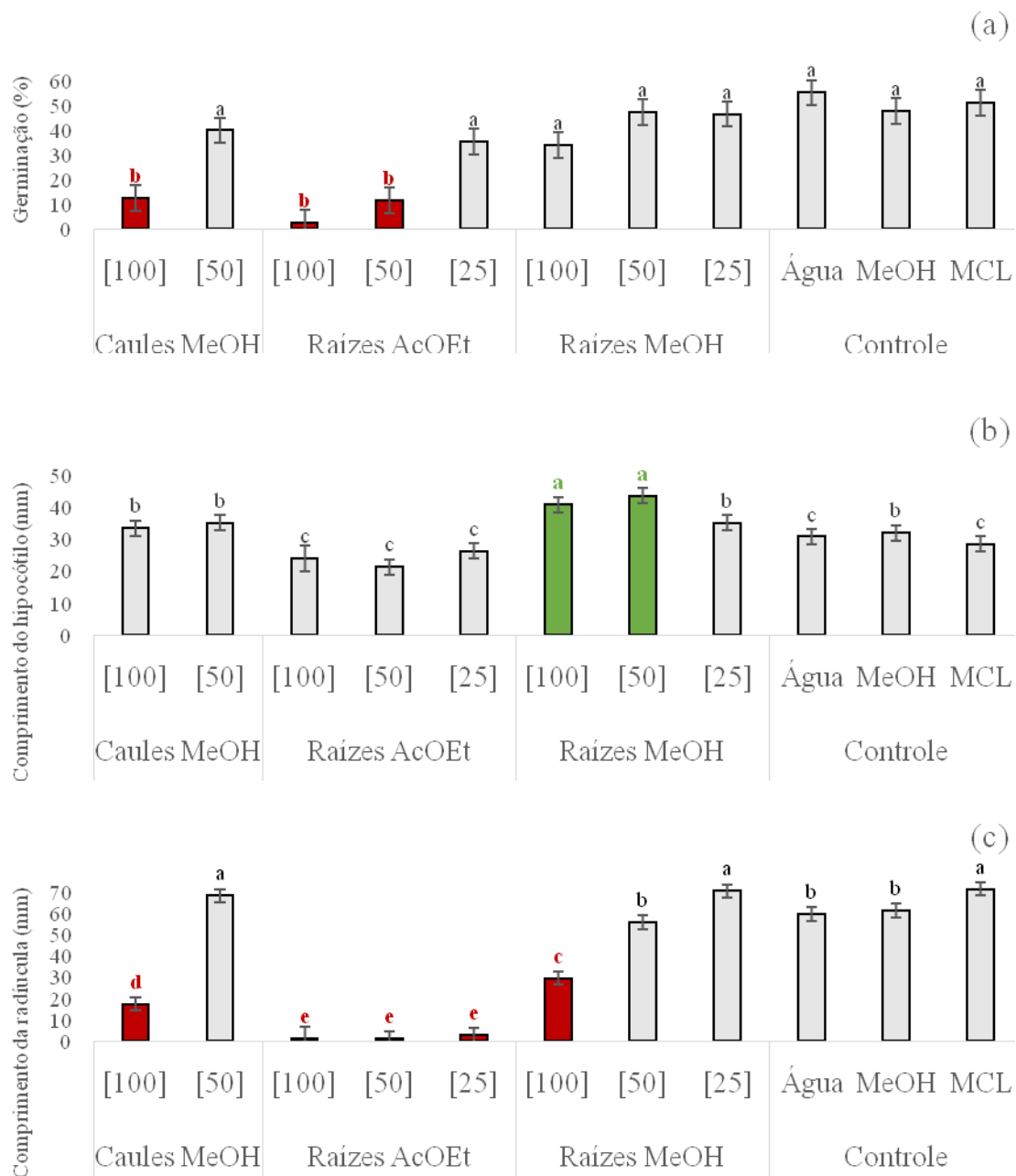


*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e o metanol (MeOH) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles e em verde estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito estimulante.

FIGURA 5.10 - Influência das frações dos extratos dos caules e raízes de *Myracrodruon urundeuva*, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, na (a) taxa de germinação, (b) comprimento do hipocótilo e (c) comprimento da radícula de *Urochloa decumbens* após 14 dias de incubação das sementes.



*Os valores entre colchetes indicam as concentrações em mg/mL testados.

**A água foi utilizada como branco e o metanol (MeOH) e metanol:clorofórmio (MCL) como controle negativo.

***Os tratamentos seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Em vermelho estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito inibitório em relação aos controles e em verde estão destacados os tratamentos que apresentaram efeito estimulante.

****A fração AcOEt dos caules não foram testadas devido a quantidade insuficiente de amostra.

*****Para cada replicata, a média dos comprimentos da radícula e hipocótilo foi calculada a partir de 10 plântulas escolhidas aleatoriamente

c) Ensaio com a alface *Lactuca sativa*

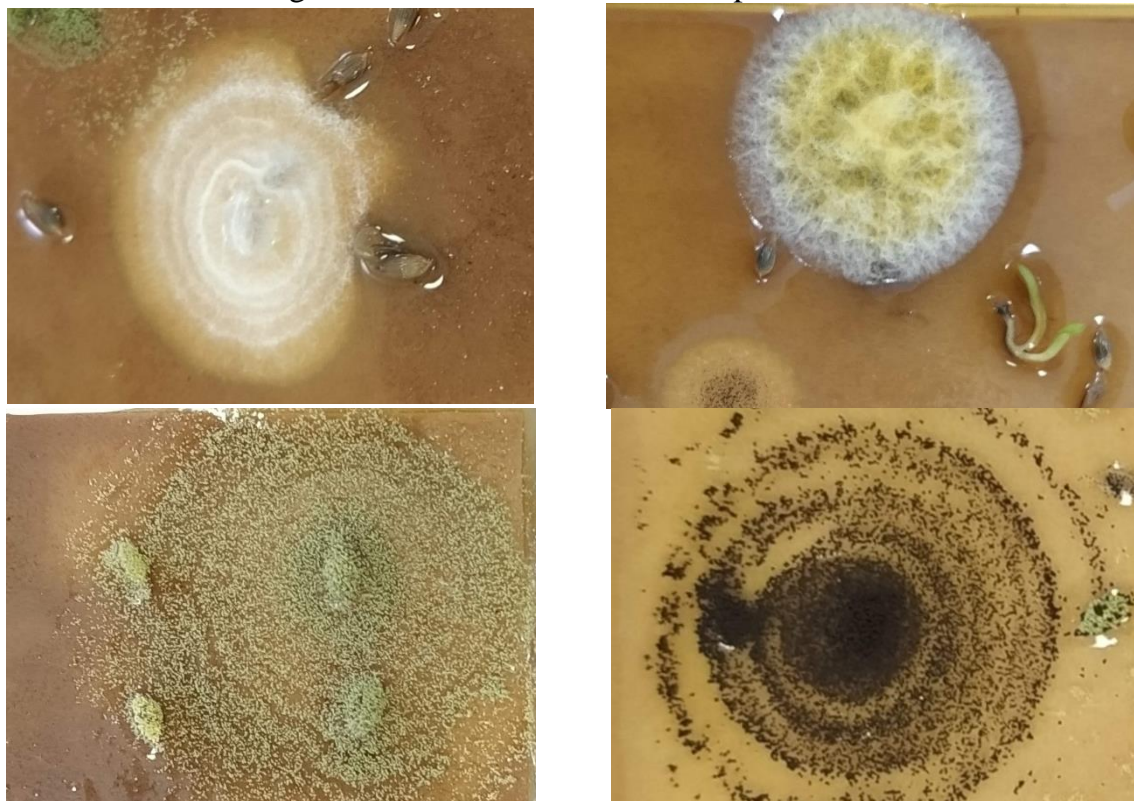
As sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram testadas como comparativo dos resultados obtidos para as espécies de braquiárias, porém não foi possível avaliar a influência dos extratos da aroeira-preta cultivada e suas respectivas frações.

Durante a última parte dos ensaios biológicos *in vitro*, as sementes da *L. sativa* apresentaram sérios problemas na germinação: dentre as 2250 sementes (50 sementes em cada um dos 45 gerbox) colocadas para germinar, apenas 95 sementes (4% do total) apresentaram algum sinal de germinação. Além disso, das poucas sementes germinadas, nenhuma foi capaz de se desenvolver nos dias seguintes à germinação, inclusive nos tratamentos com os controles dos solventes. Também não foi possível repetir o experimento devido à falta de extrato.

Apesar de não ser possível avaliar a influência dos extratos brutos coletados e suas respectivas frações no desenvolvimento das sementes de *L. sativa*, foi observado uma contaminação diferenciada entre os diferentes tratamentos. Enquanto alguns tratamentos apresentaram uma contaminação generalizada das sementes, outros mantiveram-se praticamente sem contaminação durante os dias de incubação das sementes. Nos tratamentos com contaminação, foram observados fungos esporulantes e/ou micelares de coloração esbranquiçada, amarelada, esverdeada e preta (FIGURA 5.11).

A evolução da contaminação das sementes presentes nas três replicatas foi monitorada diariamente durante o período de incubação. A evolução do número de sementes contaminadas, presentes em cada gerbox, ao longo do tempo está representada nos gráficos da FIGURA 5.12 (p. 69). A FIGURA 5.13 (p. 70) ilustra a contaminação por fungos observada nos tratamentos com os extratos das raízes e suas respectivas frações.

FIGURA 5.11 - Contaminação das sementes de alface (*Lactuca sativa*) por fungos durante o ensaio biológico com os extratos da aroeira-preta.



Nos tratamentos com o extrato bruto das raízes nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL (FIGURA 5.12.a), a contaminação foi mais intensa nos tratamentos com a menor concentração do extrato.

Provavelmente o extrato bruto apresenta metabólitos secundários que podem ser utilizados pelos fungos como nutrientes, entretanto também estão presentes metabólitos que inibem o desenvolvimento do fungo, o que explicaria a pequena contaminação observada nos tratamentos a 100 mg/mL. À medida que a concentração diminui, menor é o efeito inibitório e, portanto, maior a contaminação das sementes.

Para os tratamentos com a fração acetato de etila das raízes (FIGURA 5.12.b), a contaminação foi nula nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e uma pequena contaminação foi observada no tratamento a 25 mg/mL.

Com o fracionamento cromatográfico do extrato bruto das raízes, os possíveis metabólitos secundários, capazes de inibir o desenvolvimento desses fungos, podem estar concentrados na fração acetato de etila, tendo em vista a pequena contaminação observada para esta fração. Mesmo na concentração mais baixa (25mg/mL) para a fração acetato de etila das raízes, apenas seis sementes foram contaminadas.

Nos tratamentos com a fração metanólica do extrato bruto das raízes (FIGURA 5.12.c) é possível observar que a contaminação cresce com o aumento da concentração da amostra. A atividade inibitória desse extrato foi menor quando comparada com a fração acetato de etila e, provavelmente, a fração metanólica é majoritariamente composta por metabólitos secundários que servem como nutrientes para os fungos durante o seu desenvolvimento.

Buscando investigar a atividade desses compostos como trabalho futuro, foi feita uma amostragem dos halos de crescimento desses fungos e essas amostras foram enviados para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, para a identificação e plaqueamento desses fungos. Devido à indisponibilidade de massa do extrato bruto das raízes, as amostras de cada gerbox contendo a fração acetato de etila foram extraídas com 100% de etanol. Posteriormente, esse extrato etanólico será purificado utilizando diferentes técnicas cromatográficas, buscando-se isolar e identificar os compostos presentes no extrato.

Uma vez isolados e identificados, a ação antifúngica de cada um dos compostos será avaliada frente aos fungos isolados a partir das amostras contaminadas no estudo. Este trabalho visa testar, futuramente, a hipótese levantada de que os compostos presentes na fração acetato de etila das raízes de *M. urundeuva* foram responsáveis por evitar a contaminação pelos fungos, observada em outras amostras.

FIGURA 5.12 – Evolução da contaminação das sementes de alface (*Lactuca sativa*) por fungos durante o ensaio biológico com (a) extratos brutos das raízes, (b) fração acetato de etila das raízes e (c) fração metanólica das raízes de *Myracrodruon urundeuva*. No gráfico (b), as curvas de 100 e 50mg/mL estão sobrepostas.

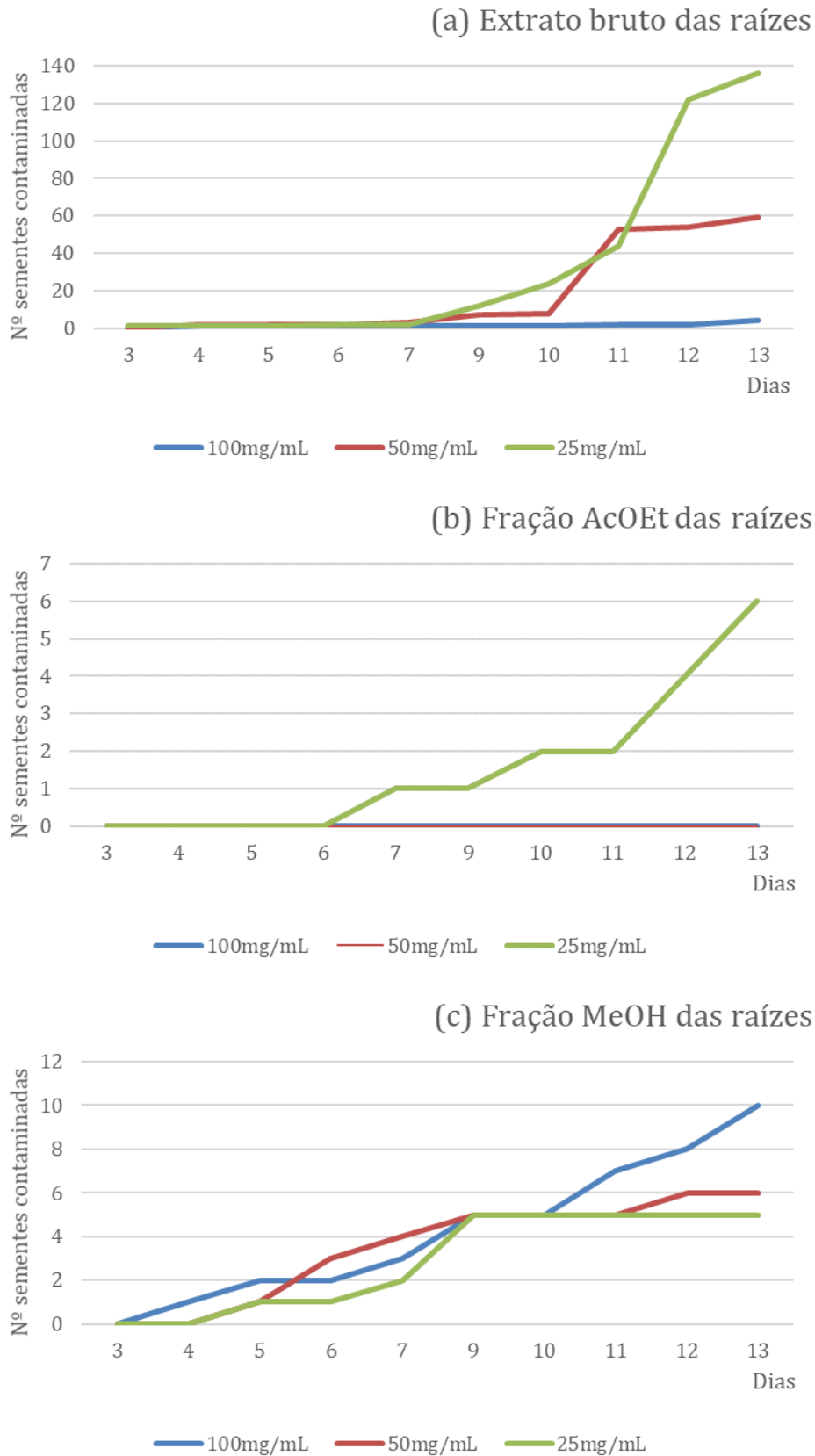
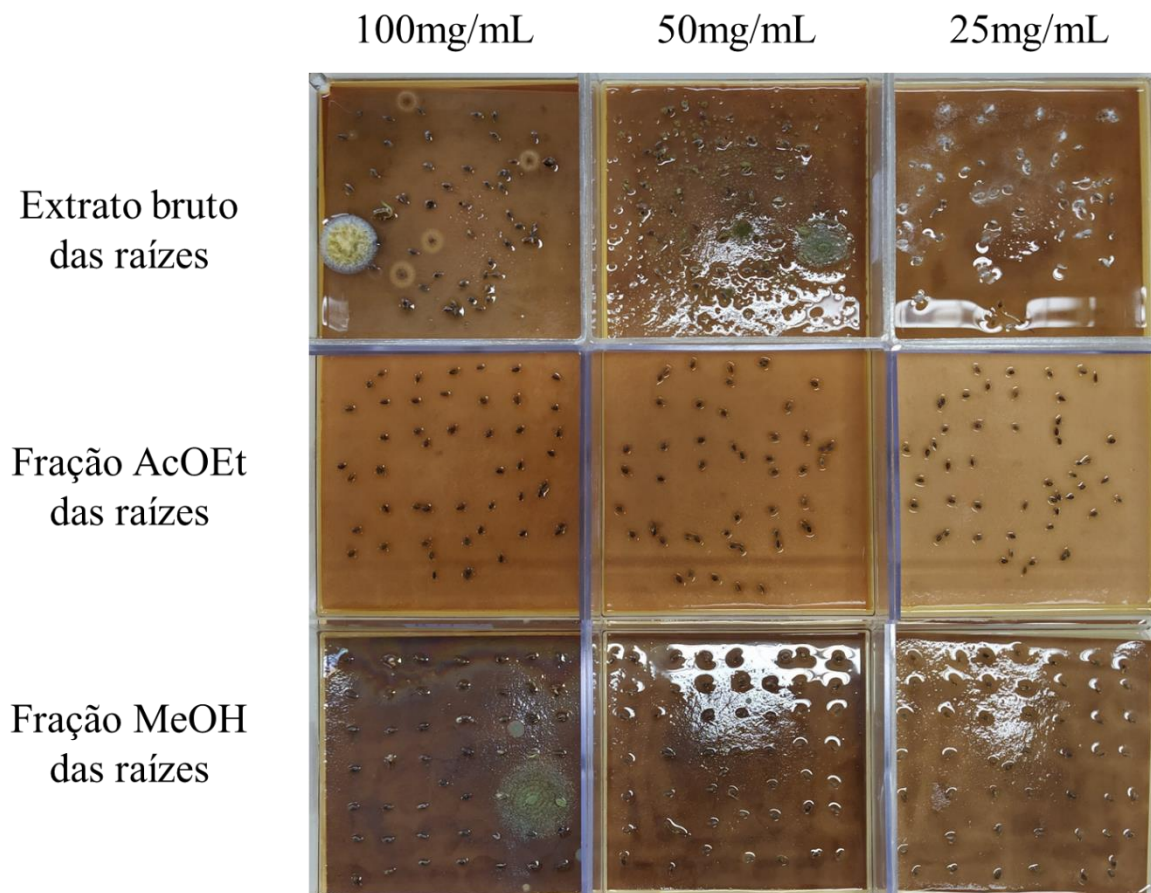


FIGURA 5.13 - Contaminação por fungos observada nos tratamentos com os extratos das raízes e suas respectivas frações.



5.1.3. Resumo dos resultados obtidos nos ensaios biológicos

Os resultados da avaliação da influência dos extratos na taxa de germinação, comprimento do hipocótilo e comprimento da radícula estão compilados na TABELA 5.1, TABELA 5.2 e TABELA 5.3, respectivamente, facilitando a visualização geral das atividades observadas para cada amostra.

Quando analisada a taxa de germinação das sementes (TABELA 5.1), os tratamentos com o extrato bruto das folhas, extrato bruto dos ramos, fração metanólica dos ramos, fração metanólica dos caules e fração acetato das raízes foram aquelas que apresentaram atividades de inibição satisfatória, uma vez que foram capazes de inibir significativamente ambas as espécies de braquiárias estudadas. Dentre as amostras que apresentaram atividade satisfatória, a fração acetato de etila das raízes apresentou maior ação inibitória,

sendo ativa nas concentrações de 100 e 50mg/mL contra as duas espécies de braquiária.

TABELA 5.1 - Atividades observadas na germinação das sementes de *Urochloa brizantha*, *U. decumbens* e *Lactuca sativa* quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.

Matriz	Amostra	Concentração ativa (germinação)		
		<i>U. brizantha</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>L. sativa</i>
Folhas coletadas	Extrato bruto	100 mg/mL	100 mg/mL	n. d.
	Fração DCM	n. d.	n. d.	n. d.
	Fração MeOH	100 mg/mL	n. d.	100 mg/mL
Ramos coletados	Extrato bruto	100 mg/mL	100 e 50 mg/mL	n. d.
	Fração DCM	n. d.	n. d.	100 mg/mL
	Fração MeOH	100 mg/mL	100 mg/mL	n. d.
Caules cultivados	Extrato bruto	n. d.	100 e 25 mg/mL	-
	Fração MeOH	100 mg/mL	100 mg/mL	-
Raízes cultivados	Extrato bruto	n. d.	100 mg/mL	-
	Fração AcOEt	100 e 50 mg/mL	100 e 50 mg/mL	-
	Fração MeOH	n. d.	n. d.	-

*Os tratamentos que apresentaram atividade inibitória estão destacados em laranja e aqueles que apresentaram atividade estimulante em verde.

**As matrizes coletadas foram testadas frente às sementes de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *L. sativa*, enquanto que as matrizes cultivadas foram testadas apenas para as espécies de braquiárias.

n.d. = não apresentou diferença significativa entre os tratamentos controle e branco.

Em relação ao desenvolvimento do hipocótilo (TABELA 5.2), o extrato bruto das folhas, extrato bruto dos ramos, a fração DCM dos ramos e a fração metanólica dos ramos apresentaram atividade inibitória significativa em ambas as espécies de braquiárias. Alguns extratos apresentaram atividade estimulante, como foi o caso do extrato bruto dos caules, extrato bruto das raízes e fração metanólica das raízes.

Apesar de não ser o efeito de interesse neste trabalho, a estimulação no crescimento da planta também pode acontecer em uma interação alelopática. De acordo com Rice (1987)⁵⁰, a alelopatia inclui qualquer efeito inibitório ou estimulante, direto ou indireto, de uma planta (ou microrganismo) sobre a outra através de produção de compostos químicos e sua liberação no meio. Os efeitos

estimulantes, assim como os efeitos de inibição, dependem da concentração aplicada e nem sempre seguem um padrão lógico. Mandal (2001)⁷³ observou um efeito estimulante dos exsudados das raízes da erva-macaé (*Leonurus sibiricus* L.) quando testados no crescimento do hipocótilo do arroz e o efeito observado se intensificou com o aumento da concentração. Por outro lado, no estudo feito por Ribeiro, et. al (2019)⁷⁴, o extrato bruto aquoso das folhas *in natura* da erva-de-garrafa (*Callistemon viminalis*) apresentou efeito estimulante na concentração mais baixa de 20%, enquanto que nas concentrações mais altas, o extrato apresentou efeitos negativos no crescimento do picão-preto (*Bidens pilosa* L.).

TABELA 5.2 - Atividades observadas no crescimento do hipocótilo das plântulas de *Urochloa brizantha*, *U. decumbens* e *Lactuca sativa* quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.

Matriz	Amostra	Concentração ativa (hipocótilo)		
		<i>U. brizantha</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>L. sativa</i>
Folhas coletadas	Extrato bruto	100, 50 e 25 mg/mL	100, 50 e 6,25 mg/mL	100, 50, 25 e 12,5 mg/mL
	Fração DCM	n. d.	100 mg/mL	100 mg/mL
	Fração MeOH	100 mg/mL	n. d.	100 mg/mL
Ramos coletados	Extrato bruto	100, 50 e 25 mg/mL	25,5 e 6,25 mg/mL	100, 50 e 6,25 mg/mL
	Fração DCM	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
	Fração MeOH	100 mg/mL	100 mg/mL	n. d.
Caules cultivados	Extrato bruto	n. d.	50 e 25 mg/mL	-
	Fração MeOH	n. d.	n. d.	-
Raízes cultivados	Extrato bruto	n. d.	100, 50 e 25 mg/mL	-
	Fração AcOEt	100 ^a , 50 e 25 mg/mL	n. d.	-
	Fração MeOH	n. d.	100 e 50 mg/mL	-

^a Tratamento em que não houve germinação das sementes e, conseqüentemente não foi observado crescimento do hipocótilo.

*Os tratamentos que apresentaram atividade inibitória estão destacados em laranja e aqueles que apresentaram atividade estimulante em verde.

**As matrizes coletadas foram testadas frente às sementes de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *L. sativa*, enquanto que as matrizes cultivadas foram testadas apenas para as espécies de braquiárias.

n.d. = não apresentou diferença significativa entre os tratamentos controle e branco.

O desenvolvimento da radícula (TABELA 5.3) foi o mais afetado entre os três parâmetros analisados nos ensaios biológicos *in vitro*. Entre as onze amostras testadas, nove apresentaram atividade significativa frente às duas espécies de braquiárias. Apenas as frações diclorometano das folhas e ramos não apresentaram inibição nas sementes testadas.

TABELA 5.3 - Atividades observadas no crescimento da radícula das plântulas de *Urochloa brizantha*, *U. decumbens* e *Lactuca sativa* quando tratadas com os extratos brutos da aroeira-preta e suas respectivas frações.

Matriz	Amostra	Concentração ativa (radícula)		
		<i>U. brizantha</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>L. sativa</i>
Folhas coletadas	Extrato bruto	100, 50 e 25 mg/mL	100 e 50 mg/mL	100, 50 e 25 mg/mL
	Fração DCM	100 mg/mL	n. d.	n. d.
	Fração MeOH	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
Ramos coletados	Extrato bruto	100 e 50 mg/mL	100 e 50 mg/mL	100 e 50 mg/mL
	Fração DCM	n. d.	n. d.	n. d.
	Fração MeOH	100mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
Caules cultivados	Extrato bruto	100 e 50 mg/mL	100 e 50 mg/mL	-
	Fração MeOH	100mg/mL	100mg/mL	-
Raízes cultivados	Extrato bruto	100, 50 e 25 mg/mL	100, 50 e 25 mg/mL	-
	Fração AcOEt	100 ^a , 50 e 25 mg/mL	100, 50 e 25 mg/mL	-
	Fração MeOH	100mg/mL	100mg/mL	-

^a Tratamento em que não houve germinação das sementes e, conseqüentemente não foi observado crescimento da radícula.

*Os tratamentos que apresentaram atividade inibitória estão destacados em laranja e aqueles que apresentaram atividade estimulante em verde.

**As matrizes coletadas foram testadas frente às sementes de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *L. sativa*, enquanto que as matrizes cultivadas foram testadas apenas para as espécies de braquiárias.

n.d. = não apresentou diferença significativa entre os tratamentos controle e branco.

Além disso, é importante destacar que o extrato bruto das raízes e a fração acetato de etila das raízes foram aqueles que apresentaram efeito inibitório mais acentuado, tendo em vista que estas amostras foram ativas nas três concentrações testadas, inclusive na concentração mais baixa de 25 mg/mL.

A inibição do crescimento do hipocótilo não parece ser o mecanismo de ação principal que confere a atividade alelopática da aroeira-preta sobre as espécies de *Urochloa*. Apesar de apresentar pouca influência negativa no crescimento do hipocótilo, os extratos apresentam potencial inibitório na taxa de germinação e, principalmente, no desenvolvimento do sistema radicular. Vale ressaltar que o extrato das raízes foi aquele que apresentou a atividade inibitória mais acentuada, sendo possível observar o efeito negativo no crescimento da radícula mesmo na concentração mais baixa avaliada (FIGURA 5.7.c, p. 60 e FIGURA 5.9.c, p. 64).

Nos tratamentos com as amostras das raízes, principalmente o extrato bruto e fração acetato de etila, observou-se uma inibição acentuada no desenvolvimento da radícula. Além disso, a fração acetato de etila das raízes na concentração de 100 mg/mL apresentou inibição completa da germinação das sementes de *U. brizantha*. Em tratamentos com a fração acetato de etila das raízes o crescimento das radículas entre as sementes germinadas foi mínimo (entre 0,33 e 4,30mm para *U. decumbens* e entre 1,00 e 13,80mm para *U. brizantha*, enquanto que nos tratamentos com a água, o crescimento da radícula ficou entre 43,60 e 45,00mm para *U. brizantha* e entre 26,50 e 33,30mm para *U. decumbens*). Mesmo que essas sementes germinem, a inibição no desenvolvimento do sistema radicular compromete a absorção de nutrientes do solo e, conseqüentemente, prejudicando a sobrevivência das plântulas.

É importante ressaltar que os experimentos aqui conduzidos apenas indicam o potencial alelopático da aroeira-preta sobre as espécies de *Urochloa*, porém não provam que ela acontece em condições naturais. Isso acontece devido às condições em que esses experimentos são conduzidos. No caso deste trabalho, os experimentos foram conduzidos com a utilização de extratos brutos que podem maximizar o efeito da fitotoxina. Além disso, em condições naturais, os metabólitos secundários liberados pelas plantas no solo podem sofrer

modificações promovidas pela microbiota e somente após essa transformação atuar como um aleloquímico. Para que um composto esteja ou não envolvido em uma interação alelopática entre duas plantas, depende-se de diversos fatores como: nível de fitotoxicidade no solo, quantidade produzida e liberada no meio e disponibilidade e interação com os microrganismos presentes no solo⁷⁵, fatores esses que não foram avaliados neste estudo.

Apesar disso, os resultados apresentados demonstram que um ou mais metabólitos secundários produzidos pela aroeira-preta são fitotóxicos em condições laboratoriais e esta espécie é potencialmente alelopática contra as espécies de *Urochloa*. Além disso, foi observada uma atividade significativa principalmente da fração acetato de etila das raízes, o que desperta o interesse em relação à sua composição química e a avaliação da ação alelopática de cada um dos compostos separadamente.

5.2. Anotação dos metabólitos secundários de *Myracrodruon urundeuva*

Para a escolha da proporção de fase móvel utilizada para o fracionamento em SPE, realizou-se uma análise exploratória via HPLC-PDA. Os cromatogramas das amostras submetidas a esse fracionamento estão representados na FIGURA 5.14.

Os dados de LC-MS/MS dos extratos brutos (ARM, AFO, ACA, AFL, ARZ) e suas respectivas frações obtidas a partir do fracionamento por SPE foram utilizadas para a criação da rede molecular.

As redes moleculares, obtidas nos modos negativo e positivo de ionização, são formadas por nodos que representam cada íon precursor detectado durante o processamento de dados. Cada nodo é representado por um gráfico de pizza que representa a distribuição do íon pelas amostras analisadas: as tonalidades em rosa, verde e azul representam, respectivamente, as amostras

referentes aos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivada (ACA, AFL, ARZ e suas respectivas subfrações) e as cores bordô e ocre referem-se às amostras de ramos e folhas coletadas (ARM e AFO). A fração em amarelo nos gráficos de pizza indica que o íon foi encontrado nas amostras do branco, sendo esta uma evidência de um interferente. Na FIGURA 5.15 (p. 77) pode-se observar um nodo de m/z 227,1626 com distribuição uniforme de cores, indicando que este íon esteve presente em proporções iguais em todas as amostras, sendo um possível íon oriundo de um contaminante.

FIGURA 5.14 – Cromatogramas dos extratos brutos de (a) caules (b) folhas e (c) raízes. A escolha da proporção de solvente utilizada para a eluição das amostras no cartucho SPE foi feita levando em consideração as divisões em tracejado vermelho em cada cromatograma. As caixas em roxo, verde e azul indicam as frações obtidas para cada fracionamento.

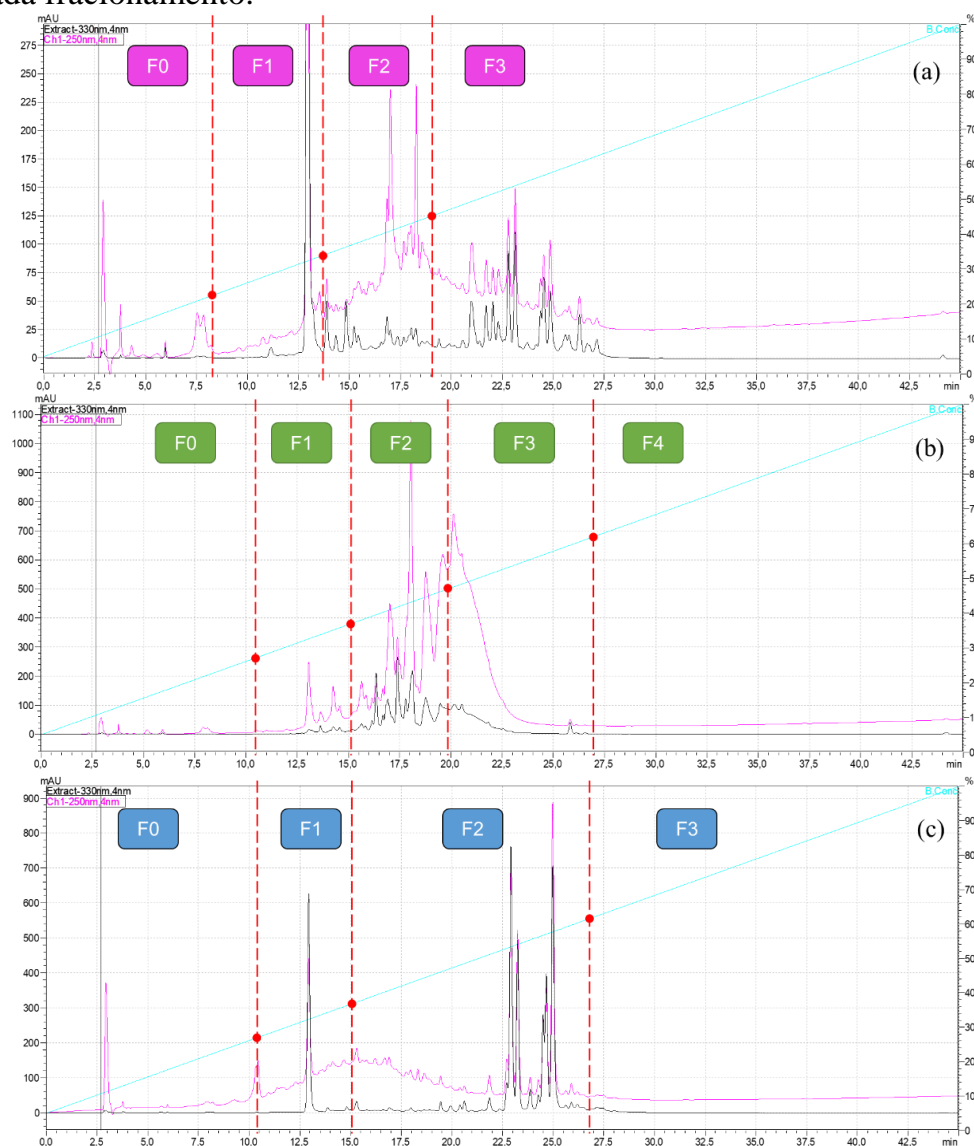
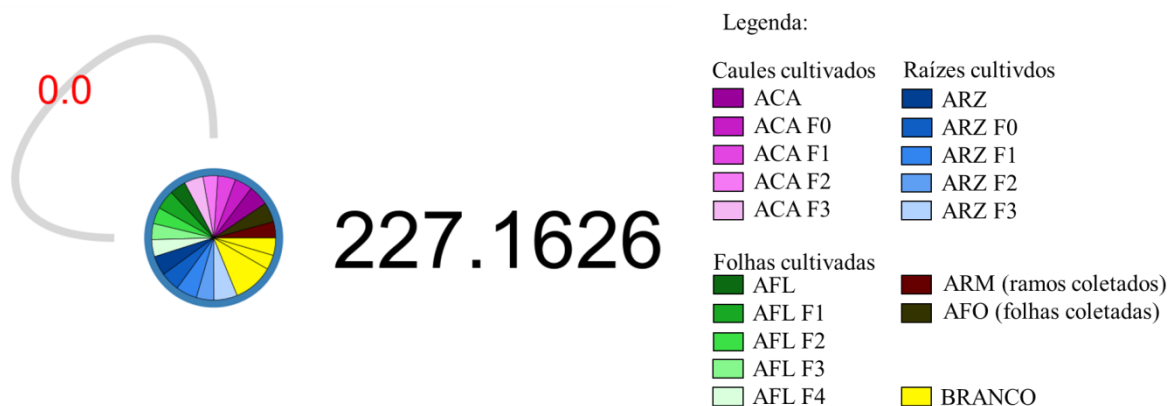


FIGURA 5.15 – Representação de um nodo na rede molecular. Exemplo de um nodo típico de contaminação dado pela presença em todas as amostras, inclusive no branco. A legenda indica as cores que representam cada amostra analisada por UHPLC-QTOF-ESI



Os espectros de MS^2 adquiridos no modo negativo formaram uma rede molecular com 365 íons precursores visualizados como nodos, que pode ser encontrada na FIGURA A1 nos apêndices. Um total de 45 substâncias foi anotado pela plataforma GNPS, permitindo uma ampla visualização dos compostos presentes nos extratos dos diferentes órgãos da espécie *M. urundeuva*.

Os espectros de MS^2 adquiridos no modo positivo também foram utilizados para a construção da rede molecular (FIGURA A2). Apesar da grande quantidade de íons precursores observados no modo positivo (1380 íons), apenas 8 compostos foram anotados pela plataforma do GNPS. Grande parte dos íons formados no modo positivo de ionização aparenta serem interferentes indesejáveis, uma vez que também estavam presentes nas amostras do branco. Dessa forma, a rede molecular no modo positivo foi utilizada de modo complementar à análise da rede molecular no modo negativo.

As redes moleculares nos modos positivo e negativo permitiram a anotação putativa de um total de 55 compostos, tais como taninos hidrolisáveis, flavonoides, catequinas, ácidos graxos, derivados do ácido quínico, chalconas, derivados do ácido gálico e ácidos anacárdicos. Dessa forma, a composição química de *Myracrodunon urundeuva* mostrou-se rica em derivados da rota do

ácido chiquímico. As anotações dos compostos foram organizadas de acordo com a classe de compostos e estão descritas na TABELA 5.4 (p.79-84).

Entre os compostos apresentados na TABELA 5.4, 20 metabólitos anotados foram atribuídos à espécie *M. urundeuva* pela primeira vez neste trabalho, sendo: heptagalol hexosídeo, ácido 3-*O*-metilelágico ramnosídeo, kaempferol-3-*O*-arabinosídeo, miricetina, miricetina-3-*O*-glucosídeo, isoramnetina-3-*O*-glucosídeo, diidromiricetina, taxifolina, dois derivados do ácido 9,12,13-triidroxioctadecaenoico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, chalcona eriodictiol, galato de etila, uma espécie formada por duas unidades de ácido gálico e um metil digalato ligados entre si, uma espécie formada por três unidades de ácido gálico ligados entre si e cinco ácidos anacárdicos com tamanho de cadeia alifática e grau de insaturação variados.

É importante ressaltar que apesar da análise minuciosa dos dados realizados para as anotações dos compostos, as atribuições aqui feitas são anotações putativas e para uma caracterização inequívoca dos compostos são necessárias análises adicionais que incluem comparações com padrões e/ou análises estruturais por RMN. Os metabólitos foram anotados levando em consideração as informações obtidas a partir da rede molecular, anotações do GNPS e *MSFinder*, bem como informações obtidas a partir dos espectros de MS² e comparações com dados da literatura.

As referências utilizadas nas comparações com os perfis de fragmentação dos íons analisados estão descritas na TABELA 5.4. Os *clusters* analisados foram numerados de N1 a N12 para aqueles obtidos no modo negativo de ionização e de P1 a P4 para aqueles obtidos no modo positivo de ionização. Os espectros de cada composto citado podem ser encontrados nos apêndices no final deste trabalho.

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a técnica de LC-MS/MS

Nº	tr (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (<i>m/z</i>)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
Taninos hidrolisáveis – <i>Cluster</i> N1								
1	5.8	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.1081 [M-H] ⁻	-2.56	769.08; 617.07; 447.05; 169.01	Pentagalolil hexosídeo	Bronze	36,37,76 *
2	6.22	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	1091.1188 [M-H] ⁻	-2.38	939.10; 769.08; 447,05; 617.07	Hexagalolil hexosídeo	-	36,37,76 *
3	6.53	C ₅₅ H ₄₀ O ₃₄	1243.1293 [M-H] ⁻	-2.57	939.10; 769.08; 617.07; 447,05	Heptagalolil hexosídeo	-	-
Flavonoides e ácidos elágicos – <i>Clusters</i> N2, N3, N4, P1 e P2								
4	5.18	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0823 [M-H] ⁻	-0.63	359.04; 317.03; 316.02; 271.02	Miricetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	-	77
5	5.54	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0978 [M-H] ⁻	-0.19	341.06; 323,05; 311.06; 283.06	Apigenina-6- <i>C</i> -glucosídeo (isovitexina)	Bronze	36,78 *
6	5.60	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	319.0450 [M+H] ⁺	1.38	290.03; 263.05; 245.04; 165.02; 153.02; 137.02;	Miricetina	-	77,79
7	5.65	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0875 [M-H] ⁻	-0.43	316.02; 301.03; 300.02; 271.02; 255.03; 151.00	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (isoquercitrina)	Bronze	76 *
8	5.70	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9985 [M-H] ⁻	0.33	283.99; 257,01; 245,01; 229.01; 185,02; 173.02	Ácido elágico	Bronze	80 *
9	5.70	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	479.0822 [M+H] ⁺	0.92	303.05; 153.02	Quercetina-3- <i>O</i> -glucuronídeo	-	76 *
10	6.01	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0775 [M-H] ⁻	0.92	301.03; 300.03; 271.02; 255.03; 179.00; 151.00	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinosídeo (guajavarina)	Bronze	76 *
11	6.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0925 [M-H] ⁻	-0.67	301,03; 300,02; 285.04 284.03; 255.02; 151.00	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (quercitrina)	Bronze	37,81 *

(continua)

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a

técnica de LC-MS/MS

(continuação)

Nº	tr (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
12	6.27	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0716 [M-H] ⁻	-0.87	342.64; 315.01; 300.99; 257.04; 232.00; 200.00; 169.01; 153.05	Ácido 3- <i>O</i> -metil elágico ramnosídeo	-	76
13	6.42	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.0818 [M-H] ⁻	-0.96	285.04; 284.03; 255.03; 227.03	Kaempferol-3- <i>O</i> -arabinosídeo	Bronze	77
14	6.68	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0978 [M-H] ⁻	-0.19	285,05; 284.03; 255.03; 227.03	Kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (afzelina)	Bronze	37,78 *
15	7.05	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	599.1030 [M-H] ⁻	-1.17	447.09; 301.03; 151.00; 121,03	Quercetina 3- <i>O</i> - (2''-galoil)- α -L-ramnopiranosídeo	Gold	36,76 *
16	7.20	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	479.1187 [M+H] ⁺	0.67	317.06; 301.02	Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	-	77
17	7.72	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0505 [M+H] ⁺	0.07	285.00; 274.05; 257.04; 229,05; 165,02; 153.01	Quercetina	Bronze	36,77,79 *
Catequinas e derivados – <i>Clusters</i> N5 e P3								
18	0.82 e 1.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0659 [M-H] ⁻	-0.66	219.06; 203,04; 179.03; 167.03; 137.02; 125.02	(<i>Epi</i>)galocatequina	-	76,82-84 *
19	5.08	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	319.0451 [M-H] ⁻	-0.94	193.01; 179.00; 151.00; 125.02	Diidromiricetina	-	85
20	4.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0711 [M-H] ⁻	-0.35	245.08; 203,07; 187.04; 151.04; 125.02; 109.03	Epicatequina	Bronze	82,86 *
21	4.95	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	459.0925 [M+H] ⁺	0.65	307.08; 289.07; 153.02; 139.04	(<i>Epi</i>)galocatequina-3- <i>O</i> -galato	-	76,87 *
22	5.83	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443.0975 [M+H] ⁺	0.86	291.09; 139.04	(<i>Epi</i>)catequina-3- <i>O</i> -galato	-	80,86 *

(continua)

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a técnica de LC-MS/MS

(continuação)

Nº	tr (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
23	6.06	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0508 [M-H] ⁻	0.99	285.04; 217.05; 151.00; 125.02	Taxifolina	Bronze	78,88
Ácidos graxos – Cluster N6								
24	8.24	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327.2169 [M-H] ⁻	-0.61	229.14; 211.13; 171.10	Derivado do composto 25 com uma insaturação	-	-
25	8.71	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2324 [M-H] ⁻	-1.21	229.14; 211.13; 171.10	Ácido 9,12,13- trihidroioctadecaenoico	-	37,76 *
26	10.11	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	343.2479 [M-H] ⁻	-1.46	211.13; 171.10	Derivado do composto 25 com alongamento de cadeia	-	-
Ácido quínico e derivados – Clusters N7 e P4								
27	0.77 e 1.68	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.0658 [M-H] ⁻	-2.04	191.06; 169.01; 125.02	Teogalina (isômeros)	-	76,83 *
28	4.25	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0869 [M-H] ⁻	-1.13	191.06; 179.03; 173.04; 135.04	Ácido 5-O-cafeoilquínico	Bronze	83
29	4.25 e 4.72	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0556 [M-H] ⁻	0.00	173.05; 127.04; 93.03; 85,03	Ácido quínico (isômeros)	Bronze	36,76,79,86 *
30	4.72	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0869 [M-H] ⁻	-1.13	191.06; 161.02	Ácido clorogênico	Bronze	76,78 *
31	4.87	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0923 [M-H] ⁻	0.00	191.06; 163.04; 119.05; 93.03	Ácido 5-O-coumaroilquínico	Bronze	76,83 *

(continua)

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a técnica de LC-MS/MS

(continuação)

Nº	t _R (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
32	5.39	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	369.1172 [M+H] ⁺	3.82	117.05; 163.04; 145.03; 117.03; 89.04	Ácido 5- <i>O</i> -feruloilquínico	-	76 *
Chalconas – Clusters N8 e N9								
33	6.79	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₄	687.1694 [M-H] ⁻	-2.91	525.12; 507.10; 415.08; 389.10; 371.09; 353.08; 321.04; 253.09; 135.01; 109.03	Urundevina A, J ou matosina hexosídeo	-	-
34	7.19	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	541.1127 [M-H] ⁻	-1.48	523.10; 479.10; 413.06; 387.08; 369.08; 345.07; 251.07; 135.01; 109.03	Urundevina C ou urundevina G	-	79,80,89,90 *
35	7.62	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0556 [M-H] ⁻	0.00	259.06; 163.00; 151.00; 135.04; 125.02	Chalcona eriodictiol	-	91
36	7.7; 9.75 e 8.74	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	523.1022 [M-H] ⁻	-1.34	413.06; 387.08; 369.07; 293.04; 251.07; 135.01; 91.02	Urundevina B, D ou F (isômeros)	-	37,76,79,90 *
37	7.86	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	539.0967 [M-H] ⁻	-2.04	429.06; 403.08; 385.07; 293.04; 267.06; 135.01	Urundevina E ou H	-	80,90 *
38	8.04 e 8.61	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	525.1182 [M-H] ⁻	-0.76	415.08; 389.10; 371.09; 353.08; 253.09; 135.01; 109.03; 91.02	Urundevina A, J ou matosina	-	76,79,89,90 *

(continua)

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a técnica de LC-MS/MS

(continuação)

Nº	tr (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
39	8.14	C ₄₉ H ₄₈ O ₂₆	1051.2396 [M-H] ⁻	4.38	525.12; 507.10; 415.08; 389.10; 371.09; 321.04; 252.09; 135.01; 109.03	Urundevina A, J ou matosina dimérica	-	-
40	9.07	C ₂₃ H ₁₆ O ₆	387.0866 [M-H] ⁻	-0.78	251.07; 135.01; 91.02	Urundevina I	-	90 *
Ácido gálico e derivados – <i>Clusters</i> N10 e N11								
41	0,87 1,68 e 4,30	C ₇ H ₆ O ₅	169.0138 [M-H] ⁻	0.59	125.02; 107.01; 97.03; 79.02	Ácido gálico	Bronze	36,79,80 *
42	4.3; 5.75 e 6.22	C ₈ H ₈ O ₅	183.0293 [M-H] ⁻	0.00	168.00; 124.02; 78.01	Galato de metila (isômeros)	-	36,37 *
43	4.31	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	321.0244 [M-H] ⁻	-0.93	169.01; 125.02; 79,02	Ácido digálico	-	36,76 *
44	5.55	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0451 [M-H] ⁻	0.51	169.00; 124.02; 78,01	Galato de etila	-	80
45	5.39	C ₂₁ H ₁₄ O ₁₃	473.0349 [M-H] ⁻	-1.48	247.01; 169.01; 125.02;	Trímero do ácido gálico	-	-

(continua)

TABELA 5.4 - Anotação putativa dos compostos encontrados nos caules, folhas e raízes de *Myracrodruon urundeuva* utilizando a técnica de LC-MS/MS

(continuação)

Nº	tr (min.)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação	GNPS	Ref. ^a
			MS	Erro (ppm)	MS/MS			
46	5.75 e 6.22	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	335.0403 [M-H] ⁻	0.00	183.03; 168.01; 124.01	Digalato de metila (isômeros)	-	36 *
47	6.95	C ₂₂ H ₁₆ O ₁₃	487.0509 [M-H] ⁻	-0.82	335.04; 183.03; 124.02	Duas unidades de ácido gálico e um metil digalato ligados entre si	-	-
Ácidos anacárdicos – Cluster N12								
48	17.84	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.2116 [M-H] ⁻	0.00	273.22; 119.05; 106.04	Ácido Δ ^{13:1} anacárdico	-	-
49	18.23	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	343.2275 [M-H] ⁻	0.58	299.24; 119.05; 106.04	Ácido Δ ^{15:2} anacárdico	-	-
50	18.52	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	369.2429 [M-H] ⁻	0.00	325.25; 119.05; 106.04	Ácido Δ ^{17:3} anacárdico	-	76 *
51	18.93	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319.2274 [M-H] ⁻	0.31	275.24; 106.04	Ácido Δ ^{13:0} anacárdico	-	-
52	19.09	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	345.2434 [M-H] ⁻	1.45	301.25; 119.05; 106.04	Ácido Δ ^{15:1} anacárdico	-	76 *
53	19.31	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	371.2585 [M-H] ⁻	-0.27	327.27; 119,05; 106.04	Ácido Δ ^{17:2} anacárdico	-	76 *
54	20.33	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	347.2589 [M-H] ⁻	0.86	303.27; 106.04;	Ácido Δ ^{15:0} anacárdico	-	-
55	20.45	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	373.2740 [M-H] ⁻	-0.54	329.28; 119,05; 106.04	Ácido Δ ^{17:1} anacárdico	-	-

^a composto quando previamente relatado na literatura para a espécie *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. está indicado com um (*)

5.2.1. Taninos hidrolisáveis

O primeiro *cluster* analisado (*cluster* N1; FIGURA 5.16) é constituído por 4 nodos que representam taninos hidrolisáveis. O íon de m/z 939,1073 foi anotado pela plataforma do GNPS como o β -penta-*O*-galoil-glucose (um pentagaloil hexosídeo). A comparação espectral do íon com a literatura dada pelo GNPS, o *mirror match*, está descrita na FIGURA A3 (Apêndices). Os espectros de MS² do íon são apresentados na FIGURA A4.

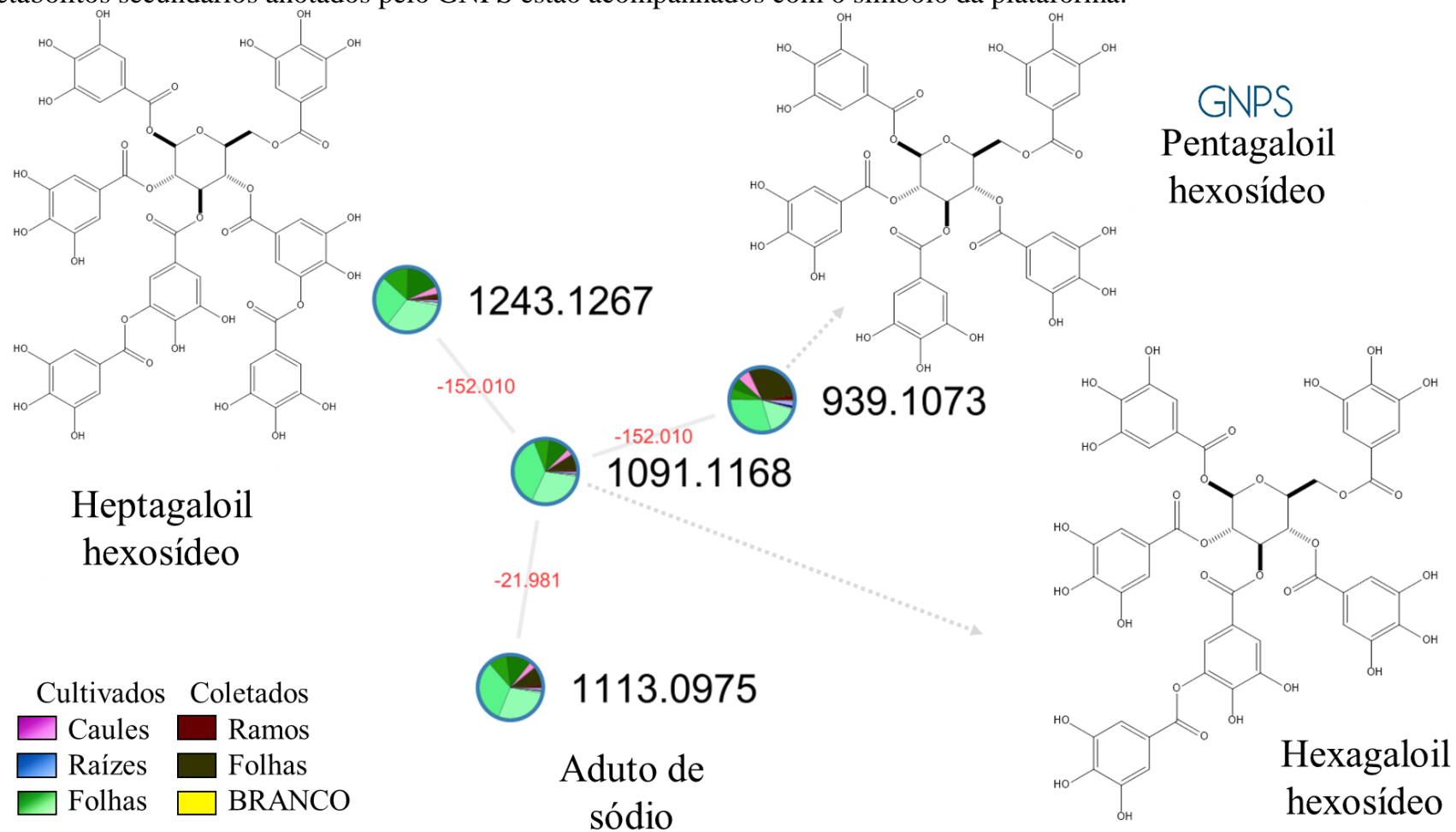
O íon de m/z 1091,1168 foi anotado como hexagaloil hexosídeo levando em consideração o perfil de fragmentação caracterizados principalmente pela presença de perdas neutras de 152,01 Da (FIGURA A5) e comparações com dados da literatura para a espécie *M. urundeuva*^{36,76}. Além disso, o íon apresentou uma diferença de massa de 152,0095 Da em relação ao pentagaloil hexosídeo no *cluster* N1 (FIGURA 5.16), indicando que os íons se diferenciam por uma unidade galoil.

O íon de m/z 1243,1267 foi anotado como heptagaloil hexosídeo devido à diferença de massa de 152,0099 Da em comparação ao hexagaloil hexosídeo (m/z 1097,1168), indicando a diferença de uma unidade galoil entre os dois íons. O padrão de fragmentação também apresenta sucessivas perdas neutras de unidades galoil (FIGURA A6).

A anotação pelo *MSFinder* indica que o íon de m/z 1113,0975 corresponde a um aduto de sódio formado pelo composto hexagaloil hexosídeo, [M-2H+Na]⁻, atribuição reforçada pela diferença de massa de 21,9807 Da entre os nodos (FIGURA 5.16).

Ao todo foram anotados 3 taninos hidrolisáveis, sendo o hexagaloil e o pentagaloil hexosídeo já relatados na literatura para a espécie^{36,76}. O espectro de massas de cada composto anotado foi comparado com dados da literatura e as referências utilizadas citadas na TABELA 5.4 (p. 79-84).

FIGURA 5.16 - *Cluster* dos taninos hidrolisáveis (N1) presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



5.2.2. Flavonoides

Para as amostras de aroeira-preta analisadas, foram encontrados 14 flavonoides, entre eles, nove compostos já estão relatados na literatura para a espécie: quercetina, quercetina-3-*O*-arabinosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-glucoronídeo, quercetina-3-*O*-(2''-galoil)- α -L-ramnopiranosídeo, kaempferol-3-*O*-ramnosídeo, apigenina-6-*C*-glucosídeo e ácido elágico^{36,76}. Os flavonoides kaempferol-3-*O*-arabinosídeo, miricetina, miricetina-3-*O*-glucosídeo, isoramnetina-3-*O*-glucosídeo e ácido 3-*O*-metil ácido elágico ramnosídeo foram relatados na espécie pela primeira vez.

O *cluster* N2 (FIGURA 5.17, p. 89), formado por sete nodos, representa os flavonoides *O*-glicosilados. Além da rede molecular auxiliar a anotação dos compostos, a análise dos flavonoides glicosilados baseou-se principalmente nos espectros de MS² dos íons e na observação das perdas neutras de 132,04; 146,06; 162,05 e 176,03 Da que resultam na formação dos íons fragmentos das agliconas, indicando a presença de um resíduo arabinosil, ramnosil, glucosil e glucuronosil respectivamente⁹².

Os íons de *m/z* 433,0758, 463,0861 e 447,0912 apresentaram em comum o íon fragmento de *m/z* 301,03 (FIGURA A7-A9), indicando que a quercetina é a aglicona presente em suas estruturas. As perdas neutras que levam ao fragmento da aglicona são 132,04, 162,05 e 146,06 Da, respectivamente. Assim sendo, os íons de *m/z* 433,0758, 463,0861 e 447,0912 foram putativamente identificados como quercetina-3-*O*-arabinosídeo (guajavarina), quercetina-3-*O*-glucosídeo (isoquercitrina) e quercetina-3-*O*-ramnosídeo (quercitrina).

A atribuição das posições de glicosilação dos flavonoides foi feita levando em consideração os levantamentos da literatura para a espécie. Além disso, os três íons foram anotados pela plataforma GNPS como guajavarina,

isoquercitrina e quercitrina, os quais corroboram as observações anteriores. O *mirror match* para cada anotação feita pelo GNPS está demonstrado nas FIGURA A10-A12 dos Apêndices.

Analisando os espectros de MS² do íon m/z 417,0801 (FIGURA A13) é possível observar a formação da aglicona kaempferol (m/z 285,04) com a perda neutra de uma unidade de arabinosil (132,04 Da). Dessa forma, o íon foi putativamente identificado como kaempferol-3-*O*-arabinosídeo. Este íon foi também anotado pela plataforma do GNPS como kaempferol-3- α -*L*-arabinopiranosídeo (*mirror match* na FIGURA A14, Apêndices).

O íon m/z 479,0806 foi putativamente identificado como miricetina-3-*O*-glucosídeo devido à perda neutra de 162,05 Da que resulta no fragmento da aglicona miricetina de m/z 317 (FIGURA A15). A anotação levou em consideração também a diferença de massa de 15,9945 Da em relação à quercetina-3-*O*-glucosídeo.

Os íons de m/z 431,10 (isômeros de m/z 431,0964 e 431,0966) foram observados em dois tempos de retenção distintos, $t_r = 6,68$ e $5,54$ min., sendo o primeiro pertencente ao *cluster* N2 e o segundo observado como um *cluster* de nodo único (*cluster* N3; FIGURA 5.18, p. 90). Os íons correspondem a um metabólito de fórmula molecular C₂₁H₂₀O₁₀ formado a partir da afzelina ou isovitexina.

FIGURA 5.17 - *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N2) presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

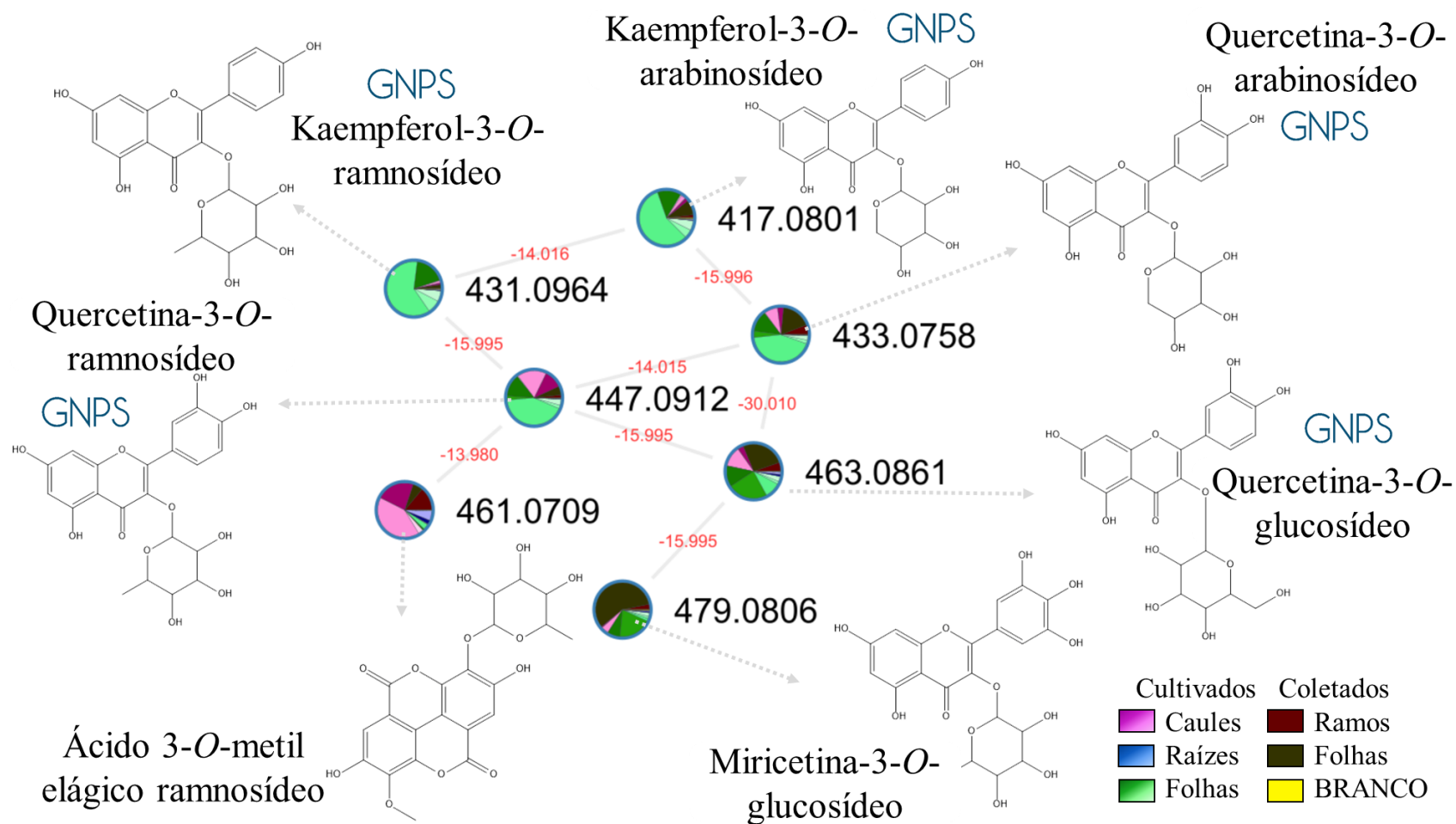
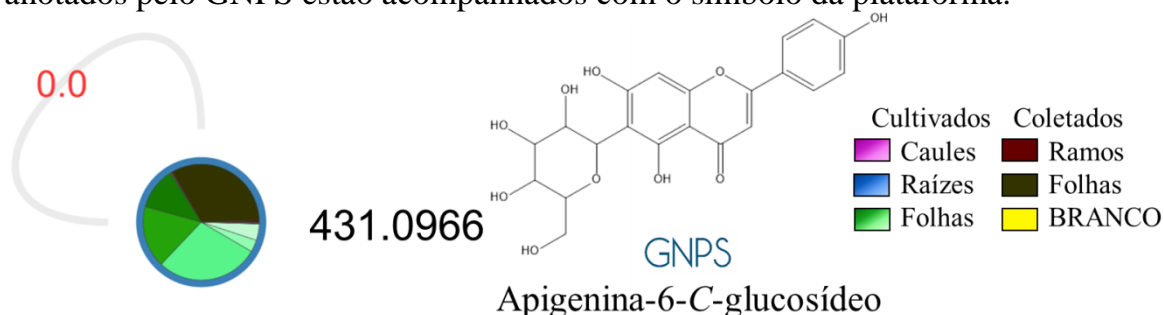
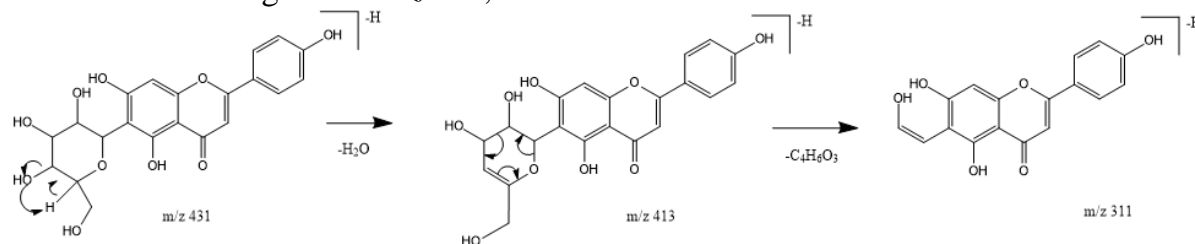


FIGURA 5.18 - *Cluster* de nodo único (N3) formado pelo íon de m/z 431,10, observado na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



O espectro de MS^2 para o íon m/z 431,0964, $tr = 6,68$ min., presente no *cluster* N2 (FIGURA A16) apresenta o íon fragmento de m/z 285,04 resultante da perda neutra de uma unidade ramnosil (146,06 Da), sendo então anotado como kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (afzelina). Por outro lado, o íon m/z 431,0966, $tr = 5,54$ min. (FIGURA 5.18), foi putativamente identificado como apigenina-6-*C*-glucosídeo (isovitexina) devido ao seu íon fragmento mais intenso m/z 311,05 (FIGURA A17), oriundo da quebra do anel da glicose *C*-glicosilada à unidade de apigenina (FIGURA 5.19). A identificação putativa dos íons m/z 431,10, nos tempos de retenção 6,68 e 5,54 min., como afzelina e isovitexina, respectivamente, condizem com a anotação dada pelo GNPS (FIGURA A18 e A19).

FIGURA 5.19 - Mecanismo proposto para a quebra do anel de glicose da isovitexina levando ao íon fragmento m/z 311,05.



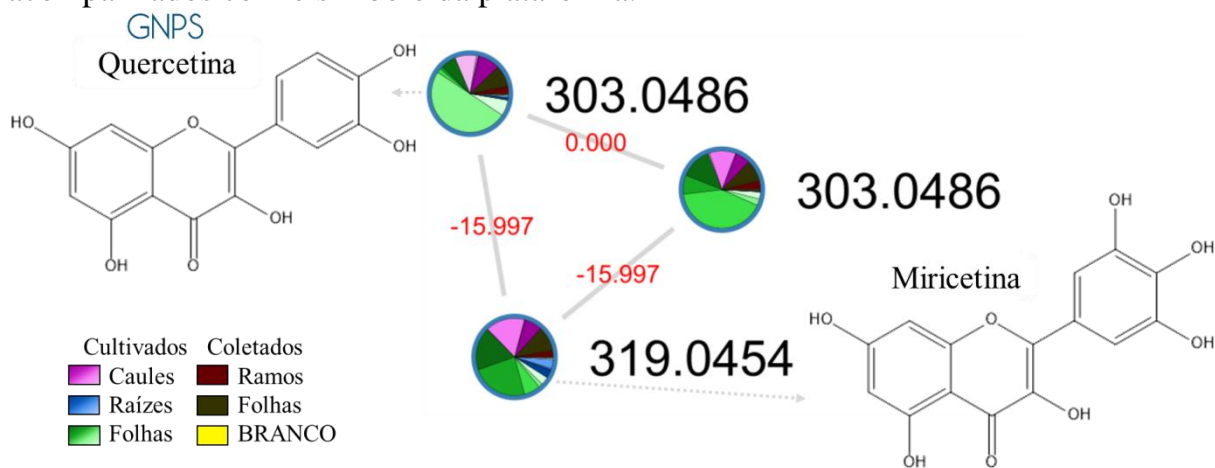
O íon m/z 461,0709 (FIGURA 5.17) nos leva a propor num primeiro momento, tratar-se do kaempferol-3-*O*-glucuronídeo, levando em consideração a diferença de massa de 13,9797 Da em relação à quercetina-3-*O*-ramnosídeo. A atribuição possui um erro menor que 5 ppm, porém ao analisar o espectro de massas é possível observar a perda neutra de uma unidade de ramnose (146,06), levando à formação do fragmento m/z 315,01 e inviabilizando a hipótese de se tratar do kaempferol-3-*O*-glucuronídeo. O fragmento m/z 315,01 foi atribuído como sendo um ácido 3-*O*-metil elágico (C₂₁H₁₈O₁₂) e dessa forma o íon m/z 461,0709 foi anotado como sendo o ácido 3-*O*-metil elágico ramnosídeo (FIGURA A20).

De forma complementar às observações feitas na rede molecular no modo negativo de ionização, a rede molecular no modo positivo permitiu a anotação de outros quatro flavonoides: quercetina (m/z 303,0486), miricetina (m/z 319,0454), quercetina-3-*O*-glucuronídeo (m/z 479,0971) e isoramnetina-3-*O*-glucosídeo (m/z 479,1171).

Os flavonoides quercetina e miricetina, já relatados na literatura para a espécie *Myracroduron urundeuva*^{36,79}, foram identificados no *cluster* P1 representado na FIGURA 5.20. O íon de m/z 303,0486, $t_r = 7,72$ min. (FIGURA A21), foi atribuída pelo GNPS como sendo a quercetina (*mirror match* na FIGURA A22). Por consequência, o íon de m/z 319,0454 foi putativamente identificado como miricetina levando em consideração seu padrão de

fragmentação (FIGURA A23) e a diferença de massa de 15,9968 Da em relação à quercetina (FIGURA 5.20).

FIGURA 5.20 - *Cluster* das agliconas quercetina e miricetina (P1) observado na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



Vários dos flavonoides glicosilados identificados na rede molecular no modo negativo também foram encontrados no *cluster* P2 da rede molecular no modo positivo (FIGURA 5.21, p. 94). Neste *cluster*, além dos flavonoides glicosilados anteriormente descritos, foi possível observar outros dois metabólitos representados pelos íons de m/z 479,091 e 479,1171.

O espectro de MS^2 do íon m/z 479,0791, no modo positivo, apresenta pico base de m/z 303 (FIGURA A24) relativo à alicona da quercetina. Esse fragmento é resultante da perda neutra de 176,03 Da, característica de um resíduo glucuronosil. Assim, o íon m/z 479,0791 foi putativamente identificado como quercetina-3-*O*-glucoronídeo, já relatada na literatura para a espécie⁷⁶.

Analisando o *cluster* P2 (FIGURA 5.21, p. 90), o íon m/z 479,1171 apresenta uma diferença de massas de 14,0175 Da em relação à quercetina-3-*O*-glucosídeo, que pode corresponder à uma metilação na hidroxila da aglicona. Ao

analisar o espectro de MS² do íon (FIGURA A25) foi possível observar o pico base em m/z 317,07, característico da aglicona isoramnetina. A formação da aglicona é resultado da perda neutra de 162,05 Da, indicando a presença de um resíduo glicosila. Levando essas informações em consideração, o íon foi anotado como isoramnetina-3-*O*-glucosídeo.

Com o processamento dos dados obtidos no modo negativo de ionização, a plataforma do GNPS apresentou ainda a anotação de mais dois compostos: o ácido elágico m/z 300,9980 com confiabilidade bronze (*mirror match* FIGURA A26) e a quercetina-3-*O*-(2''galoil)- α -*L*-ramnopiranosídeo m/z 599,1013 com confiabilidade ouro (*mirror match* FIGURA A27). Ambos os metabólitos secundários foram encontrados no *cluster* N4 (FIGURA 5.22, p. 95).

A quercetina-3-*O*-(2''galoil)- α -*L*-ramnopiranosídeo já foi relatada para a espécie *Myracrodruon urundeuva* por Aquino et al.³⁶. O espectro de massas desse íon é caracterizada principalmente pela presença do íon aglicona m/z 301,03 (FIGURA A28). A perda neutra de 152,01 Da com formação do fragmento m/z 447,09 e ausência de um fragmento m/z 453,05 (perda neutra de ramnosil 146,05 Da) indica que a unidade ramnosil está ligada diretamente à aglicona e a unidade galoil está ligada ao ramnosídeo.

No total foram anotados 14 flavonoides e as fragmentações anotadas neste estudo foram comparadas com os dados descritos na literatura (TABELA 5.4, p. 79-84).

FIGURA 5.21 - *Cluster* dos flavonoides glicosilados (P2) obtido a partir da rede molecular no modo positivo de ionização. Estão descritos em cinza os compostos já anotados a partir da rede molecular no modo negativo. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

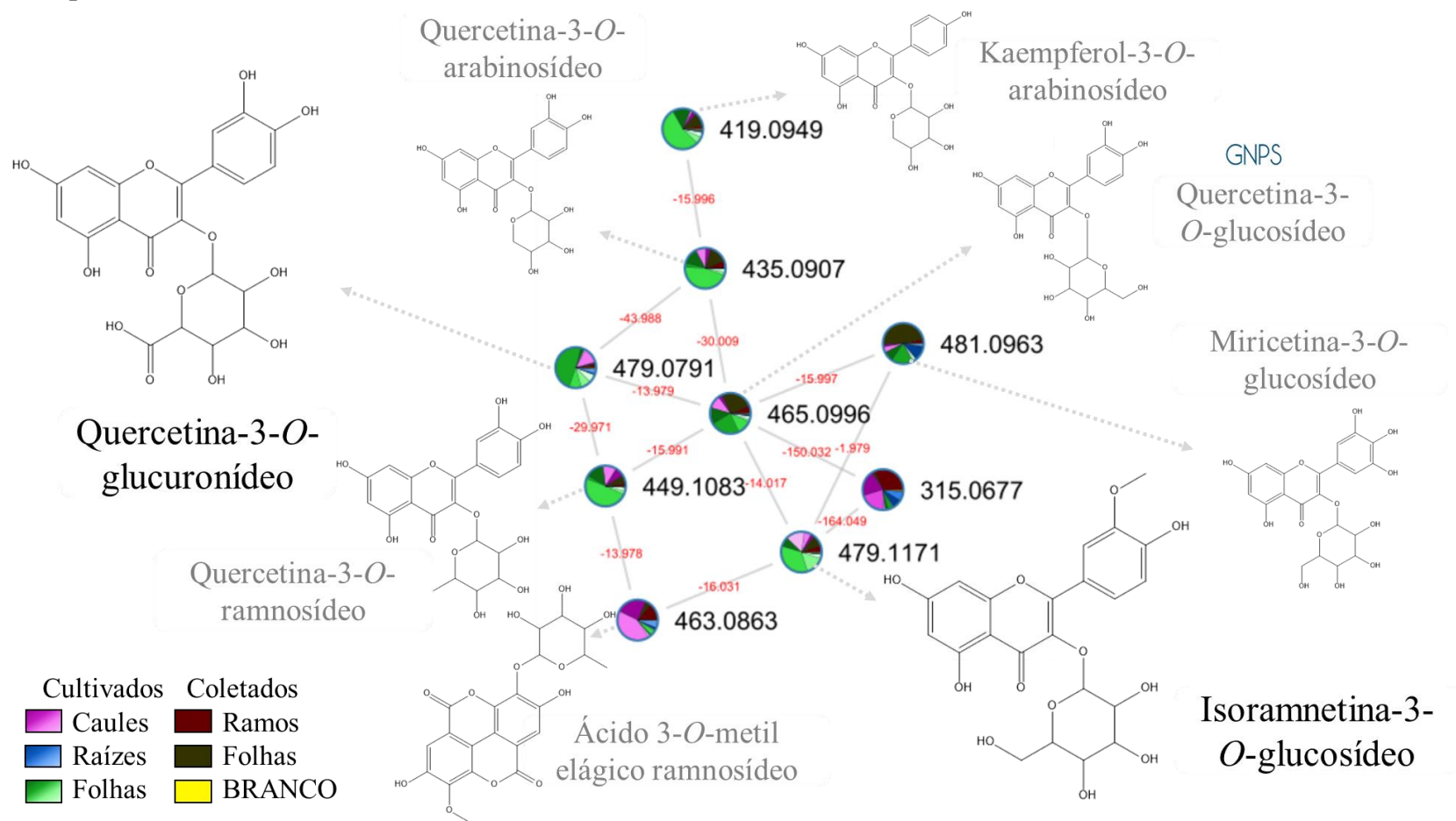
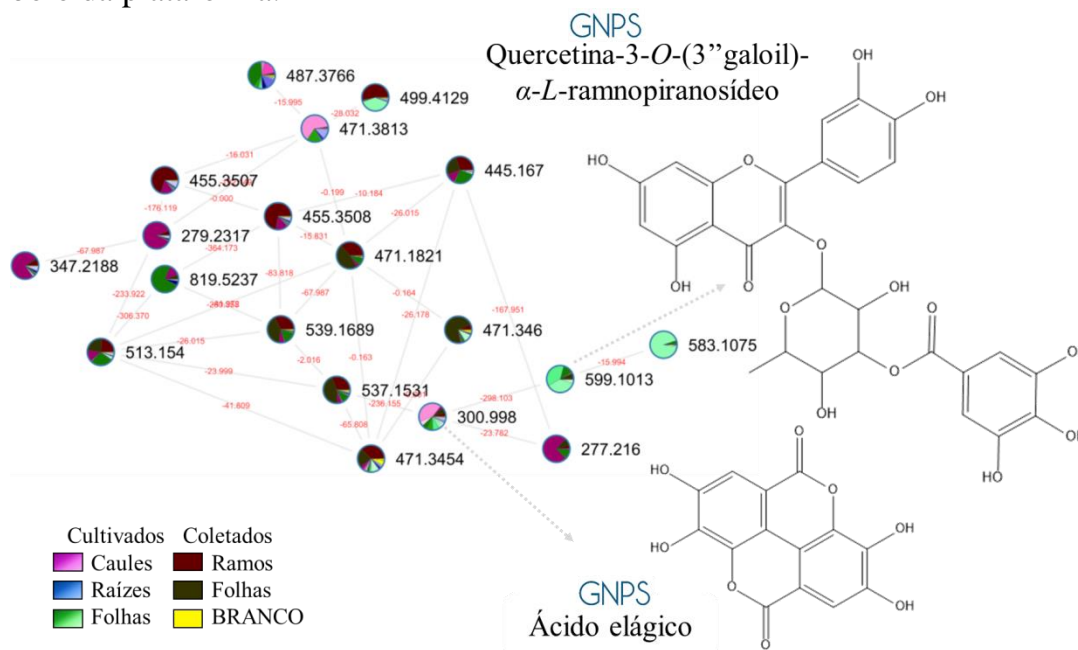


FIGURA 5.22 - *Cluster* do ácido elágico (N4) presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



5.2.3. Catequinas e derivados

Formado por sete nodos, o *cluster* N5 que compreende as catequinas e derivados (FIGURA 5.23, p. 97) apresentou isômeros de m/z 305,06, relativos a epigalocatequina e/ou galocatequina, já relatados na literatura para a espécie⁷⁶. Os espectros de massas dos íons isoméricos m/z 305,06 (FIGURA A30-A32) apresentaram perda neutra de 168,04 Da levando ao fragmento de m/z 137,02, resultante da fragmentação via de retro Diels-Alder no anel C⁹². O íon m/z 305,06, $t_r = 3,04$ min., foi anotado pelo GNPS como sendo a (*epi*)galocatequina (*mirror match* FIGURA A33).

O íon de m/z 289,0702 foi tentativamente identificado como (*epi*)catequina pela diferença de massa de 15,9950 Da em relação à (*epi*)galocatequina, massa correspondente a um átomo de oxigênio. No espectro de massas (FIGURA A34) observou-se a perda neutra de 152,01 Da,

característica para o composto, resultando no fragmento m/z 137,02 através da fragmentação por RDA no anel C⁹². A plataforma do GNPS fez a anotação do íon m/z 289,0702 como sendo a (*epi*)catequina com grau de confiabilidade bronze (*mirror match* FIGURA A35).

O íon m/z 319,0448 foi atribuído como diidromiricetina. De acordo com a rede molecular, a molécula se diferencia da (*epi*)galocatequina por apresentar uma carbonila ou carboxila a mais em sua estrutura, devido à diferença de massa de 13,9798 Da. Analisando os espectros de massas (FIGURA A36) foi possível detectar o fragmento m/z 301,04 resultante da perda de água e formação da dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Os íons m/z 125,02 e 193,01 também aparecem no espectro de massas e esses fragmentos são resultantes da quebra da ligação entre os carbonos 2 e 1' (FIGURA 5.24, p. 98).

FIGURA 5.23 - *Cluster* das catequinas e derivados (N5), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

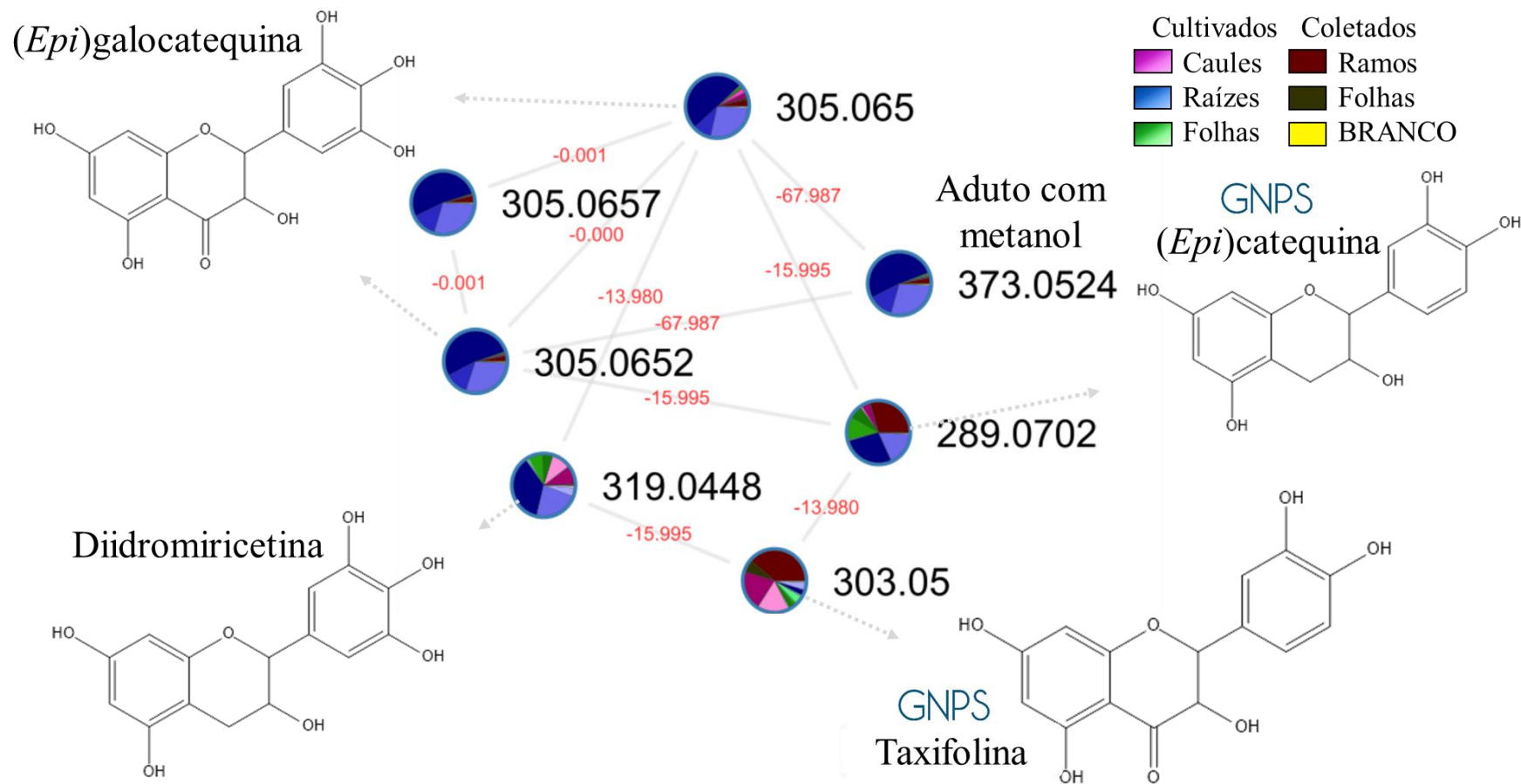
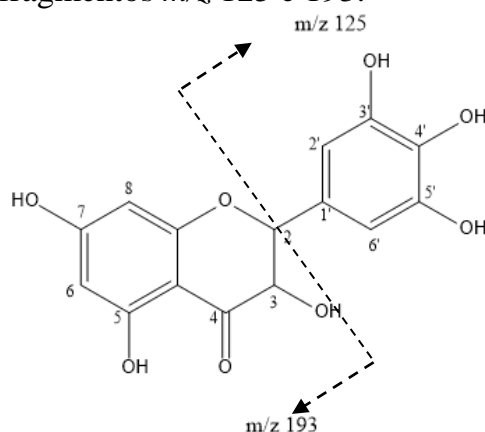


FIGURA 5.24 - Quebra da ligação entre os carbonos C2 e C1' da diidromiricetina levando à formação dos fragmentos m/z 125 e 193.

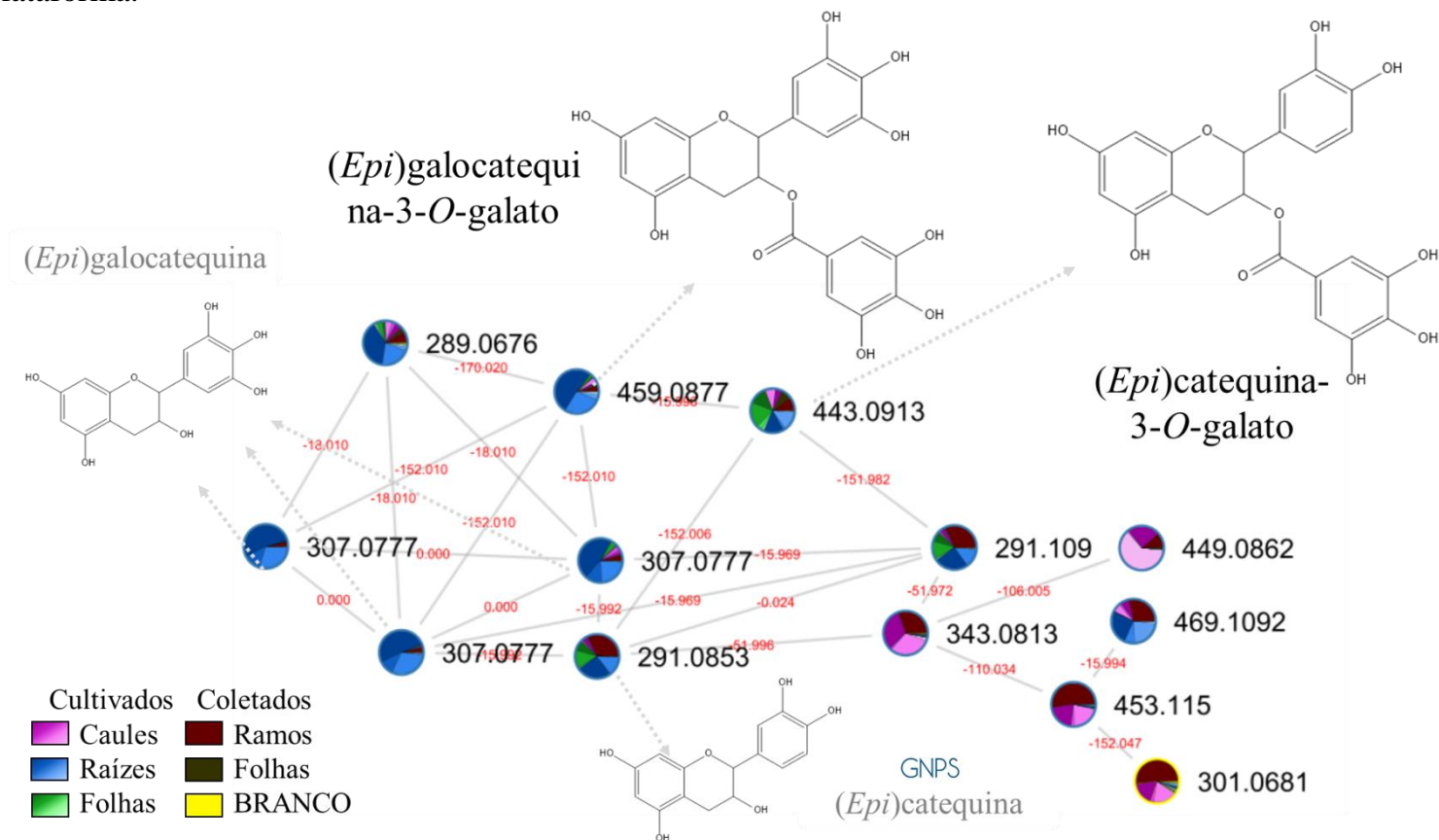


A taxifolina foi atribuída ao íon m/z 303,0500 pela diferença de massa de 15,9948 Da em relação à dihidromiricetina e de 13,9798 Da em relação à (*epi*)catequina (FIGURA 5.23). As perdas neutras de H₂O e CO podem ser observadas pela formação dos íons m/z 285,04 e 257,05. A fragmentação via retro Diels-Alder também foi observada no espectro de MS² (FIGURA A37), resultando no fragmento m/z 151,00. A atribuição está de acordo com a anotação feita pelo GNPS (FIGURA A38).

No modo positivo de ionização, foi possível detectar outros dois derivados da catequina que foram putativamente identificados como (*epi*)galocatequina-3-*O*-galato e (*epi*)catequina-3-*O*-galato (FIGURA 5.25).

Os íons m/z 459,0877 e 443,0913 foram anotados como (*epi*)galocatequina-3-*O*-galato e (*epi*)catequina-3-*O*-galato levando em consideração a diferença de massas correspondente a uma unidade galoil (152,01 Da) entre a (*epi*)galocatequina e (*epi*)catequina. Nos espectros de MS² (FIGURA A39 e A40) é possível observar a perda neutra de uma unidade galoil (152,01 Da) e a posterior fragmentação via retro Diels-Alder.

FIGURA 5.25 - *Cluster* das catequinas e derivados (P3) obtido a partir da rede molecular no modo positivo de ionização. Estão descritos em cinza os compostos já anotados na rede molecular do modo negativo. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO). Metabólitos secundários anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



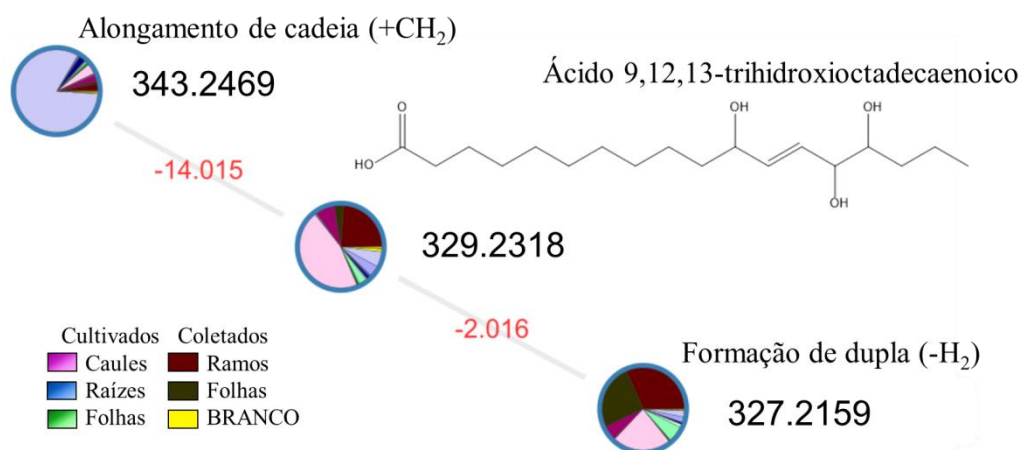
Entre os seis compostos anotados neste *cluster*, dois são relatados pela primeira vez para *M. urundeuva*: a taxifolina e a diidromiricetina. Os padrões de fragmentação de cada composto putativamente anotados nessa seção foram comparados com dados descritos na literatura (TABELA 5.4, p. 79-84).

5.2.4. Ácidos graxos

O *cluster* N6 formado por ácidos graxos (FIGURA 5.26) é composto por três nodos, dentre eles o íon de m/z 329,2318. Castro et al. (2020)⁷⁶, durante seu estudo metabolômico em busca de biomarcadores com potencial citotoxicidade a partir de extratos de *Myracrodruon urundeuva*, detectou o íon m/z 329,2318 que foi putativamente identificado como ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico. Devido à similaridade do padrão de fragmentação entre o íon encontrado por Castro et al. (2020)⁷⁶ e o íon m/z 329,2318 encontrado no *cluster* N5 (FIGURA A41), o íon m/z 329,2318 foi putativamente anotado como sendo o ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico.

Os íons m/z 343,2469 e 327,2159 conectam-se ao ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico na rede molecular por uma diferença de massa de 14,0151 e 2,0159 Da, respectivamente (FIGURA 5.26). Assim sendo, o íon m/z 343,2469 assemelha-se à estrutura do ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico com o alongamento de cadeia com uma unidade metileno (+ CH₂) e o íon m/z 327,2159 assemelha-se à estrutura citada pela presença de uma instauração (-H₂). Os espectros de MS² desses íons estão ilustrados na FIGURA A42 e A43, respectivamente.

FIGURA 5.26 - *Cluster* dos policetídeos (N6), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).



5.2.5. Ácido quínico e derivados

Os compostos que englobam o ácido quínico e seus derivados formam o *cluster* N7 (FIGURA 5.27, p. 103) e compartilham o mesmo íon fragmento m/z 191,0555 nos espectros de MS² no modo negativo de ionização, indicando a presença do ácido quínico em suas estruturas. Os íons m/z 191,0555 foram anotados como sendo isômeros do ácido quínico (FIGURA A44 e A45), condizente com a anotação feita pelo GNPS (FIGURA A46).

Perdas neutras características de unidades coumaroil, cafeoil e galoil foram anotadas para alguns íons presentes no *cluster* N7, sendo representados pelas perdas neutras de 146,04, 162,03 e 152,01 Da, respectivamente. Além disso, as unidades coumaroil, cafeoil e galoil também foram detectadas na forma de íons fragmentos representados pela m/z 163,04, 179,04 e 169,01, respectivamente, reforçando a presença dessas estruturas.

Dessa forma, o íon m/z 337,0912 foi anotado como ácido coumaroilquínico, uma vez que foi observado a formação do íon fragmento m/z

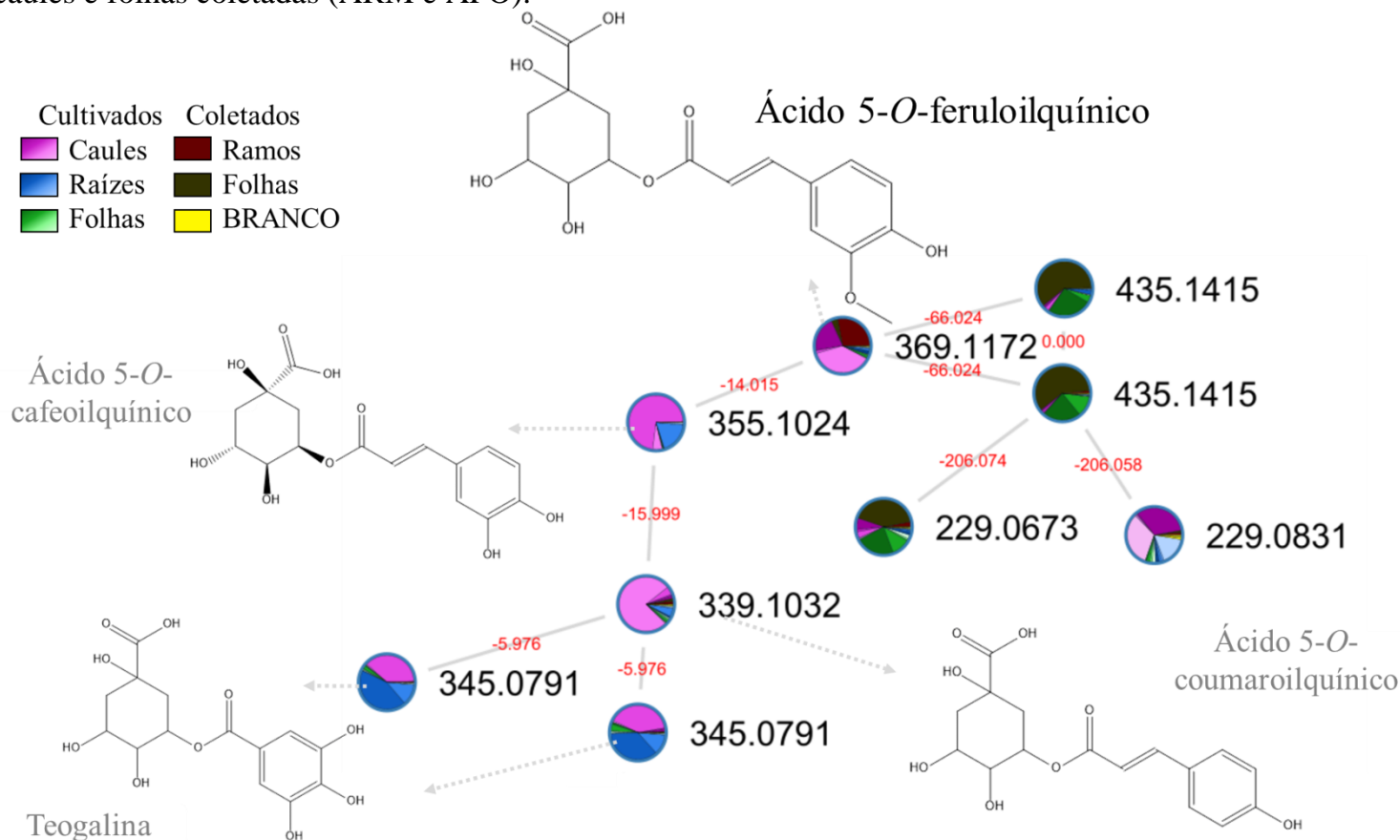
191,05 pela saída de uma unidade de coumaroil (FIGURA A47). A anotação feita condiz com a anotação dada pela plataforma do GNPS como ácido 3-*p*-coumaroilquínico (FIGURA A48).

O íon m/z 353,0869 foi identificado pela plataforma do GNPS como ácido 5-*O*-cafeoilquínico para o íon com $tr = 4,25$ min. (FIGURA A49) e ácido clorogênico para o íon com $tr = 4,72$ min. (FIGURA A50). Essas anotações condizem com os resultados observados nos espectros de massas das FIGURAS A51 e A52.

Nos espectros de massas dos isômeros de 343,0658 em $tr = 0,77$ e 1,68 min. (FIGURA A53 e A54) é possível observar uma perda neutra de 152,01 Da referente ao galoil, levando à formação do fragmento m/z 191,05. Dessa forma, os íons foram anotados como isômeros da teogalina.

Na rede molecular construída a partir dos dados do modo positivo de ionização, foi possível anotar um derivado de ácido quínico com m/z 369,1172 (FIGURA 5.28, p. 104). No espectro de MS^2 , observou-se a perda neutra de uma unidade de ácido quínico (192,06 Da) com a formação do íon m/z 177,05. Considerando o padrão de fragmentação observado no espectro de MS^2 e a diferença de massas de 14,0148 Da em relação ao ácido 5-*O*-cafeoilquínico (FIGURA A55), o íon m/z 369,1172 foi anotado como o ácido 5-*O*-feruloilquínico.

FIGURA 5.28 - *Cluster* do ácido quínico e derivados (P4) obtido a partir da rede molecular no modo positivo de ionização. Estão descritos em cinza os compostos já anotados na rede molecular do modo negativo O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).



O ácido quínico e seus derivados identificados putativamente já estão descritos na literatura para a espécie *Myracrodruon urundeuva*^{36,76,79}. O padrão de fragmentação de cada composto anotado foi comparado com dados da literatura e estão descritos na TABELA 5.4 (p. 79-84).

5.2.6. Chalconas

Foram observados dois *clusters* no modo negativo de ionização, N8 e N9 (FIGURA 5.29 e FIGURA 5.30), compostos majoritariamente por chalconas diméricas como as urundeuvinas^{76,79,89,90}.

Os íons m/z 525,12 (isômeros) correspondem à um composto de fórmula molecular $C_{30}H_{22}O_9$, podendo ser isômeros das urundeuvinas A, urundeuvinas J ou matosinas⁹⁰ (FIGURA 5.31, p. 108). Devido à similaridade na fragmentação desses isômeros (FIGURA A56 e A57) torna-se necessária uma análise mais detalhada sobre a identidade química dessas substâncias.

FIGURA 5.29 - *Cluster* das chalconas (N8), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).

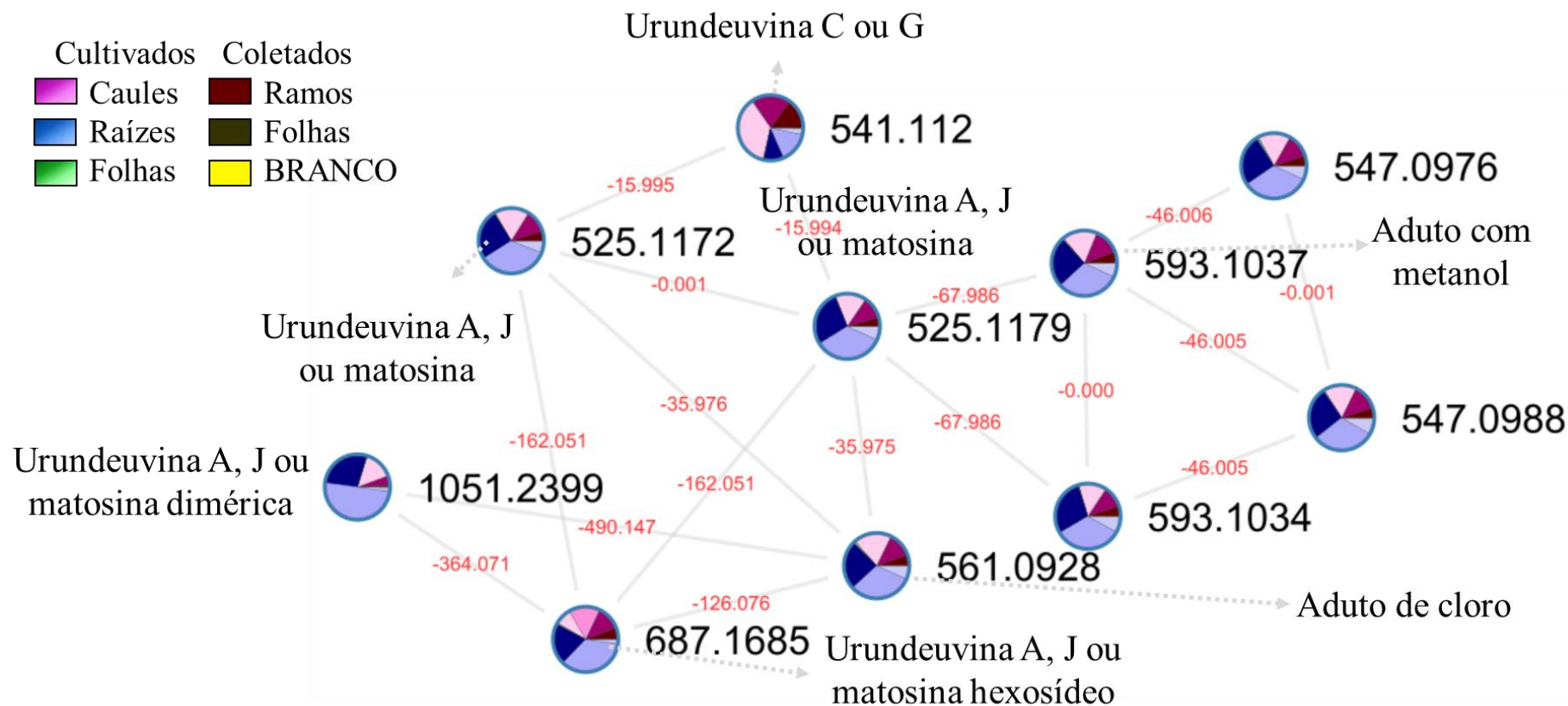


FIGURA 5.30 - *Cluster* das chalconas (N9), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).

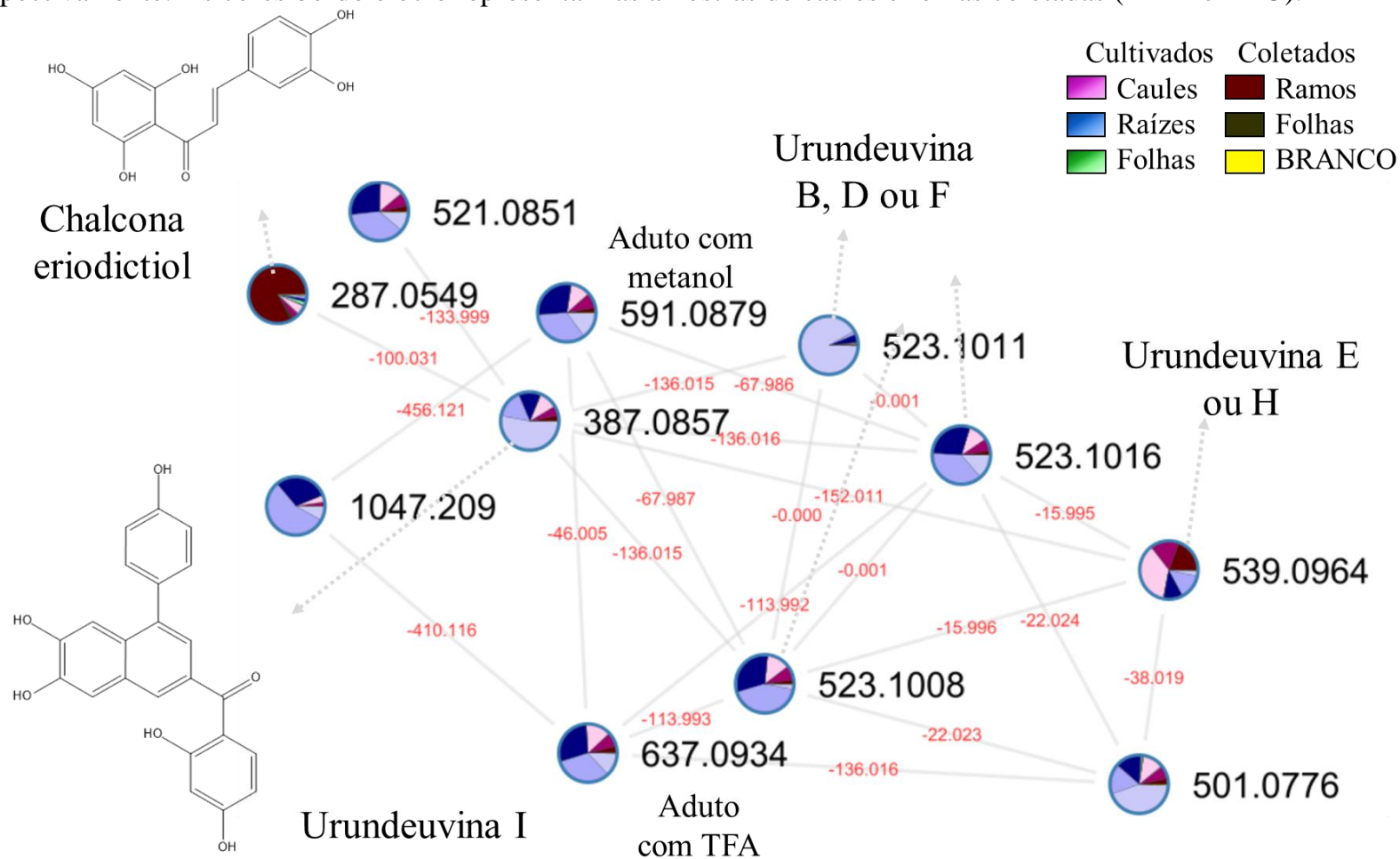
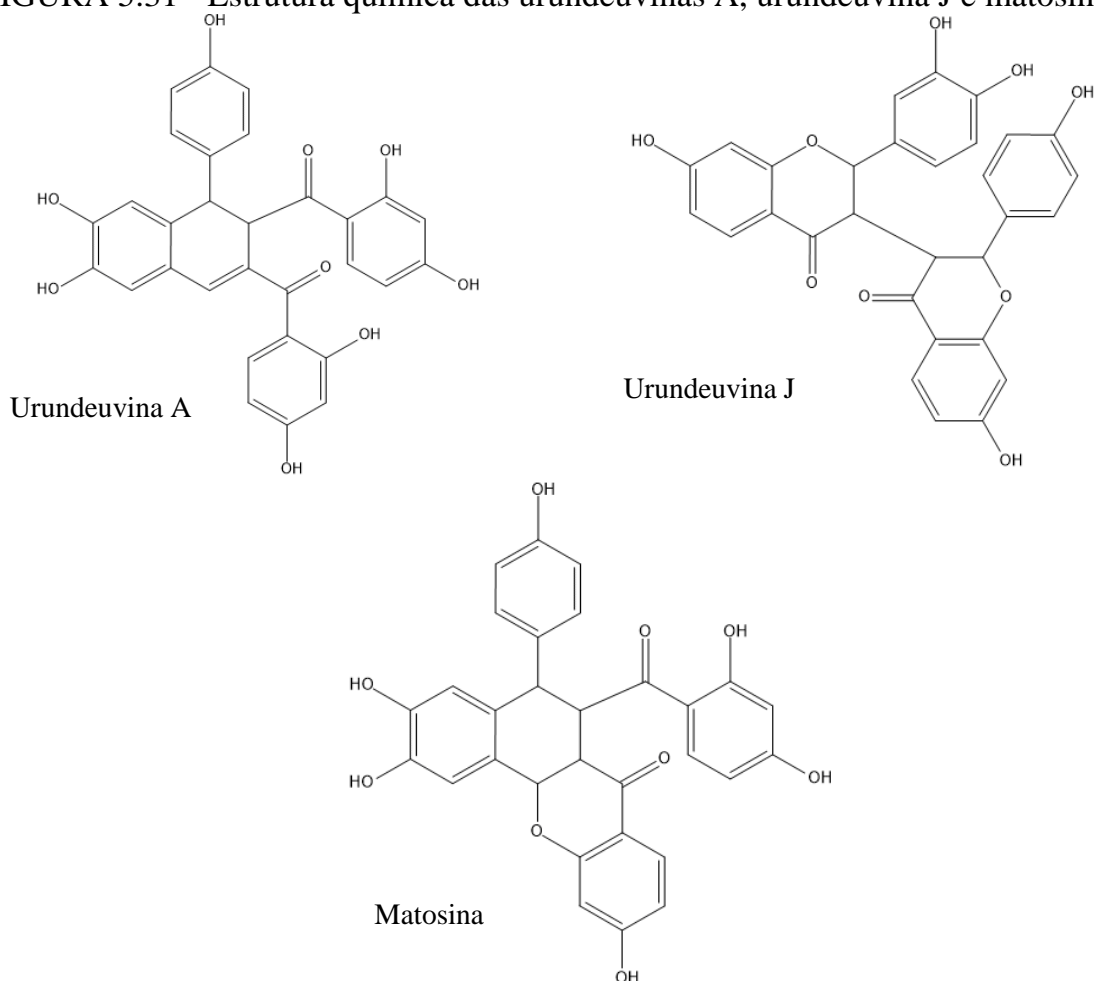
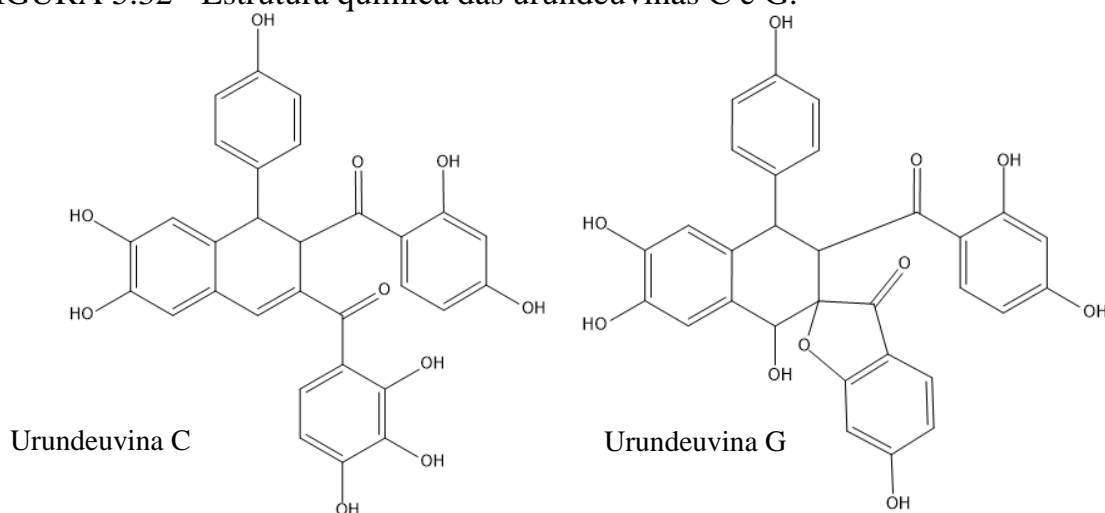


FIGURA 5.31 - Estrutura química das urundevinas A, urundevina J e matosina.



O íon m/z 541,1120 corresponde ao composto de fórmula molecular $C_{30}H_{22}O_{10}$, tratando-se, de acordo com os dados da literatura, das urundevina C ou urundevina G (FIGURA 5.32). Devido à falta de dados de fragmentação da urundevina C, não foi possível fazer afirmações mais específicas em relação ao íon m/z 541,1120, sendo necessária uma análise mais detalhada sobre a identidade química da substância. Os espectros de MS^2 estão representados na FIGURA A58 do apêndice.

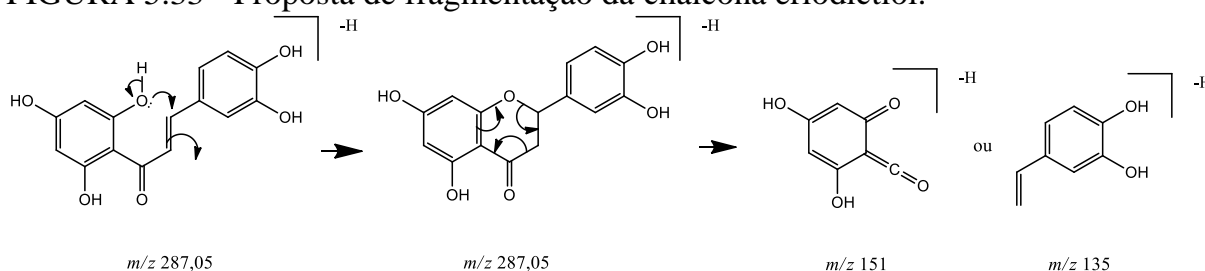
FIGURA 5.32 - Estrutura química das urundeuvinas C e G.



No segundo *cluster* das chalconas (FIGURA 5.30) foram analisados quatro íons distintos: m/z 287.0549, 387.0857, 523.1011, 523.1016 e 539.0964.

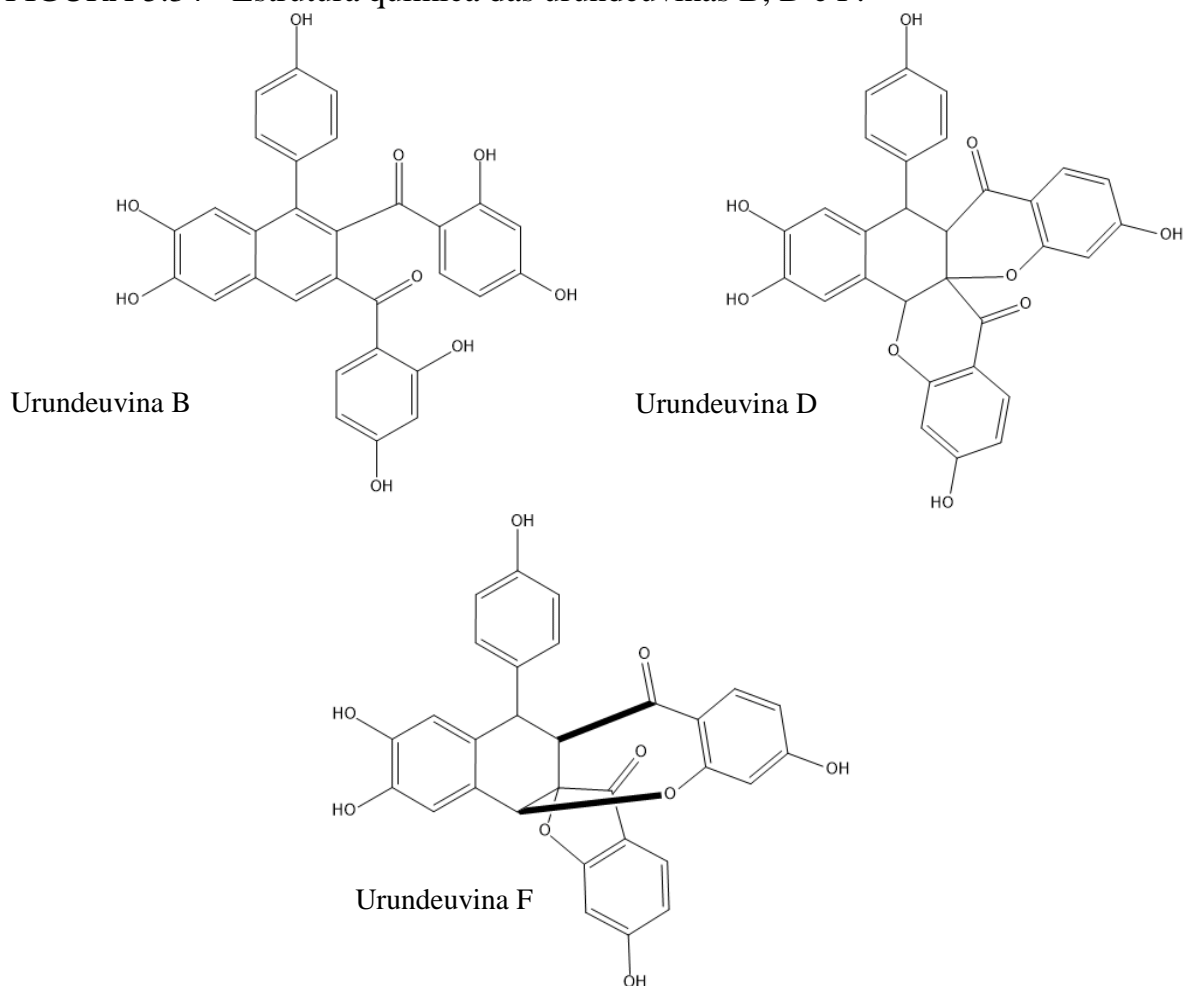
O íon m/z 287,0549 foi putativamente identificado como chalcona eriodictiol devido aos dois íons fragmentos mais intensos m/z 151.00 e 135.04 (FIGURA A59), os quais são fragmentos característicos da substância⁹¹. A proposta para formação dos fragmentos está representada na FIGURA 5.33.

FIGURA 5.33 - Proposta de fragmentação da chalcona eriodictiol.



Os íons m/z 523,10 (isômeros) correspondem ao composto de fórmula molecular $C_{30}H_{20}O_9$ atribuído, de acordo com dados da literatura, isômeros da urundeuvina B, D ou F⁹⁰ (FIGURA 5.34). Devido à similaridade na fragmentação entre esses isômeros (FIGURA A60 a A62), torna-se necessária uma análise mais detalhada sobre a identidade química dessas substâncias.

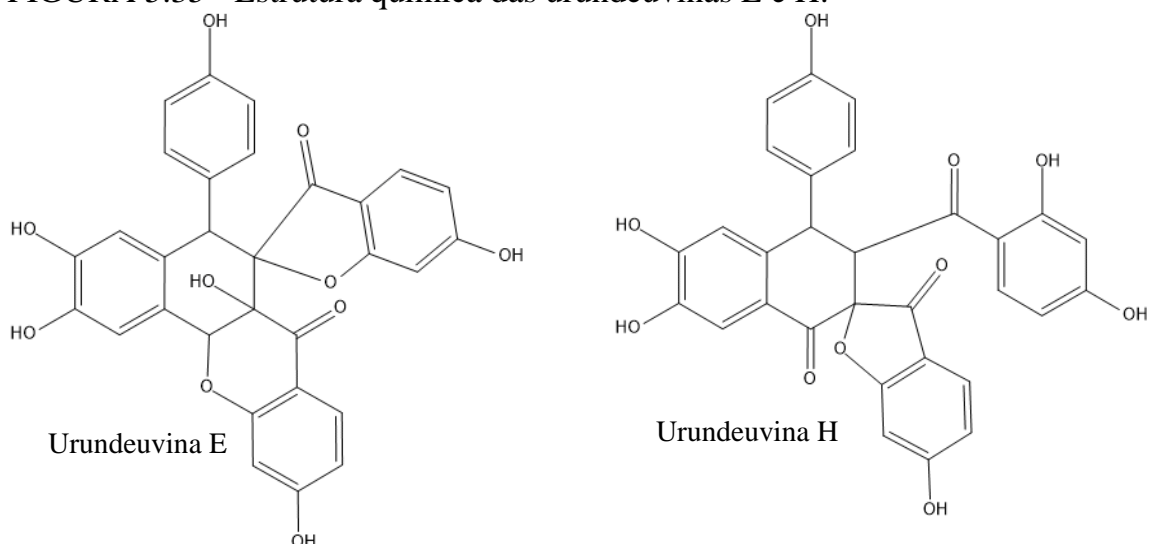
FIGURA 5.34 - Estrutura química das urundeuvinas B, D e F.



O íon m/z 539,0964 correspondem ao composto de fórmula molecular $C_{30}H_{20}O_{10}$ atribuído de acordo com dados da literatura aos isômeros da urundeuvina H ou E⁹⁰ (FIGURA 5.35). Devido à similaridade na fragmentação entre esses isômeros, torna-se necessária uma análise mais detalhada sobre a identidade química dessas substâncias.

O íon de m/z 387,0857 foi putativamente identificado como urundeuvina I baseados principalmente nos fragmentos de m/z 251,07, 135,01 e 91,01 (FIGURA A64) e comparações com dados da literatura⁹⁰.

FIGURA 5.35 - Estrutura química das urundeuvinas E e H.



As referências utilizadas nas comparações dos padrões de fragmentação para cada íon estão listadas na TABELA 5.4 (p. 79-84).

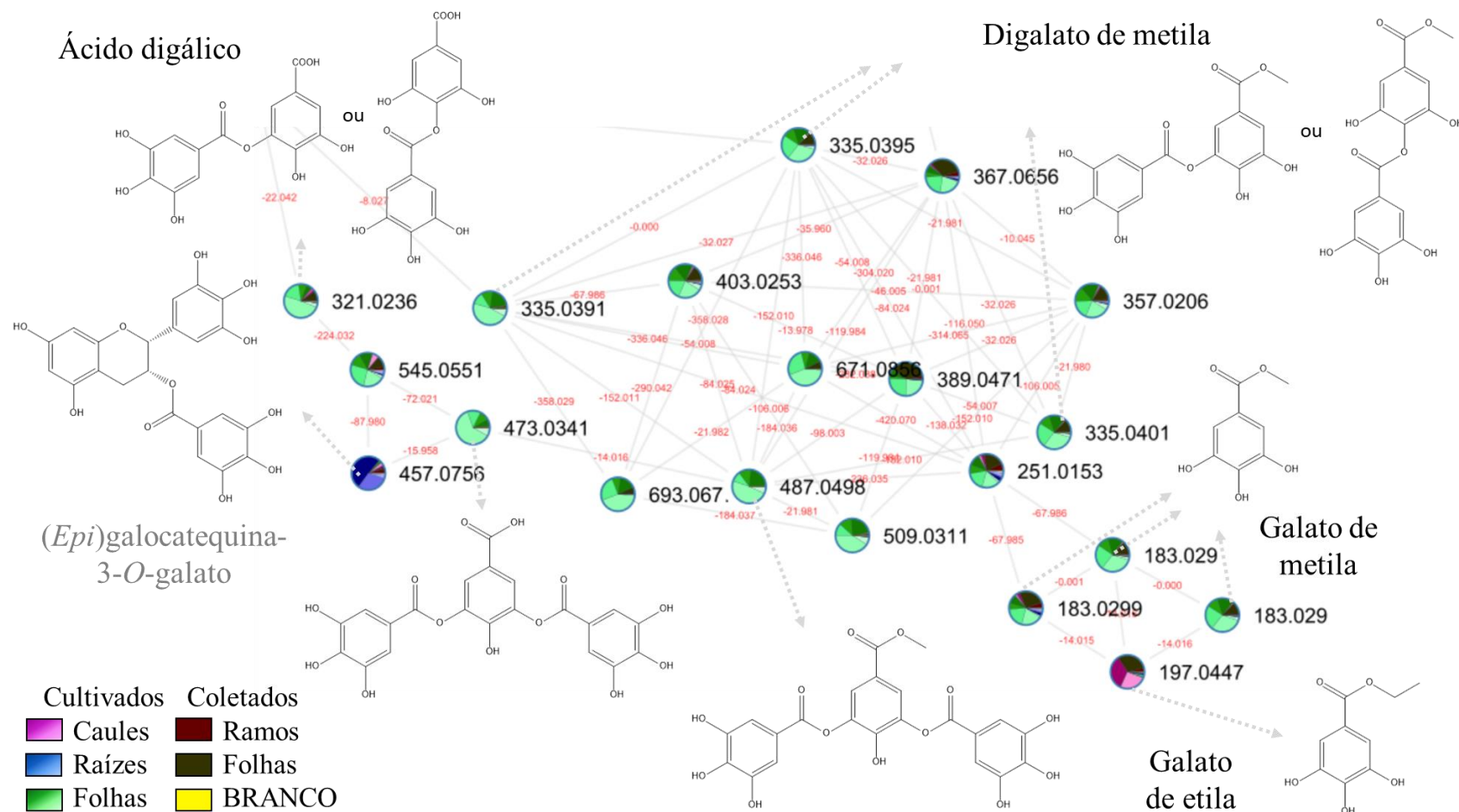
5.2.7. Ácido gálico e derivados

Os íons que compõem o *cluster* N10 (FIGURA 5.36) são caracterizados principalmente pela perda neutra de 152,01 Da, característico da presença de uma unidade galato.

Os íons de m/z 183,03 (isômeros) foram putativamente identificados como isômeros do galato de metila, justificado pela perda neutra de 15,02 Da (saída de uma metila radicalar), resultando no íon fragmento m/z 168,01, com subsequente perda de uma unidade de CO_2 gerando o íon fragmento m/z 124,02 (FIGURA A65 a A67).

De maneira similar, o íon m/z 197,0447 foi anotado como galato de etila devido à saída de uma unidade eteno, indicado pela perda neutra de 28,03 Da resultando no íon fragmento m/z 169,01, com posterior saída de uma unidade de CO_2 formando íon m/z 125,02 (FIGURA A68).

FIGURA 5.36 - *Cluster* dos derivados de ácido gálico (N10), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).



Os íons isômeros m/z 335,04 apresentaram uma perda neutra de 152,01 Da, levando à formação do íon fragmento m/z 183,03, indicando a presença de uma unidade galato ligada ao galato de metila. Dessa forma, os íons foram anotados como isômeros do metil digalato (metil *m*-digalato ou metil *p*-digalato) (FIGURA A69 a A71).

O íon m/z 321,0236 também apresentou uma perda neutra de 152,01 Da, levando à formação de um fragmento m/z 169,01 (FIGURA A72). Essa observação sugere que o íon é composto por duas unidades de ácido gálico, sendo então anotado como ácido digálico.

Analisando o espectro de MS² do íon m/z 487,0498 é possível observar a perda neutra de 152,01 Da levando à formação do fragmento m/z 335,04 (FIGURA A73); relativo a um possível fragmento do tipo metil digalato. Também se observou a saída de uma segunda unidade galato (152,01 Da) e a subsequente perda neutra de uma unidade CO₂ (43,99 Da). Assim, o íon precursor é composto por duas unidades de ácido gálico e uma de metildigalato.

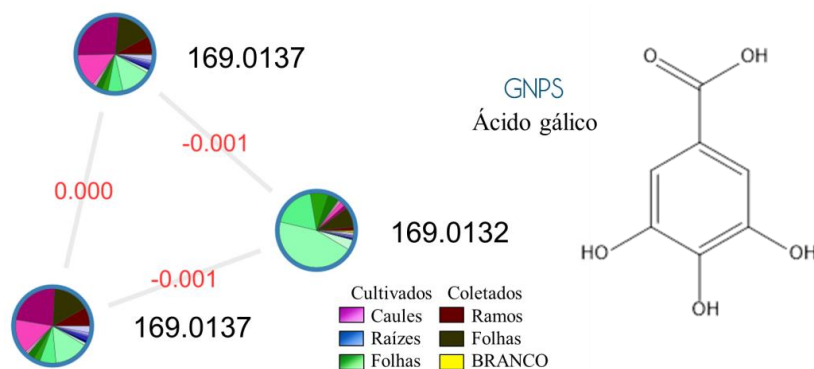
O íon m/z 473,0341 foi anotado como sendo uma molécula composta por três unidades de ácido gálico ligadas entre si, apresentando duas perdas neutras consecutivas de 152,01 Da resultando no íon de m/z 169,01 (FIGURA A74).

A partir do espectro de MS² do íon m/z 457,0756 foi possível observar a perda neutra de 152,01 Da, levando à formação do fragmento 305,07, correspondente à (*epi*)galocatequina. O íon m/z 457,0756 foi anotado como (*epi*)galocatequina-3-*O*-galato, previamente discutido na secção 5.2.3, porém no modo positivo de ionização.

O ácido gálico m/z 169,0132 foi encontrado em um *cluster* separado (FIGURA 5.37) caracterizado principalmente pela presença do íon base m/z 125,02, resultante da perda neutra de uma unidade de CO₂ (FIGURA A75 a

A77). Os três íons m/z 169,01 presentes no *cluster* N11 foram anotados pela plataforma do GNPS como ácido gálico (*mirror match* FIGURAS A78 a A80 do apêndice).

FIGURA 5.37 - *Cluster* do ácido gálico (N11), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).

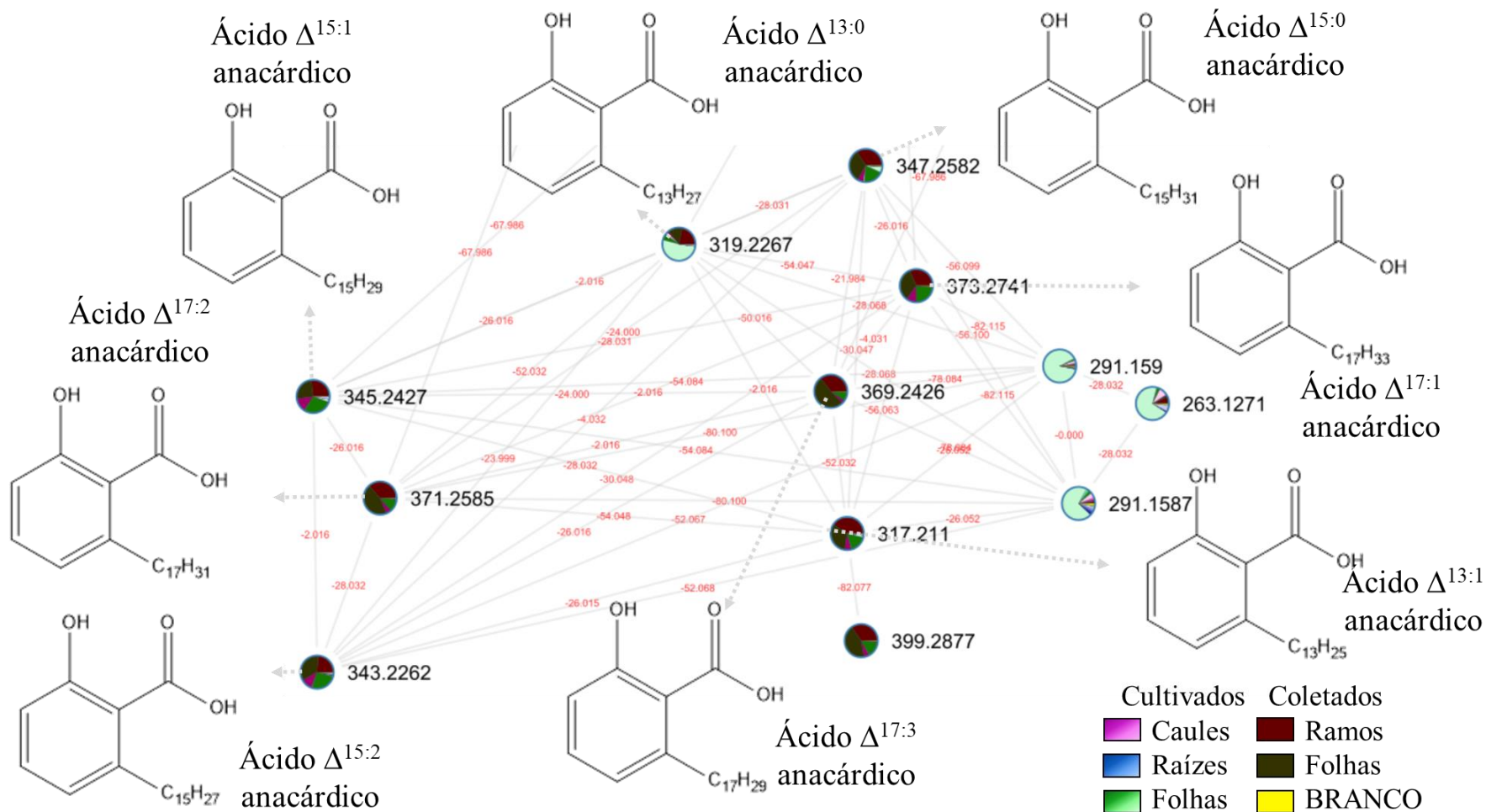


5.2.8. Ácidos anacárdicos

Nos extratos da aroeira-preta foram encontradas três ácidos anacárdicos já relatados na literatura por Castro et al. (2020)⁷⁶. São eles: Ácido anacárdico $\Delta^{15:1}$ anacárdico, ácido $\Delta^{17:3}$ anacárdico e ácido $\Delta^{17:1}$ anacárdico, agrupados no *cluster* N12 (FIGURA 5.38) resultando nos íons m/z 345,2427, m/z 369,2426 e m/z 371,2585, respectivamente.

Os íons que compõem o *cluster* N12 (FIGURA 5.38) assemelham-se principalmente pela perda neutra de uma unidade de CO_2 (43,99 Da), resultando na formação dos respectivos íons base de cada íon precursor. Os compostos também compartilham o íon m/z 106,04, resultante da saída de uma molécula de CO_2 seguida da fragmentação radicalar da cadeia alifática (FIGURA A81 a A88). Esses íons diferem entre si na rede molecular pela presença de uma insaturação (2,016 Da), pelo alongamento de cadeia (26,016 Da) ou pela ocorrência de ambos os fatores (28,032 Da).

FIGURA 5.38 - *Cluster* dos ácidos anacárdicos (N12), presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo negativo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de rosa, verde e azul representam as amostras dos caules, folhas e raízes da aroeira-preta cultivadas (ACA, AFL e ARZ), respectivamente. As cores bordô e ocre representam as amostras de caules e folhas coletadas (ARM e AFO).



5.3. Distribuição dos metabólitos secundários nos tecidos de *Myracrodruon urundeuva*

Para a análise da distribuição dos metabólitos secundários pelos tecidos da aroeira-preta, o processamento dos dados foi feito utilizando os dados adquiridos para as amostras dos extratos brutos (ARM, AFO, ACA, AFL e ARZ) na concentração de 0,1 mg/mL e as amostras do branco.

Alguns compostos não foram detectados durante esse processamento dos dados, como é o caso dos ácidos quínicos e derivados. Isso acontece devido à sua baixa concentração nas amostras dos extratos brutos. Tais compostos foram detectados a partir dos extratos fracionados por SPE (onde o efeito de matriz é menos acentuado), podendo ser anotados apenas durante o processamento de dados discutidos na seção 5.2, a partir das amostras obtidas no fracionamento descrito na seção 4.1.3.

Apesar de nem todos os compostos anotados na seção 5.2 serem detectados na rede molecular construída a partir dos extratos brutos, essa rede molecular possibilitou uma comparação relativa da distribuição de classes de metabólitos secundários nos tecidos da planta, uma vez que a comparação é feita entre os extratos brutos na mesma concentração.

A distribuição dos metabólitos foi analisada de acordo com a distribuição dada pelos *clusters* representados na FIGURA 5.39 a 5.44. Para uma visualização mais detalhada da distribuição de cada metabólito detectado durante o processamento dos dados, devemos analisar os gráficos em barras representados na FIGURA A89 a A117 do Apêndice.

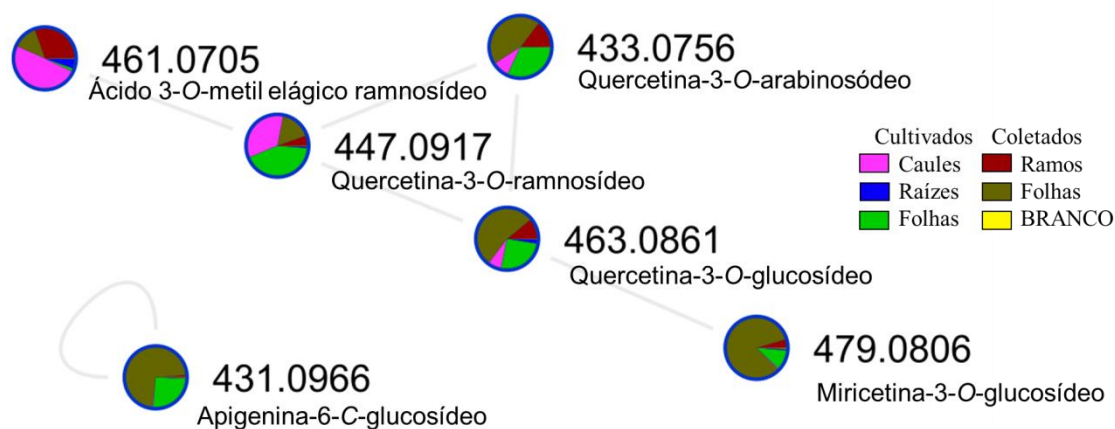
A FIGURA 5.39 representa a distribuição dos taninos hidrolisáveis que foram encontrados em maior abundância nas folhas da aroeira-preta, tanto em amostras coletadas quanto cultivadas (AFO e AFL).

FIGURA 5.39 - Distribuição dos taninos hidrolisáveis nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas.



Os flavonoides estiveram presentes, majoritariamente nas amostras das folhas coletadas e cultivadas, porém também foram encontrados em proporções menores nas amostras dos caules e ramos (FIGURA 5.40). Por outro lado, o ácido 3-*O*-metilelágico foi majoritário nos caules e ramos. Os flavonoides, de forma geral, foram pouco abundantes, ou até mesmo não detectados, nas raízes.

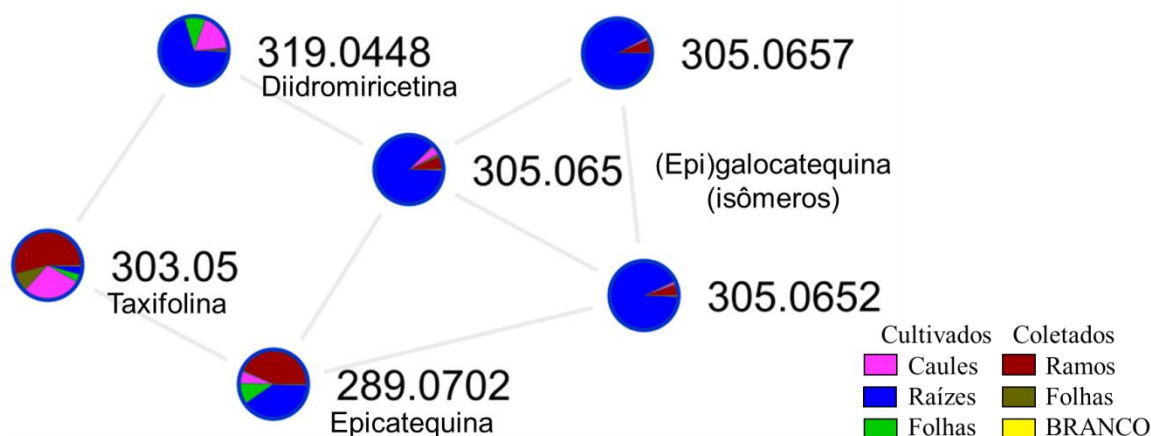
FIGURA 5.40 - Distribuição dos flavonoides nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas.



Com exceção da taxifolina que esteve presente em maior concentração nos ramos e caules, as catequinas e derivados estiveram presentes

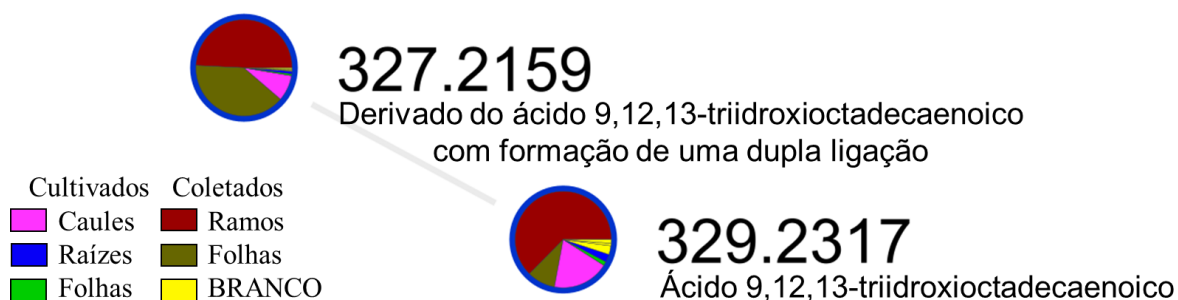
majoritariamente nas raízes, como pode ser observado na FIGURA 5.41. Por outro lado, essa classe de compostos foi pouco abundante nas amostras de folhas.

FIGURA 5.41 - Distribuição das catequinas e derivados nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas.



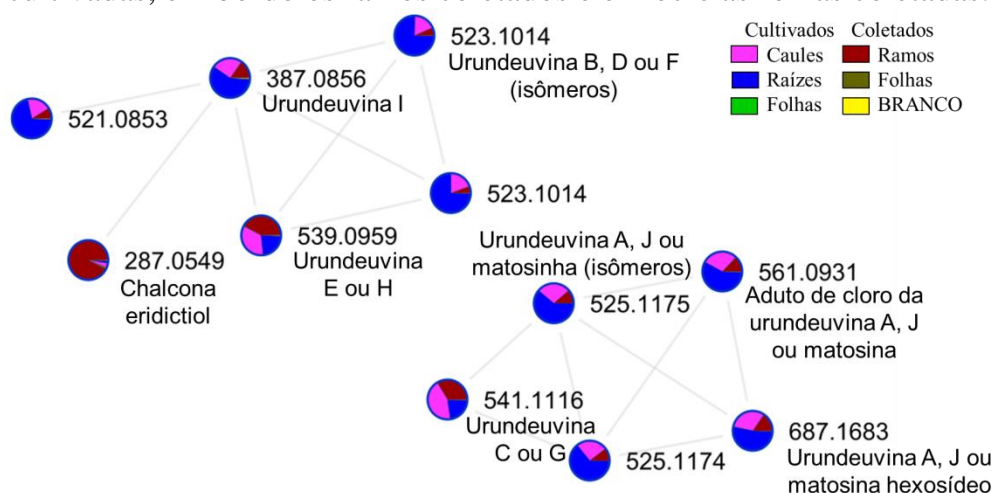
Os ácidos graxos foram encontrados majoritariamente nas amostras coletadas, principalmente nas amostras dos ramos, como observado na FIGURA 5.42. Apesar de serem encontrados majoritariamente nas amostras coletadas, os ácidos graxos podem ser encontrados em menor abundância nas amostras dos caules cultivados.

FIGURA 5.42 - Distribuição dos ácidos graxos nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas.



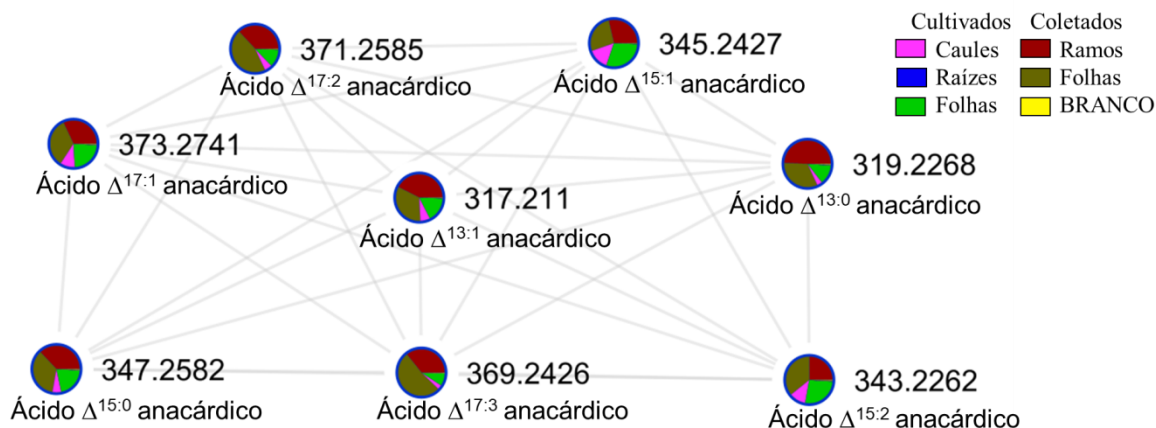
As urundeuvinas (chalconas diméricas), em sua maioria, foram encontradas majoritariamente nas amostras das raízes, mas também encontradas em concentrações consideráveis nos ramos e caules. A chalcona eridictiol e a urundeuvina E ou H foram mais abundantes nas amostras de ramos e caules. As chalconas foram pouco abundantes, ou quase indetectáveis nos casos de alguns compostos, nas folhas (FIGURA 5.43).

FIGURA 5.43 - Distribuição das chalconas nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas.



Os ácidos anacárdicos foram encontrados em maior abundância nas amostras coletadas, tanto nos ramos quanto nas folhas. Também foram detectados em concentrações menores nas amostras dos caules e folhas cultivadas, porém não detectados nos extratos das raízes (FIGURA 5.44).

FIGURA 5.44 - Distribuição dos ácidos anacárdicos nos tecidos da aroeira-preta. *Cluster* obtido da rede molecular construída a partir dos resultados das amostras dos extratos brutos à concentração de 0,1 mg/mL. As cores representam os diferentes tecidos vegetais: em rosa os caules cultivados, em verde as folhas cultivadas, em azul as raízes cultivadas, em bordô os ramos coletados e em ocre as folhas coletadas. O símbolo do tipo $\Delta^{17:2}$ indica o tamanho (17) e o grau de insaturação (2) da cadeia lateral do ácido anacárdico.



As principais diferenças entre os tecidos vegetais podem ser resumidas por: (1) ramos ricos em ácidos graxos, (2) folhas ricas em taninos hidrolisáveis e flavonoides e (3) raízes ricas em urundeuvinas e derivados da catequina. Além disso, assim como as folhas coletadas e folhas cultivadas apresentaram um perfil metabólico similar, observou-se uma similaridade entre as amostras dos ramos coletados e dos caules cultivados, uma vez que um metabólito presente nos ramos também pode ser encontrado nos caules.

5.3.1. Distribuição dos metabólitos secundários pelas frações ativas possivelmente associados com a ação alelopática

Entre os diferentes metabólitos secundários, os compostos fenólicos são comumente mencionados como aleloquímicos putativos e são os mais investigados entre os potenciais aleloquímicos⁹³. Diversos compostos fenólicos foram anotados nas amostras da aroeira-preta, os quais podem estar associados ao efeito inibitório da germinação e do crescimento das braquiárias observados nos ensaios *in vitro*.

A fim de se analisar as principais diferenças de composição entre as frações testadas, os dados de LC-MS/MS das frações ativas foram processados e comparados entre si através do *software MS-Dial*.

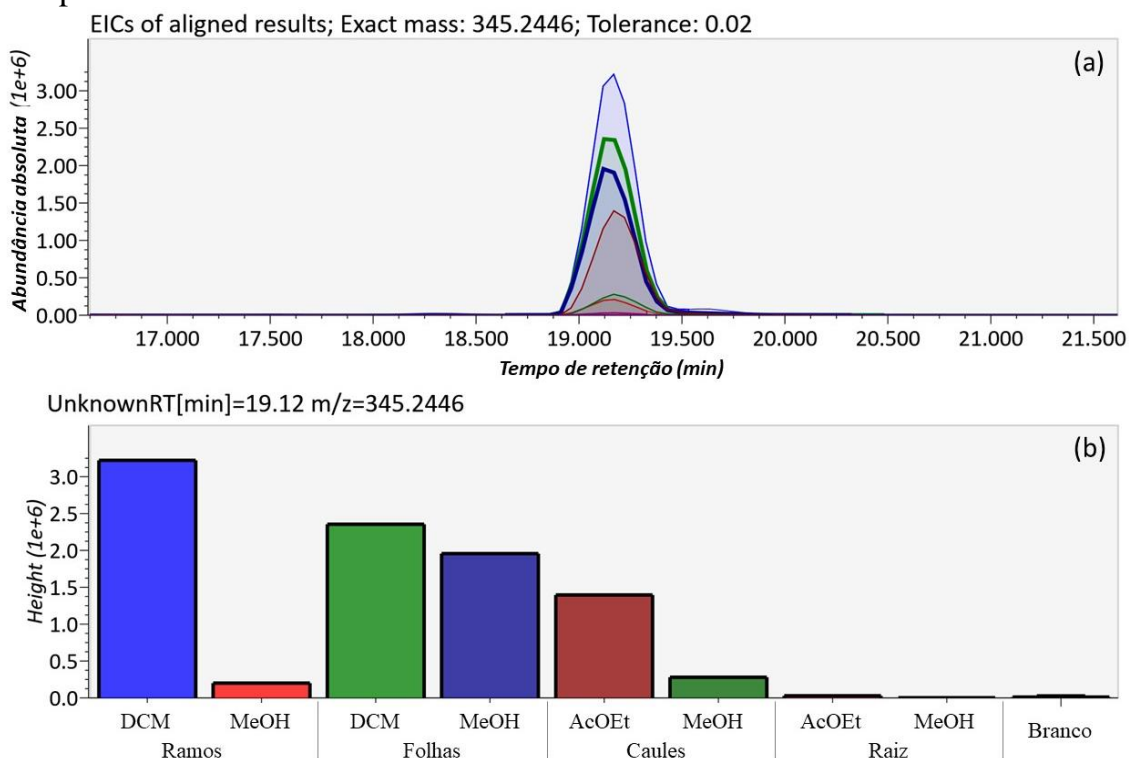
Para a quantificação relativa apresentada nessa seção, foram utilizados os dados do cromatograma de íons extraídos (EIC) para cada íon analisado, de acordo com a sua relação massa-carga exata e respeitando a tolerância de massa escolhida durante o processamento de dados (0,02 Da para MS¹).

O EIC de m/z 345,2446, por exemplo, é construído a partir da soma dos íons entre 345,2246 e 345,2646. O conjunto de EICs de cada íon presentes em diferentes amostras são alinhados respeitando a tolerância de alinhamento selecionada (0,5 min.), gerando o resultado alinhado de EICs, como representado na FIGURA 5.45.a.

A comparação da distribuição dos íons pelas diferentes amostras foi feita levando em consideração apenas a altura dos picos dos resultados alinhados de EIC, uma vez que os íons de mesma relação massa-carga e tempo de retenção possuem mesmo perfil cromatográfico nas diferentes amostras.

Para facilitar essa comparação, o resultado alinhado de EICs é convertido em um gráfico de barras que representa as alturas dos picos (*height*) dos EIC dos íons em diferentes amostras (FIGURA 5.45. b).

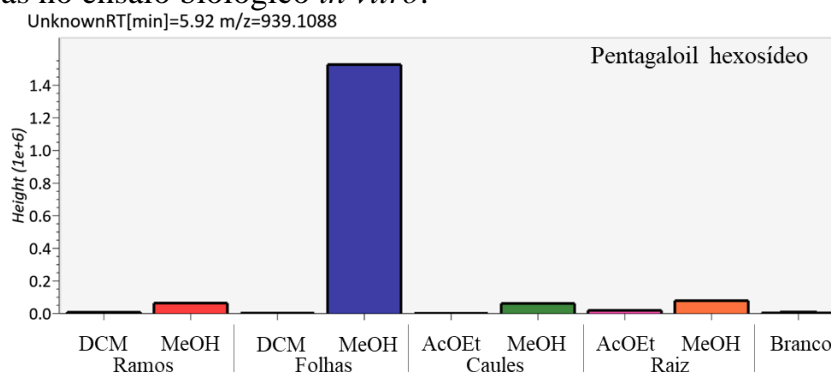
FIGURA 5.45 - Comparação da distribuição dos íons nas diferentes amostras via processamentos de dados por *MS-Dial*, sendo (a) resultado alinhado dos EICs de m/z 345,2446 (ácido $\Delta^{15:1}$ anacárdico) e (b) gráfico de barras comparando as alturas dos picos para o resultado alinhado dos EICs.



O pentagalolil hexosídeo foi o único entre os três taninos hidrolisáveis anotados que foi detectado nas frações ativas. Dentre as frações, o pentagalolil hexosídeo esteve presente em maior intensidade na fração metanólica das folhas. A distribuição deste tanino hidrolisável nas frações está representada na FIGURA 5.46.

De acordo com a literatura, os taninos hidrolisáveis podem atuar inibindo a atividade enzimática de peroxidases (POD), catalase e celulase⁴⁹. Além disso, os ácidos tânicos apresentam efeitos sobre os fito-hormônios giberelina e ácido abscísico e efeitos sobre a fotossíntese causando redução na abertura dos estômatos⁹⁴.

FIGURA 5.46 - Distribuição do tanino hidrolisável pentagaloiil hexosídeo nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.



Os flavonoides foram detectados com maior diversidade e abundância na fração metanólica das folhas, com exceção do ácido 3-*O*-metilelágico ramnosídeo que foi mais abundante na fração metanólica dos caules (FIGURA 5.47).

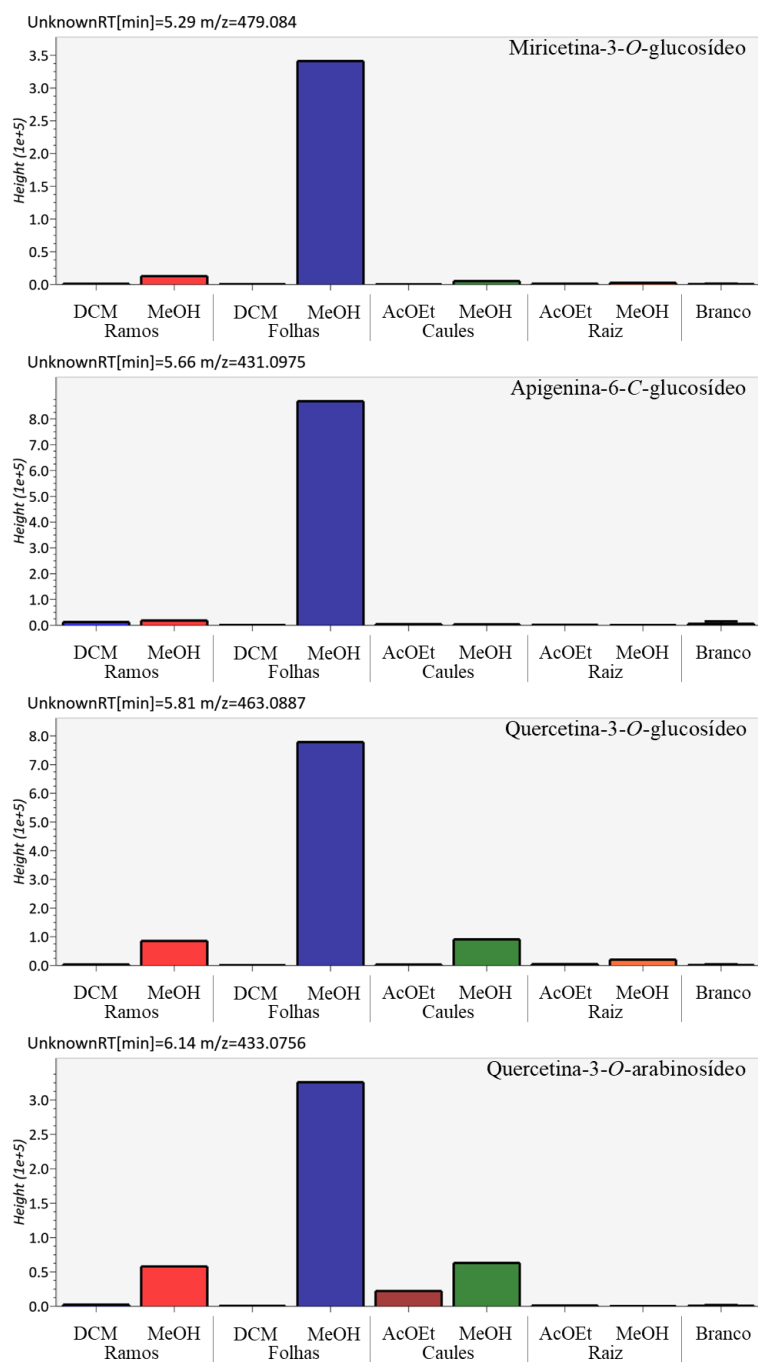
Os flavonoides são conhecidos como os metabólitos secundários mais discutidos em sistemas de defesas de plantas⁹⁵ e possuem papel importante na sinalização química e mecanismos de defesas a estresses bióticos (patógenos, herbivoria, etc.) e abióticos (exposição à luz UV, salinização do solo, etc.)³. Além disso, muitos flavonoides são descritos como fito-inibidores, como é o caso do kaempferol, ramnetina, isoramnetina e quercetina^{3,96}.

Apesar de muitos flavonoides serem descritos como aleloquímicos que inibem o crescimento das plântulas e o alongamento da radícula, pouco se entende sobre o mecanismo de ação desses inibidores⁹⁶ e, embora seja de se esperar que a fitotoxicidade de um composto seja dependente da dose aplicada, a resposta pode muitas vezes ser imprevisível.

Os flavonoides como o kaempferol, ácido elágico e luteolina apresentaram efeitos estimulantes quando testados na concentração de 1,0 mM, enquanto que em concentrações menores que 0,1 mM, apresentaram efeito inibitório no crescimento do hipocótilo da *Digitaria sanguinalis*⁹⁷. Neste mesmo trabalho realizado por Pardo-Muras et. al. (2020), a quercetina apresentou

comportamento semelhante, sendo inócua em alta concentração, porém apresentou inibição na germinação da *D. sanguinalis* à concentração de 0,01 mM⁹⁷.

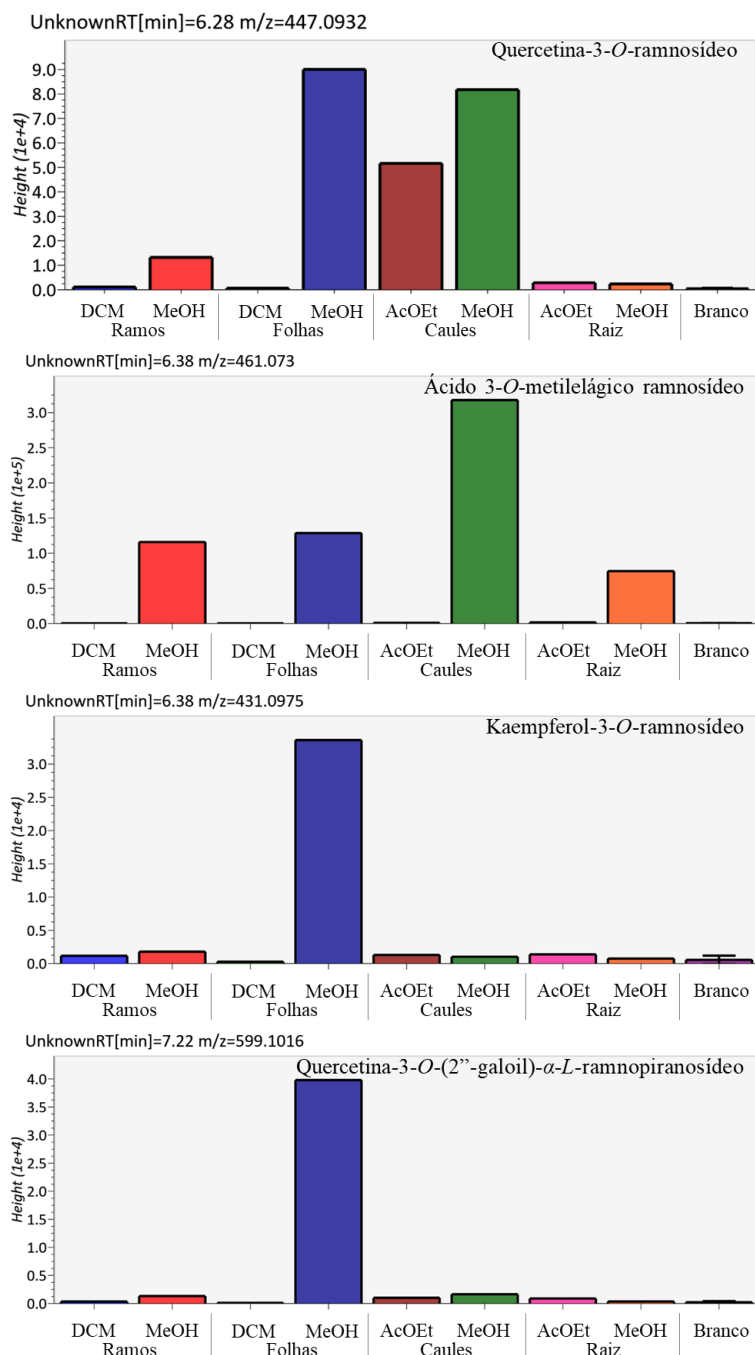
FIGURA 5.47 - Distribuição dos flavonoides nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.



(continua)

FIGURA 5.47 - Distribuição dos flavonoides nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.

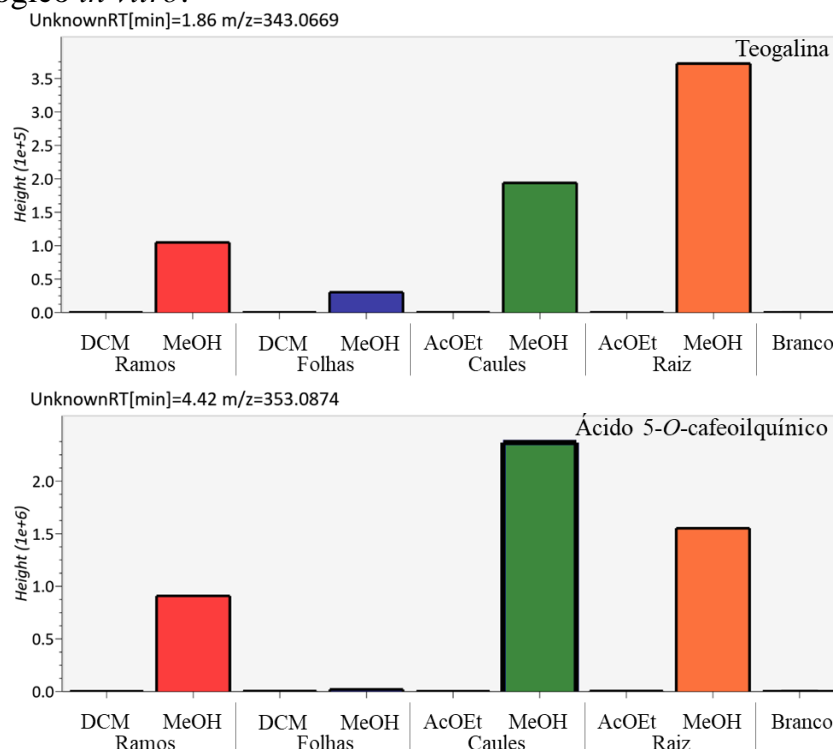
(continuação)



Entre as frações ativas analisadas, os derivados do ácido quínico foram encontrados nas frações metanólicas das quatro matrizes vegetais (FIGURA 5.48). Alguns estudos mostraram que os ácidos fenólicos interferem nos diversos processos fisiológicos das plantas, como por exemplo, interferência nos fito-hormônios giberelina e ácido abscísico, nas funções e atividades enzimáticas, na absorção de nutrientes⁹⁸, danos na integridade da membrana

celular e efeitos no sistema fotossintético^{49,72,94}, porém não alteram a divisão celular ou afetam diretamente a tradução genética.⁷²

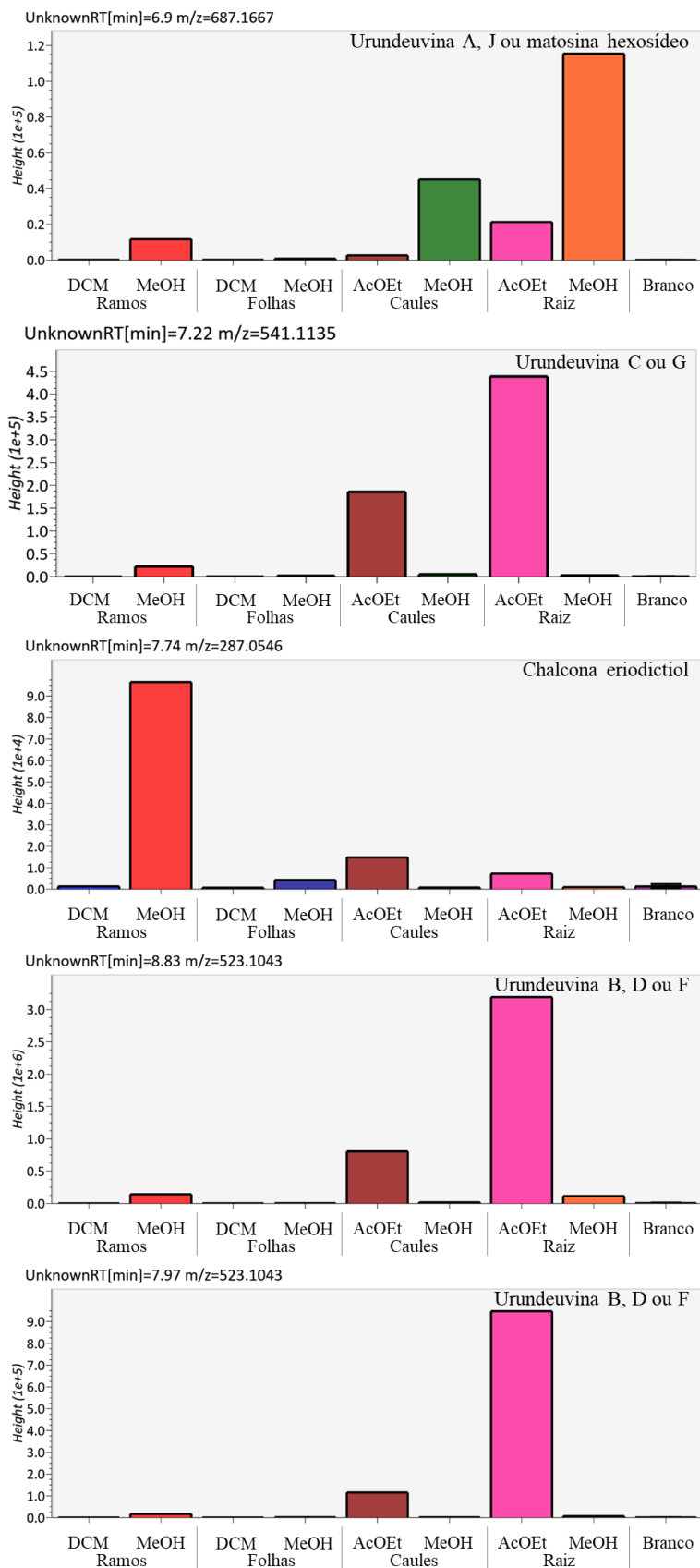
FIGURA 5.48 - Distribuição dos derivados do ácido quínico nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.



As chalconas produzidas pela aroeira-preta foram encontradas majoritariamente na fração acetato de etila das raízes, apesar de estarem presentes também em concentração considerável nas frações metanólica dos ramos e fração acetato de etila dos caules, como pode ser observado na FIGURA 5.49.

Até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade fitotóxica das urundevinas (chalconas diméricas produzidas pela espécie *M. urundeuvina*). Porém, as chalconas são relatadas como fitotoxinas que atuam como inibidores do fotossistema II (PSII)⁹⁹ e indutoras de morte celular programada (apoptose) nos tecidos das raízes¹⁰⁰.

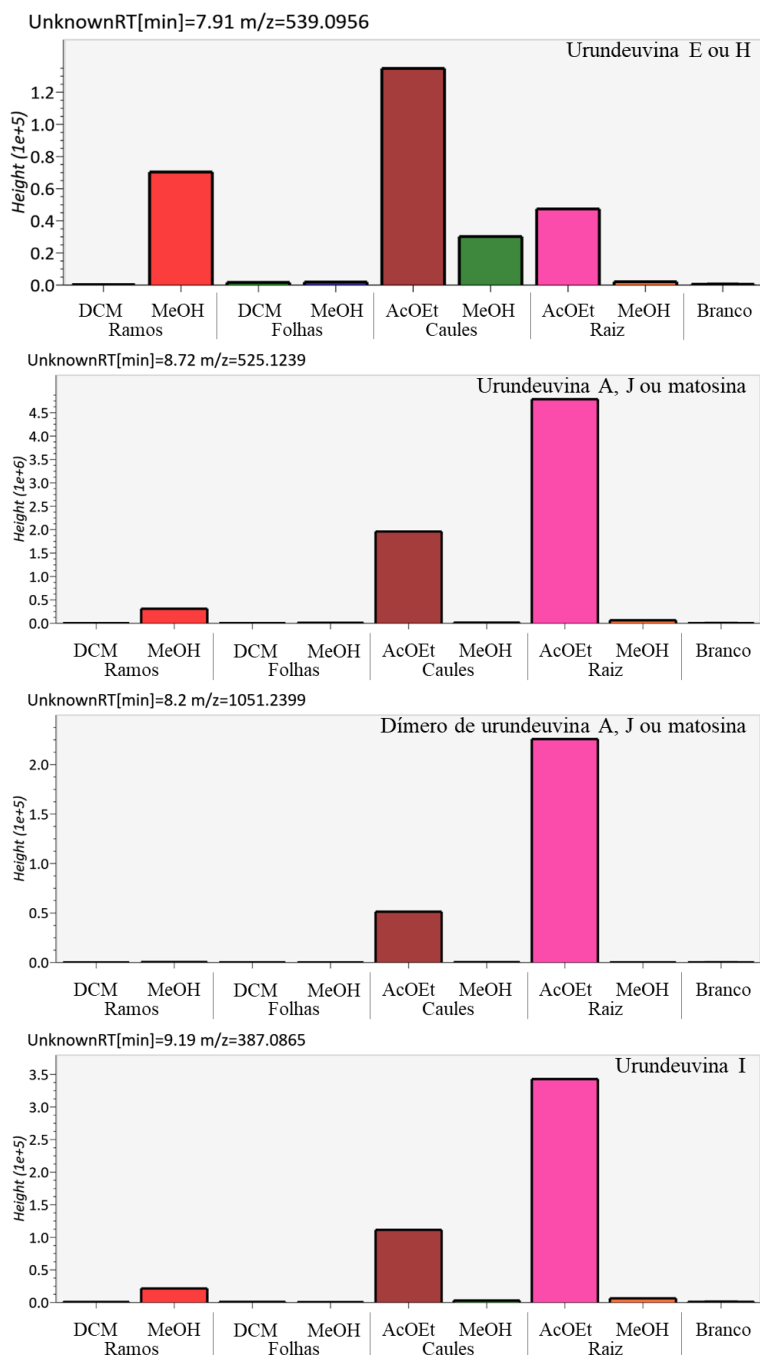
FIGURA 5.49 - Distribuição das chalconas nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.



(continua)

FIGURA 5.49 - Distribuição das chalconas nas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.

(continuação)



A fração acetato de etila das raízes apresentou a maior atividade inibitória sobre as sementes testadas nos bioensaios (seção 5.1.3). Essa fração destacou-se pela maior concentração e variedade de chalconas diméricas e, associado aos estudos descritos na literatura sobre a atividade fitotóxica das chalconas⁹⁹⁻¹⁰¹, pode-se supor que as chalconas diméricas produzidas pela

aroeira-preta (FIGURA 5.50) possuem um papel importante e fundamental na atividade inibitória observada.

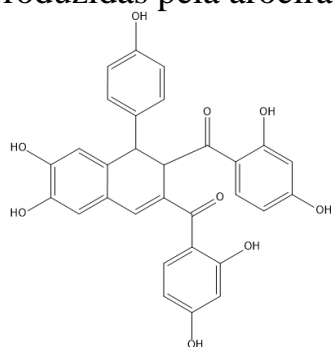
Além disso, a atividade acentuada sobre o desenvolvimento do sistema radicular observado nos tratamentos com a fração acetato de etila das raízes vai de encontro com os estudos descritos na literatura relatando a atividade das chalconas no desenvolvimento do sistema radicular.

Díaz-Tielas et. al. (2019)¹⁰⁰ observaram efeitos que se assemelham à apoptose das raízes de *Arabidopsis thaliana* L. quando tratadas com a *trans*-chalcona. Estudo realizado por Pádua et. al (2021)⁹⁹ demonstrou que as chalconas atuam como herbicidas pós-emergentes reduzindo a biomassa da raiz da corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) em até 83%.

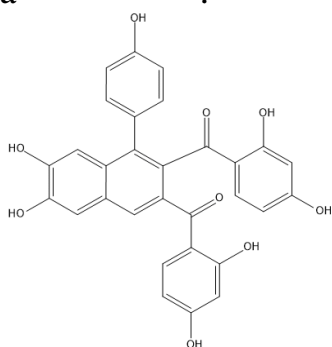
Estudo realizado por Nguyen et al. (2016)¹⁰¹ demonstrou que chalconas com pelo menos duas hidroxilas nos anéis A e B e chalconas com hidroxilação na posição 3' do anel A (FIGURA 5.51) são potentes inibidores da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) de plantas C4, mas não interferem no funcionamento da PEPC de plantas C3.

Neste mesmo trabalho, as chalconas 2',3',4'-triidroxichalcona e 2',3',4',3,4-pentaidroxichalcona (FIGURA 5.51 b e c) foram testadas a fim de se avaliar o efeito no crescimento das espécies *Amaranthus retroflexus* (planta do tipo C4) e *Brassica napus* (planta do tipo C3). Os resultados obtidos mostraram que ambas as chalconas apresentaram efeitos inibitórios específicos para planta do tipo C4, inibindo significativamente o crescimento da *A. retroflexus*, porém não apresentou efeitos sobre a espécie C3¹⁰¹.

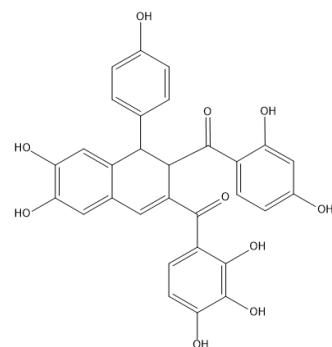
FIGURA 5.50 - Estrutura química das chalconas diméricas urundeuvinas, produzidas pela aroeira-preta^{37,76,79,80,89,90}.



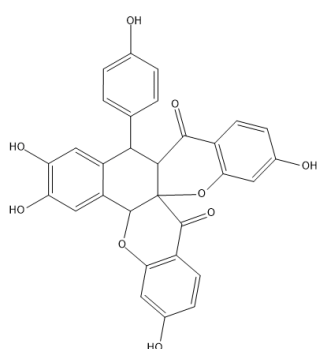
(a) urundevina A



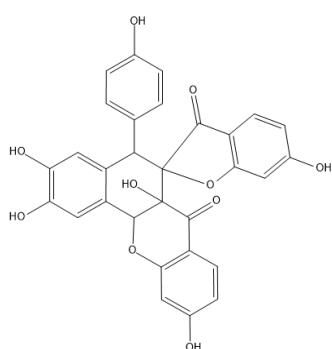
(b) urundevina B



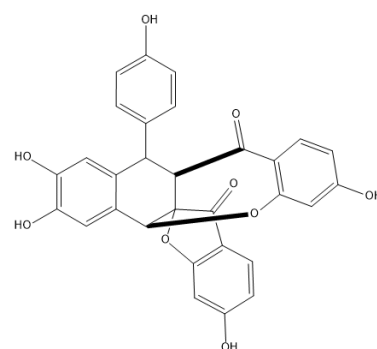
(c) urundevina C



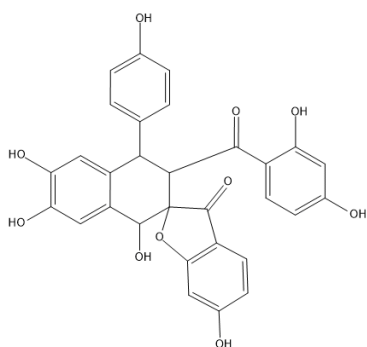
(d) urundevina D



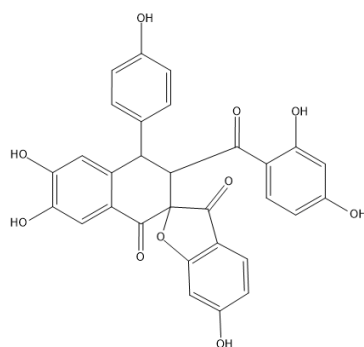
(e) urundevina E



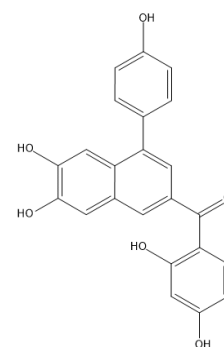
(f) urundevina F



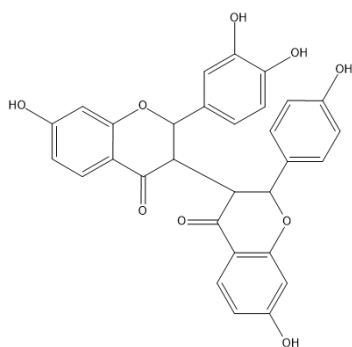
(g) urundevina G



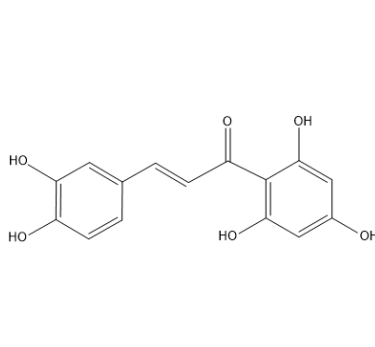
(h) urundevina H



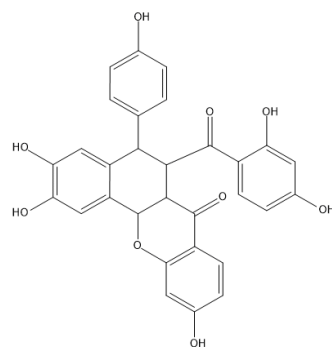
(i) urundevina I



(j) urundevina J

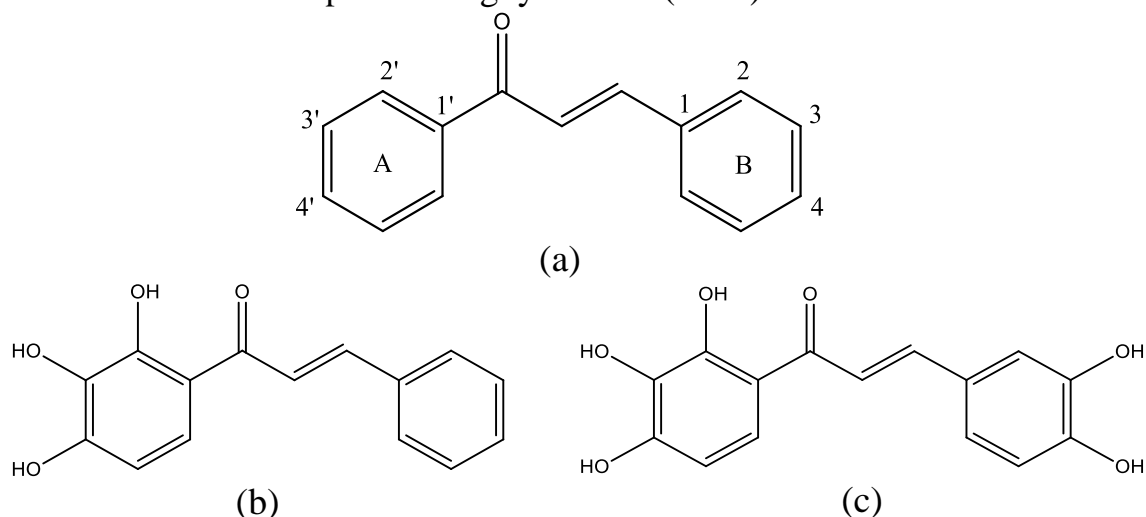


(k) chalcona eriodictiol



(l) matosina

FIGURA 5.51 - Estruturas das chalconas inibidoras da PEPC de plantas C4, sendo (a) estrutura básica de uma chalcona, (b) 2',3',4'-trihidroxichalcona e (c) 2',3',4',3,4-pentaidroxichalcona. Adaptado de Nguyen et al. (2016)¹⁰¹



Tendo em vista a atividade diferenciada das chalconas quando em contato com plantas do tipo C3 e C4 encontrada no estudo realizado por Nguyen et al. (2016)¹⁰¹, levanta-se a hipótese de que as urundeuvinas possam desempenhar atividade específica frente as plantas do tipo C4. Para isso, essas chalconas diméricas devem ser isoladas e avaliadas individualmente a fim de se testar essa hipótese.

A classe das catequinas e derivados (FIGURA A118), ácidos graxos (FIGURA A119) e derivados do ácido gálico (FIGURA A120) não apresentam um padrão de distribuição muito claro e estão distribuídas pelas frações analisadas. Os ácidos anacárdicos foram encontrados majoritariamente nas amostras dos ramos e folhas coletadas, e não foram detectados nas frações das raízes (FIGURA A121). Aparentemente, esses metabólitos secundários não possuem efeito significativo no processo de inibição do crescimento das plântulas das espécies avaliadas.

6. Conclusões

Este foi o primeiro estudo realizado com a aroeira-preta utilizando a plataforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) e a criação da rede molecular via *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) como ferramentas da metabolômica para anotação dos metabólitos secundários.

Os extratos obtidos a partir dos diferentes tecidos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*) apresentaram metabólitos secundários derivados principalmente da via do ácido chiquímico, sendo anotado um total de cinquenta e cinco metabólitos distribuídos em oito classes. Dentre os compostos descritos, vinte foram anotados pela primeira vez para esta espécie, sendo eles: heptagaloil hexosídeo, ácido 3-*O*-metilelágico ramnosídeo, kaempferol-3-*O*-arabinosídeo, miricetina, miricetina-3-*O*-glucosídeo, isoramnetina-3-*O*-glucosídeo, diidromiricetina, taxifolina, dois derivados do ácido 9,12,13-triidroxioctadecaenoico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, chalcona eriodictiol, galato de etila, uma espécie formada por duas unidades de ácido gálico e um metil digalato ligados entre si, um trímero do ácido gálico e cinco ácidos anacárdicos com tamanho de cadeia e grau de insaturação variados.

Essa composição química rica em compostos fenólicos pode justificar a dificuldade no crescimento das braquiárias *Urochloa decumbens* e *U. brizantha* ao redor da aroeira-preta observada no campo. A partir dos ensaios biológicos *in vitro* foi possível constatar que, apesar das amostras testadas influenciarem negativamente a germinação das sementes e o crescimento do hipocótilo, o efeito inibitório mais intenso foi observado no desenvolvimento do sistema radicular.

A fração acetato de etila das raízes apresentou a ação inibitória mais intensa, isto é, inibiu significativamente a taxa de germinação das sementes das braquiárias *U. brizantha* e *U. decumbens* nas concentrações de 100 e 50 mg/mL

e influenciou negativamente o crescimento da radícula nas três concentrações avaliadas (100, 50 e 25mg/mL).

Vale destacar que a fração acetato de etila das raízes na concentração de 100 mg/mL inibiu completamente a germinação das sementes de *U. brizantha*. Essa fração apresentou uma composição química rica em chalconas diméricas urundeuvinas, sugerindo que essa classe de metabólitos secundários pode desempenhar um papel importante para a atividade inibitória observada.

Por fim, a observação acerca da contaminação diferenciada por fungos entre os tratamentos testados levanta a hipótese de que os tratamentos nos quais não ocorreu contaminação, principalmente para a fração acetato de etila das raízes, podem conter metabólitos secundários com potencial atividade antifúngica.

7. Referências Bibliográficas

1. CNCFlora. *Myracrodruon urundeuva* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Myracrodruon urundeuva](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Myracrodruon_urundeuva)>. Acesso em: 23/04/2020.
2. CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 51).
3. SHAH, A. & SMITH, D. L. Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. **Agronomy** v.10, p.1–26, 2020.
4. MILES, John W.; VALLE, Cacilda B. do; RAO, Idupulapati M.; EUCLIDES, Valéria P.B. (ed.). Brachiariagrasses. In: MOSER, Lowell; BURSON, Byron; SOLLENBERGER, Lynn (ed.). **Warm-Season (C4) Grasses**. American Society Of Agronomy, 2004. Cap. 22. p. 745-783.
5. PIVELLO, V. R., SHIDA, C. N. & MEIRELLES, S. T. Alien grasses in brazilian savannas: a threat to the biodiversity. **Biodivers. Conserv.** v.8, p. 1281–1294, 1999.
6. FERREIRA, L. V. *et al.* The effect of exotic grass *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Poaceae) in the reduction of species richness and change of floristic composition of natural regeneration in the Floresta Nacional de Carajás, Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.** v.88, p. 589–597 2016.
7. THOMAS, P. A. *et al.* Controlling the invader *Urochloa decumbens*: Subsidies for ecological restoration in subtropical Campos grassland. **Appl. Veg. Sci.** v. 22, p. 96–104, 2019.
8. GORGONE-BARBOSA, E. *et al.* How can an invasive grass affect fire behavior in a tropical savanna? A community and individual plant level approach. **Biol. Invasions**, v. 17, p. 423–431, 2014.
9. BARBOSA, J. B. M., GOMES, W. B., MALAQUIAS, J. V., AQUINO, F. G. & ALBUQUERQUE, L. B. de. Métodos de controle de braquiária (*Urochloa decumbens* Stapf.) em área de restauração ecológica de mata ripária, DF. **Ciência Florest.**, v. 28, 1491–1501, 2018.
10. BRITO, A. C. V. de, ARAÚJO, A. V. de & PINTO, M. A. D. da S. C. Potencial alelopático de espécies arbóreas da caatinga sobre a emergência e o desenvolvimento inicial de *Allium fistosum* L. **Enciclopédia Biosf.**, v. 13, p. 975–985, 2016.
11. VIEIRA, Letícia de Melo. **Potencial alelopático, antioxidante e inibidor**

- de tirosinase de aroeira- preta (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.).** 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2013.
12. SILVA, Andressa Rossi da. **Herbicida natural derivado de *Myracrodruon urundeuva* freire allemão.** 2015. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroquímica, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2015.
 13. SOUZA, C. S. M. de, SILVA, W. L. P. da, GUERRA, A. M. N. de M., CARDOSO, M. C. R. & TORRES, S. B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Rev. Verde Agroecol. e Desenvol. Sustentável**, v. 2, 96–100, 2007.
 14. CRISPIM, S.M.A.; BRANCO, O.D. **Aspectos gerais das Braquiárias e suas características na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS /** Sandra Mara Araújo Crispim, Oslain Domingos Branco – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 25p. – (Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).
 15. SENDULSKY, T. Brachiaria: taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehnea**, v. 7, p. 99–139, 1978.
 16. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal. 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf.
 17. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. BEEF REPORT Perfil da pecuária no brasil. Disponível em: <cicarne.com.br/wpcontent/uploads/2020/05/SUMÁRIO-BEEF-REPORT-2020_NET.pdf>.
 18. GONZÁLEZ, A. M. T. & MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 37, p. 36–44, 2005.
 19. RENVOIZE, S. A., CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement.** Cali: CIAT; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 1-15.
 20. FISHER, MYLES J.; KERRIDGE, PETER C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species . In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do; K., VRINDA (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement.** Cali: CIAT; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 43-52.
 21. KELLER-GREIN, G., MAASS, B. L. & HANSON, J. Natural variation in

- Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do; K., VRINDA (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 16-39.
22. ROSA, F. B. *et al.* Spontaneous poisoning by *Brachiaria decumbens* in goats. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 36, p. 389–396, 2016.
 23. CHUNG, E. L. T. *et al.* Can treatment of *Brachiaria decumbens* (signal grass) improve its utilisation in the diet in small ruminants?—a review. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 50, p. 1727–1732, 2018.
 24. MACÍAS, F. A., MOLINILLO, J. M. G., VARELA, R. M. & GALINDO, J. C. G. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Manag. Sci.**, v. 63, p. 327–348, 2007.
 25. RADOSEVICH, HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology: implications for management**. 2.ed. New York: Wiley, 1997. p. 163-214.
 26. BRITO, I. P. F. S. *et al.* Sensitivities of *Urochloa decumbens* plants to glufosinate. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.
 27. BARBOSA, E. G., PIVELLO, V. R. & MEIRELLES, S. T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian cerrados. **Brazilian Arch. Biol. Technol.**, v. 51, p. 825–831, 2008.
 28. RODRIGUES, A. P. D. A. C., LAURA, V. A., PEREIRA, S. R. & DEISS, C. Alelopatia de duas espécies de braquiárias em sementes de três espécies de estilócladas. **Cienc. Rural**, v. 42, p. 1758–1763, 2012.
 29. KOBAYASHI, A. & KATO-NOGUCHI, H. Phytotoxic substance with allelopathic activity in *Brachiaria decumbens*. **Nat. Prod. Commun.**, v. 10, p. 761–763, 2015.
 30. DAMASCENO, G.; FIDELIS, A. Abundance of invasive grasses is dependent on fire regime and climatic conditions in tropical savannas. **Journal of Environmental Management**, v. 271, p. 111016, 2020.
 31. MEDEIROS, P. M. de, LADIO, A. H. & ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 729–746, 2013.
 32. CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras – v.1**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas; 2003. 1.039p.
 33. Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2014. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da União, 18/12/2014, Seção 1, p. 110-121.

34. BESSA, N. G. F. de *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 15, p. 692–707, 2013.
35. MENEZES, A. M. S., RAO, V. S. N. & FONTELES, M. C. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v. 57, p. 253–256, 1986.
36. AQUINO, N. *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of the decoction from leaves of a cultivated specimen of *Myracrodruon urundeuva*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, p. 1616–1623, 2019.
37. AGUIAR GALVÃO, W. R. *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 222, p. 177–189, 2018.
38. LESJAK, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **J. Funct. Foods**, v. 40, p. 68–75, 2018.
39. VIANA, G. S. B., BANDEIRA, M. A. M. & MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189–195, 2003.
40. SÁ, R. A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.**, v. 149, p. 300–306, 2009.
41. SOUZA, T. M. *et al.* Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Manag. Sci.**, v. 68, p. 1380–1384, 2012.
42. OLIVEIRA, L. M. B. de *et al.* Effects of *Myracrodruon urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 893–898, 2011.
43. SOARES, A. M. S *et al.* *Myracrodruon urundeuva* seed exudates proteome and anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **Plos one**, v. 13, n. 7, p. e0200848, 2018.
44. TRENTIN, D. S. *et al.* Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v. 8, p. 1–13, 2013.
45. ARAÚJO, Í. D. R. de *et al.* Chemical composition and evaluation of the antibacterial and cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. **BMC Complement. Altern. Med.** v. 17, p. 1–8, 2017.
46. SIGAUD, Jane Ane Villela. **Revisão sobre as espécies arbóreas nativas**

- utilizadas na recuperação de áreas degradadas do Bioma Cerrado.** 2015. 37 f. Monografia (Graduação) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
47. ASENSIO, V. *et al.* Screening of native tropical trees for phytoremediation in copper-polluted soils. **Int. J. Phytoremediation**, v. 20, p. 1456–1463, 2018.
 48. SOUZA FILHO, A.P.S. Função dos agentes alelopáticos nas plantas. in: SOUZA FILHO, A. P. da S. & ALVES, S. de M. (Ed). **Alelopatia - Princípios básicos e aspectos gerais.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p. 49-78.
 49. LI, Z. H., WANG, Q., RUAN, X., PAN, C. De & JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933–8952, 2010.
 50. RICE, E. L. Allelopathy: an overview. In: WALLER, G.R. **Allelochemical role in agriculture and forestry** Washington, D.C.: American Chemical Society, 1987. p. 7–22.
 51. RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. (Ed.) **Allelopathy: Basic and applied aspects.** London, Chapman & Hall, 1992. p.443-472.
 52. SOUZA FILHO, A.P.S. Alelopatia: das primeiras observações aos atuais conceitos. in: SOUZA FILHO, A. P. da S. & ALVES, S. de M. (Ed). **Alelopatia - Princípios básicos e aspectos gerais.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p. 15-23.
 53. DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop–weed interactions. **Weed Sci.**, v. 63, p. 121–132, 2015.
 54. STICKNEY, J. A. & HOY, P. R. Toxic action of black walnut. **Trans Wis State Hort Soc**, v. 11, p. 166–167, 1881.
 55. DAVIS, E. F. The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. **Amer. J. Bot**, v. 15, p. 620, 1928.
 56. FLAMINI, GUIDO. Natural herbicides as a safer and more environmentally friendly approach to weed control: a review of the literature since 2000. In: **Studies in natural products chemistry**, v. 38, 2012. p. 353-396.
 57. DUKE, S. O., ROMAGNI, J. G. & DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Prot.**, v. 19, p. 583–589, 2000.
 58. VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631–1646, 2002.
 59. RICE, E. L. Chemical nature of allelopathic agents. In: RICE, E.L.

- Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984. P. 266–291.
60. RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.
 61. RIMANDO, A. M., DAYAN, F. E., CZARNOTA, M. A., WESTON, L. A. & DUKE, S. O. A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorghum bicolor*. **J. Nat. Prod.**, v. **61**, p. 927–930, 1998.
 62. LEATHER, G. R.; EINHELLIG, F. A. Bioassays in the study of allelopathy. in: A. R. PUTNAM; C.S. TANG (ed). **The Science of Allelopathy**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 133-145.
 63. INDERJIT & DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **Bot. Rev.**, v. 61, p. 28–44, 1995.
 64. INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **Bot. Rev.**, v. 62, p. 186–202, 1996.
 65. ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nat. Protoc.**, v. 15, p. 1954–1991, 2020.
 66. OLIVON, F., GRELIER, G., ROUSSI, F., LITAUDON, M. & TOUBOUL, D. MZmine 2 data-preprocessing to enhance molecular networking reliability. **Anal. Chem.**, v. 89, p. 7836–7840, 2017.
 67. OLIVON, F., ROUSSI, F., LITAUDON, M. & TOULBOUL, D. Optimized experimental workflow for *tandem* mass spectrometry molecular networking in metabolomics. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 409, p. 5767–5778, 2017.
 68. WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat. Biotechnol.**, v. 34, p. 828–837, 2016.
 69. PILON, A. C. *et al.* Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Quim. Nova**, v. 43, p. 329–354, 2020.
 70. NOTHIAS, L. F. *et al.* Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nat. Methods**, v. 17, p. 905–908, 2020.
 71. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395p.
 72. EINHELLIG, F.A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G. & CUTLER, H.G. (Ed.) **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2004, p. 217-238.
 73. Mandal, S. Allelopathic activity of Root Exudates from *Leonurus sibiricus* L. (Raktodrone). **Weed Biol. Manag.**, v. 1, p. 170–175, 2001.
 74. Ribeiro, J. P. O. *et al.* Efeito alelopático do extrato aquoso das folhas de

- Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertn.) G. Don sobre a germinação de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Rev. Fitos**, v. 13, p. 270–277, 2019.
75. HIRADATE, S., OHSE, K., FURUBAYASHI, A. & FUJII, Y. Quantitative evaluation of allelopathic potentials in soils: total activity approach. **Weed Sci.**, v. 58, p. 258–264, 2010.
 76. CASTRO, C. *et al.* Metabolomics-based discovery of biomarkers with cytotoxic potential in extracts of *Myracrodruon urundeuva*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, p. 775–787, 2020.
 77. PILON, A. C. *et al.* Mass spectral similarity networking and gas-phase fragmentation reactions in the structural analysis of flavonoid glycoconjugates. **Anal. Chem.**, v. 91, p. 10413–10423, 2019.
 78. BRITO, J. A. G. de *et al.* Chemophenetic significance of *Anomalocalyx uleanus* metabolites are revealed by dereplication using molecular networking tools. **Molecules**, v. 26, p. 1–21, 2021.
 79. AQUINO, Nayara Coriolano de. **Aplicação de técnicas espectrométricas e cromatográficas na caracterização de seis tipos químicos de *Myracrodruon urundeuva* fr. allem (aroeira-do-sertão)**. 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
 80. SILVA, Dayse Pereira Dias. **Caracterização de compostos fenólicos por espectrometria de massas e potencial antioxidante das cascas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) do cariri paraibano**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Sumé, 2018.
 81. PIKULSKI, M. & BRODBELT, J. S. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 14, p. 1437–1453, 2003.
 82. YUZUAK, S., BALLINGTON, J. & XIE, D. Y. HPLC-QTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two muscadine grape hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66. **Metabolites**, v. 8, p. 1–24, 2018.
 83. ZHENG, Y., ZENG, X., CHEN, T., Peng, W. & Su, W. Chemical profile, antioxidative, and gut microbiota modulatory properties of ganpu tea: A derivative of pu-erh tea. **Nutrients**, v. 12, p. 1–20, 2020.
 84. AKHTAR, N. *et al.* Rapid identification and quantification of bioactive metabolites in processed *Camellia sinensis* samples by UHPLC-ESI-MS/MS and evaluation of their antioxidant activity. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 90, p. 419–426, 2020.

85. MARLES, M. A. S., GRUBER, M. Y., SCOLES, G. J. & MUIR, A. D. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. **Phytochemistry**, v. 62, p. 663–672, 2003.
86. CASTRO, Caio Bezerra de. **Perfil químico e atividade citotóxica de extratos de folha, galho e casca de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* all): abordagem metabolômica e quimiométrica**. 2016. 93 f. Monografia (Graduação) - Curso de Química, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
87. ZHANG, L., DENG, W. W. & WAN, X. chun. Advantage of LC-MS metabolomics to identify marker compounds in two types of Chinese dark tea after different post-fermentation processes. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 23, p. 355–360, 2014.
88. ZHOU, A. & SADIK, O. A. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: A mechanistic study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 12081–12091, 2008.
89. RIBEIRO, Élcio Ermelindo. **Análise fitoquímica de extratos da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)**. 2018. 54 f. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
90. AQUINO, Nayara Coriolano de. **aspectos químicos, do estudo químico-farmacológico-agronômico de aroeiras-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), silvestres e cultivadas**. 2017. 432 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
91. ROMERO, M. G., CARRETERO, A. S. & GUTIÉRREZ, A. F. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1848–1864, 2010.
92. LYU, Q. et al. Comprehensive Profiling of Phenolic Compounds in White and Red Chinese Bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) and Their Developmental Variations Using Tandem Mass Spectral Molecular Networking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 741-749, 2021.
93. KATO-NOGUCHI, H. & KURNIADIE, D. Allelopathy and allelopathic substances of mango (*Mangifera indica* L.). **Weed Biol. Manag.**, v. 20, p. 131–138, 2020.
94. SOUZA FILHO, A. P. S. & ALVES, S. M. Mecanismo de ação dos agentes alelopáticos. in: SOUZA FILHO, A. P. da S. & ALVES, S. de M. (Ed). **Alelopatia - Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa

- Amazônia Oriental, 2002. p. 131–154
95. SUGIYAMA, A. & YAZAKI, K. Flavonoids in plant rhizospheres: Secretion, fate and their effects on biological communication. **Plant Biotechnol.**, v. 31, p. 431–443, 2014.
 96. WESTON, L. A. & MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **J. Chem. Ecol.**, v. 39, p. 283–297, 2013.
 97. MURAS, M. P., PUIG, C. G., SOUTO, X. C. & PEDROL, N. Water-soluble phenolic acids and flavonoids involved in the bioherbicidal potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*. **South African J. Bot.**, v. 133, p. 201–211, 2020.
 98. SOUZA FILHO, A. P. da S. & ALVES, S. M. Mecanismo de liberação e comportamento de aleloquímicos no ambiente. in: SOUZA FILHO, A. P. da S. & ALVES, S. de M. (Ed). **Alelopatia - Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p. 111–129
 99. DE PÁDUA, G. M. S. *et al.* Evaluation of chalcone derivatives as photosynthesis and plant growth inhibitors. **Chem. Biodivers.**, v. 18, 2021.
 100. DÍAZ-TIELAS, C. *et al.* Transcriptome responses to the natural phytotoxin *t*-chalcone in *Arabidopsis thaliana* L. **Pest Manag. Sci.**, v. 75, p. 2490–2504, 2019.
 101. NGUYEN, G. T. T. *et al.* Chalcone-based selective inhibitors of a C4 plant key enzyme as novel potential herbicides. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 1–12, 2016.

8. Apêndice

TABELA A1 - Influência dos extratos das folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob desenvolvimento da *Urochloa brizantha*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Extrato folha [100]	12,67b	5,67c	4,67c
Extrato folha [50]	36,67a	13,00c	15,00c
Extrato folha [25]	44,67a	31,67b	33,67b
Extrato folha [12,5]	43,33a	38,33a	50,33a
Extrato folha [6,25]	45,33a	40,67a	50,33a
Extrato ramo [100]	18,00b	13,33c	4,67c
Extrato ramo [50]	33,33a	32,33b	31,00b
Extrato ramo [25]	40,67a	30,33b	49,00a
Extrato ramo [12,5]	48,00a	42,00a	54,00a
Extrato ramo [6,25]	46,00a	39,67a	63,67a
Água	52,67a	44,00a	59,33a
Acetona	50,00a	44,33a	55,00a
Metanol:clorofórmio**	43,33a	40,33a	49,33a

^{1/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A2 - Influência dos extratos das folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento da *Urochloa decumbens*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Extrato folha [100]	63,33b	22,67c	21,67d
Extrato folha [50]	82,00a	29,67c	69,67b
Extrato folha [25]	77,33a	31,33b	89,00a
Extrato folha [12,5]	83,33a	31,00b	94,67a
Extrato folha [6,25]	90,00a	25,33c	99,00a
Extrato ramo [100]	60,00b	31,67b	12,67d
Extrato ramo [50]	71,33b	36,33a	42,33c
Extrato ramo [25]	83,33a	30,67b	89,00a
Extrato ramo [12,5]	86,00a	28,00c	102,00a
Extrato ramo [6,25]	88,67a	27,33c	103,00a
Água	80,00a	35,00a	97,00a
Acetona	81,33a	39,00a	96,67a
Metanol:clorofórmio**	84,00a	32,67b	93,33a

^{1/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A3 - Influência dos extratos das folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento da *Lactuca sativa*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Extrato folha [100]	87,33a	18,33d	7,33c
Extrato folha [50]	89,33a	19,00d	14,67b
Extrato folha [25]	90,00a	19,67d	16,67b
Extrato folha [12,5]	86,67a	20,33d	19,00a
Extrato folha [6,25]	91,33a	23,33b	22,67a
Extrato ramo [100]	82,00a	22,00c	7,00c
Extrato ramo [50]	92,67a	22,33c	14,00b
Extrato ramo [25]	89,33a	24,00b	24,00a
Extrato ramo [12,5]	86,67a	25,67a	25,00a
Extrato ramo [6,25]	90,67a	22,33c	20,00a
Água	88,00a	28,00a	21,00a
Acetona	94,67a	24,33b	24,67a
Metanol:clorofórmio**	93,33a	27,00a	27,00a

^{1/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A4 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos de folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa brizantha*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Folha fração DCM	81,33a	44,23a	46,97a
Folha fração MeOH	16,67b	3,53c	0,00c
Ramo fração DCM	77,33a	33,60b	38,53b
Ramo fração MeOH	28,67b	8,33c	0,50c
Água	70,00a	48,87a	39,10b
Acetona	83,33a	47,80a	37,10b
Metanol:clorofórmio*	74,00a	49,34a	39,63b

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (13,47/< 0.0001), hipocótilo (14,13/< 0.0001) e radícula (9,93/< 0.0001).

* mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A5 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos de folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa decumbens*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Folha fração DCM	90,00a	34,20b	68,30b
Folha fração MeOH	80,00a	40,50a	14,73c
Ramo fração DCM	86,00a	27,30b	55,37b
Ramo fração MeOH	60,00b	33,90b	11,50c
Água	84,00a	40,87a	87,30a
Acetona	84,67a	42,10a	86,40a
Metanol:clorofórmio*	85,33a	41,17a	72,37b

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (10,53/< 0.0153), hipocótilo (14,67/< 0.0395) e radícula (18,90/< 0.0001).

* mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A6 - Influência das frações diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) dos extratos de folhas e ramos da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas acetona e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Folha fração DCM	95,33a	15,76b	16,9a
Folha fração MeOH	81,33b	11,46b	3,30c
Ramo fração DCM	83,33b	11,96b	18,57a
Ramo fração MeOH	94,67a	26,73a	10,83b
Água	95,33a	27,03a	15,77a
Acetona	94,00a	26,93a	17,77a
Metanol:clorofórmio*	97,33a	28,40a	23,60a

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (5,08/< 0.0034), hipocótilo (19,42/< 0.0002) e radícula (26,51/< 0.0005).

* mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A7 - Influência dos extratos dos caules e raízes da *Myracrodruon urundeuva* cultivada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa brizantha*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas metanol e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Extrato caule [100]	14,67a	35,33b	11,93c
Extrato caule [50]	28,67a	49,68a	35,34b
Extrato caule [25]	32,00a	43,63b	53,00a
Extrato raiz [100]	36,67a	43,43b	3,50c
Extrato raiz [50]	42,00a	50,27a	7,00c
Extrato raiz [25]	43,33a	50,57a	32,20b
Água	45,33a	44,43b	46,97a
Metanol	44,00a	50,30a	50,73a
Metanol:clorofórmio**	42,00a	41,93b	50,00a

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (32,12/0,08), hipocótilo (10,01/0,008) e radícula (17,10/< 0.0001).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A8 - Influência dos extratos dos caules e raízes da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa decumbens*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas metanol e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Extrato caule [100]	13,33c	31,87b	12,86d
Extrato caule [50]	48,00a	39,73a	51,07b
Extrato caule [25]	32,00b	39,30a	62,50a
Extrato raiz [100]	24,00b	37,76a	1,96e
Extrato raiz [50]	40,67a	37,08a	2,27e
Extrato raiz [25]	56,67a	39,70a	37,00c
Água	55,33a	30,77b	59,73a
Metanol	48,00a	31,90b	61,33a
Metanol:clorofórmio**	51,33a	28,50b	71,40a

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (18,21/< 0.0001), hipocótilo (10,73/< 0.0001) e radícula (14,66/< 0.0001).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A9 - Influência das frações dos extratos de caules e raízes da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa brizantha*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas metanol e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Raiz fração metanol [100]	49,33a	48,67a	23,13b
Raiz fração metanol [50]	47,33a	49,60a	53,17a
Raiz fração metanol [25]	54,67a	53,17a	56,03a
Raiz fração acetato [100]	0,00c	-	-
Raiz fração acetato [50]	17,33b	21,83d	1,27d
Raiz fração acetato [25]	42,00a	35,30c	8,50d
Caule fração metanol [100]	25,33b	39,19b	13,43c
Caule fração metanol [50]	47,33a	47,67a	53,20a
Água	45,33a	44,43b	46,97b
Metanol	44,00a	50,30a	50,73ab
Metanol:clorofórmio**	42,00a	41,93b	50,00ab

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (28,67/< 0.0001), hipocótilo (10,96/< 0.0001) e radícula (12,86/< 0.0001).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

TABELA A10 - Influência das frações dos extratos de caules e raízes da *Myracrodruon urundeuva* coletada sob o desenvolvimento de plântulas de *Urochloa decumbens*. A testemunha água foi utilizada como branco e as testemunhas metanol e metanol:clorofórmio como controle negativo. Em negrito estão destacados os resultados que diferiram significativamente em relação às testemunhas.

Tratamento*	Germinação (%) ^{1/}	Comprimento do hipocótilo (mm) ^{2/}	Comprimento da radícula (mm) ^{3/}
Raiz fração metanol [100]	34,00a	40,83a	29,40c
Raiz fração metanol [50]	47,33a	43,63a	55,73b
Raiz fração metanol [25]	46,67a	35,07b	70,47a
Raiz fração acetato [100]	2,67b	24,00c	1,00e
Raiz fração acetato [50]	11,33b	21,24c	1,11e
Raiz fração acetato [25]	35,33a	26,27c	2,87e
Caule fração metanol [100]	12,67b	33,51b	17,39d
Caule fração metanol [50]	40,00a	35,13b	68,30a
Água	55,33a	30,77c	59,73b
Metanol	48,00a	31,90b	61,33b
Metanol:clorofórmio**	51,33a	28,50c	71,40a

^{1/, 2/, 3/}As médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). ANOVA Coeficiente de variação/p value: germinação (25,85/< 0.0001), hipocótilo (12,77/< 0.0001) e radícula (12,79/< 0.0001).

* Valor entre colchetes indica a concentração da amostra em mg/mL

** mistura de solventes na proporção 75:25 v/v

FIGURA A1 – Representação geral da rede molecular obtida no modo negativo de ionização.



FIGURA A2 – Representação geral da rede molecular obtido no modo positivo de ionização

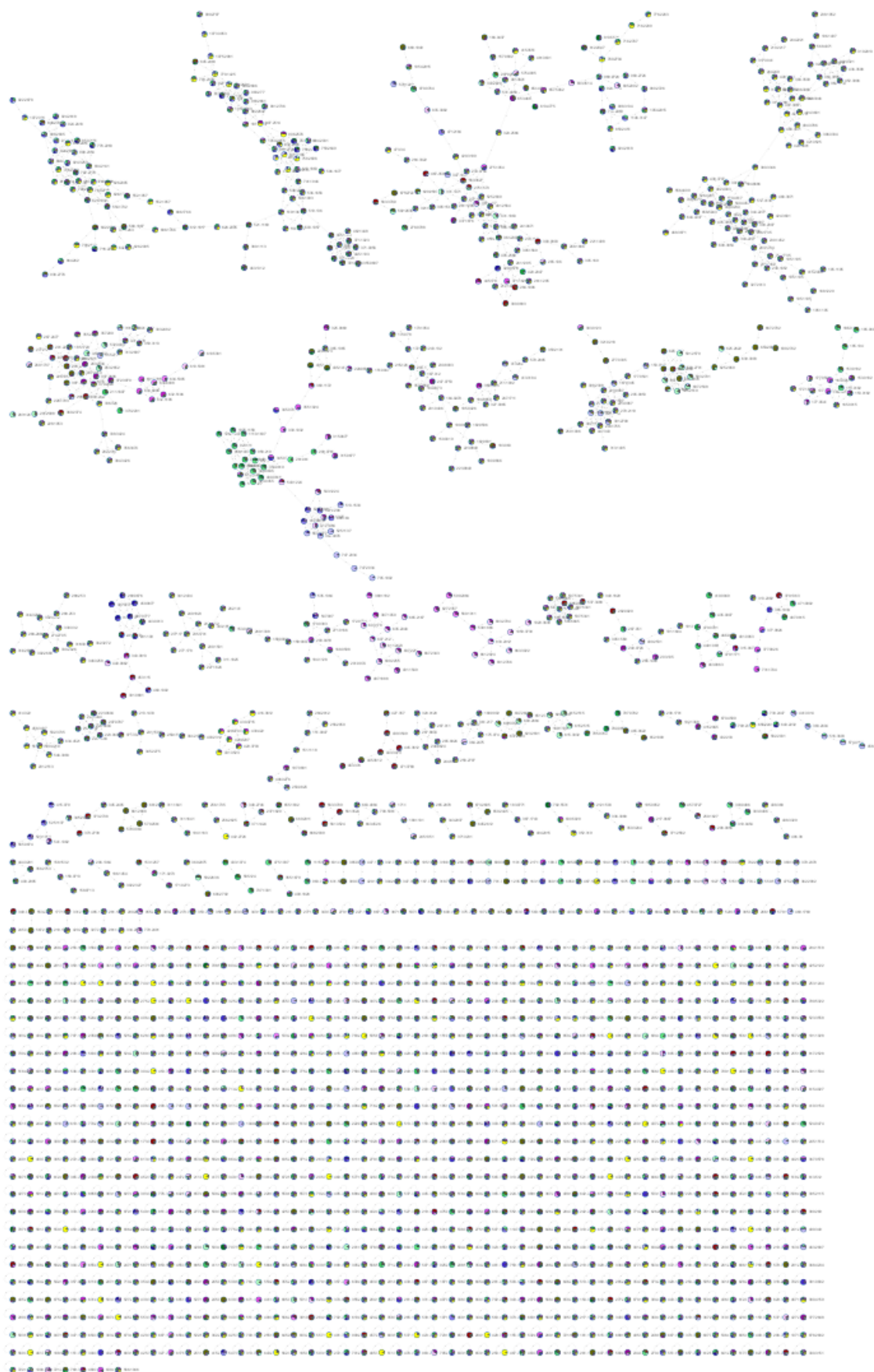


FIGURA A3 – *Mirror match* do íon de m/z 939,11 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como β -penta-*O*-galoil-glucose. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

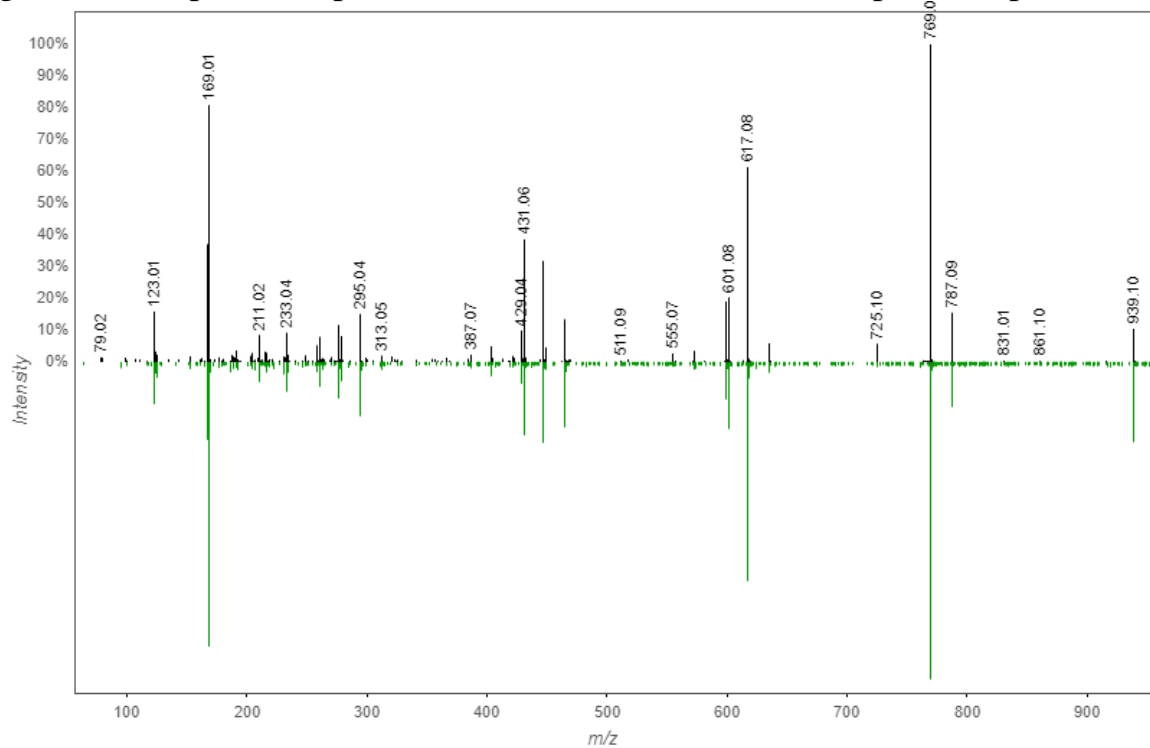


FIGURA A4 - Espectro de MS² do composto de m/z 939,1081 e tr 5,80 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

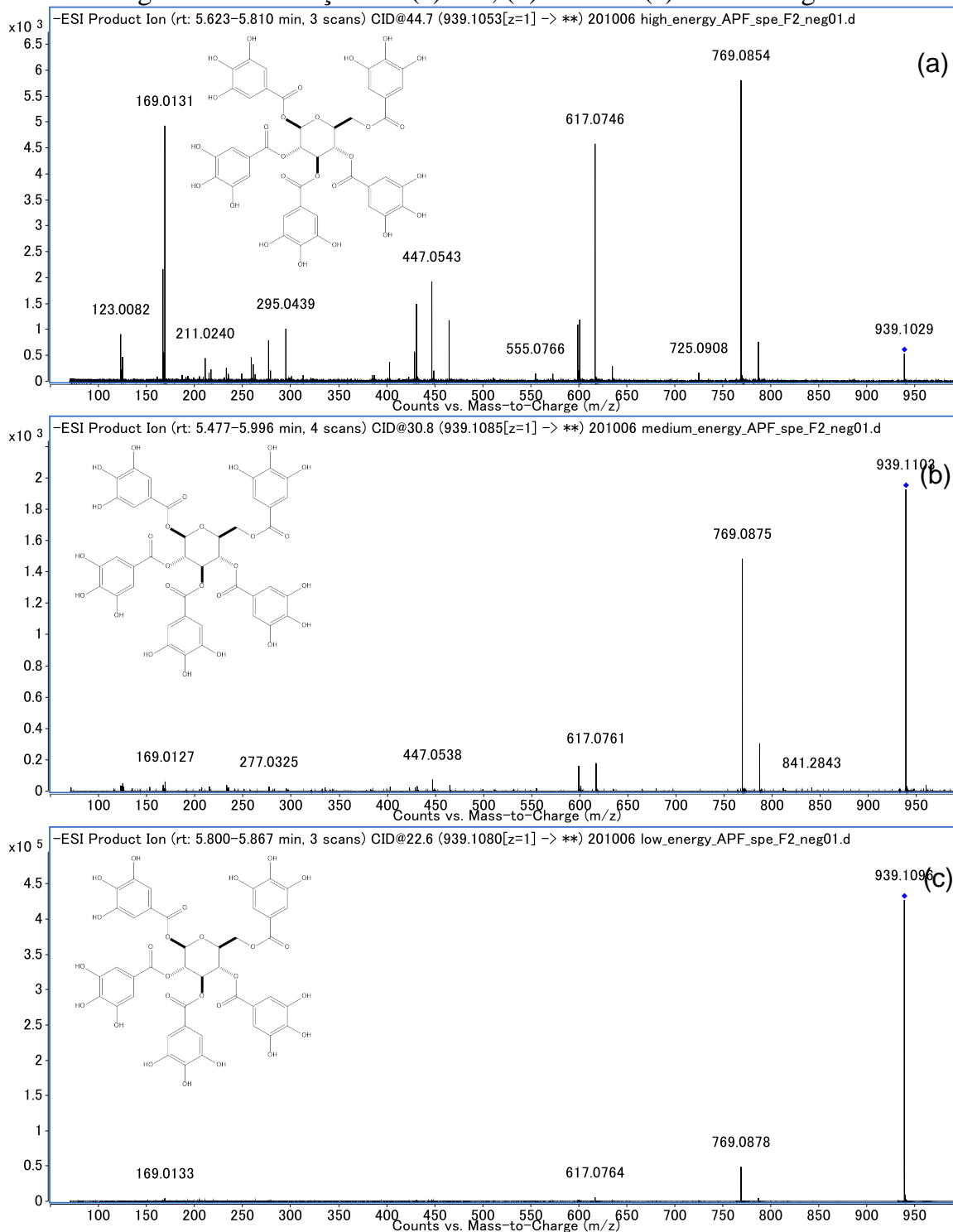


FIGURA A5 - Espectros de MS² do composto de *m/z* 1091,1188 e tr 6,22 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

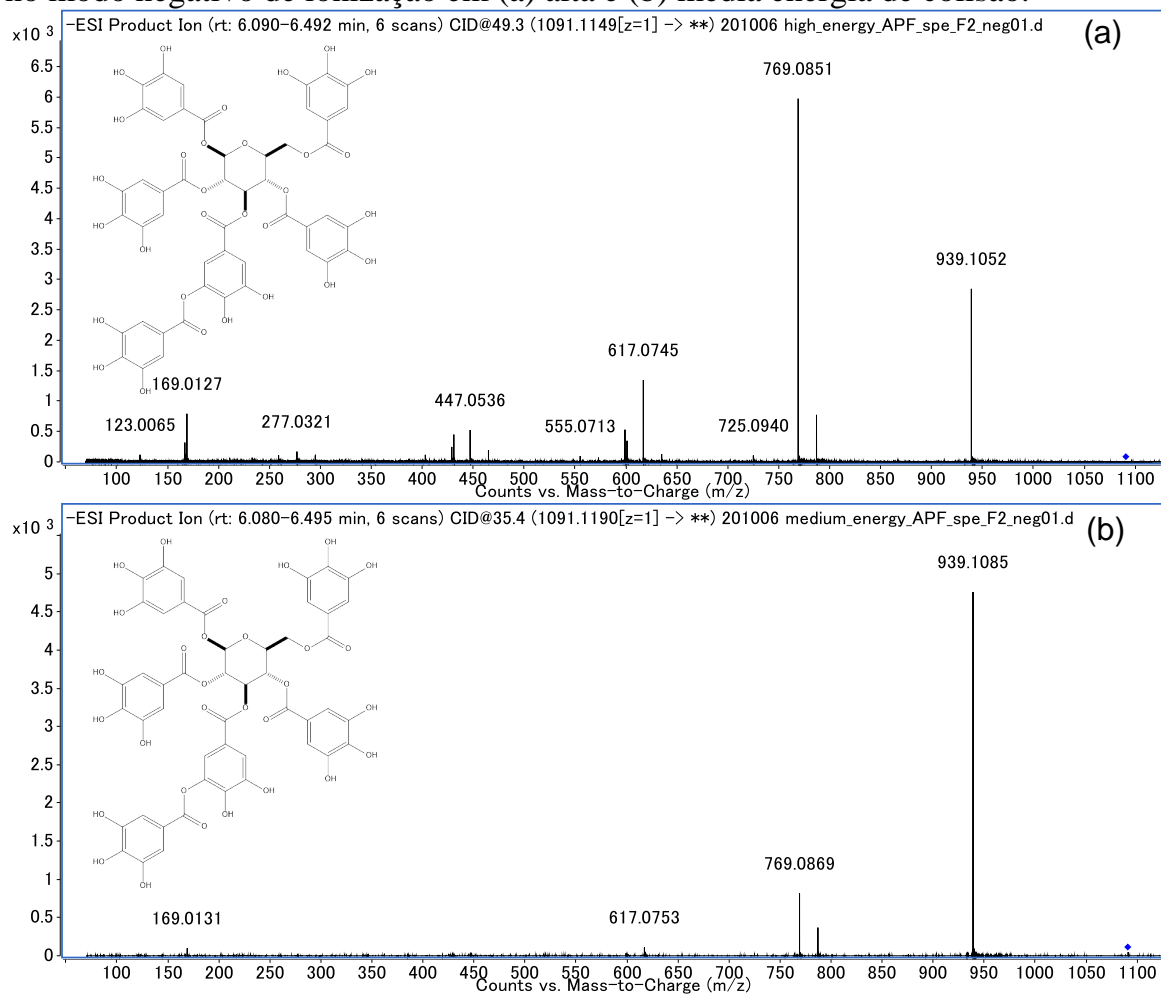


FIGURA A6 - Espectro de MS² do composto de m/z 1243,1293 e tr 6,53 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

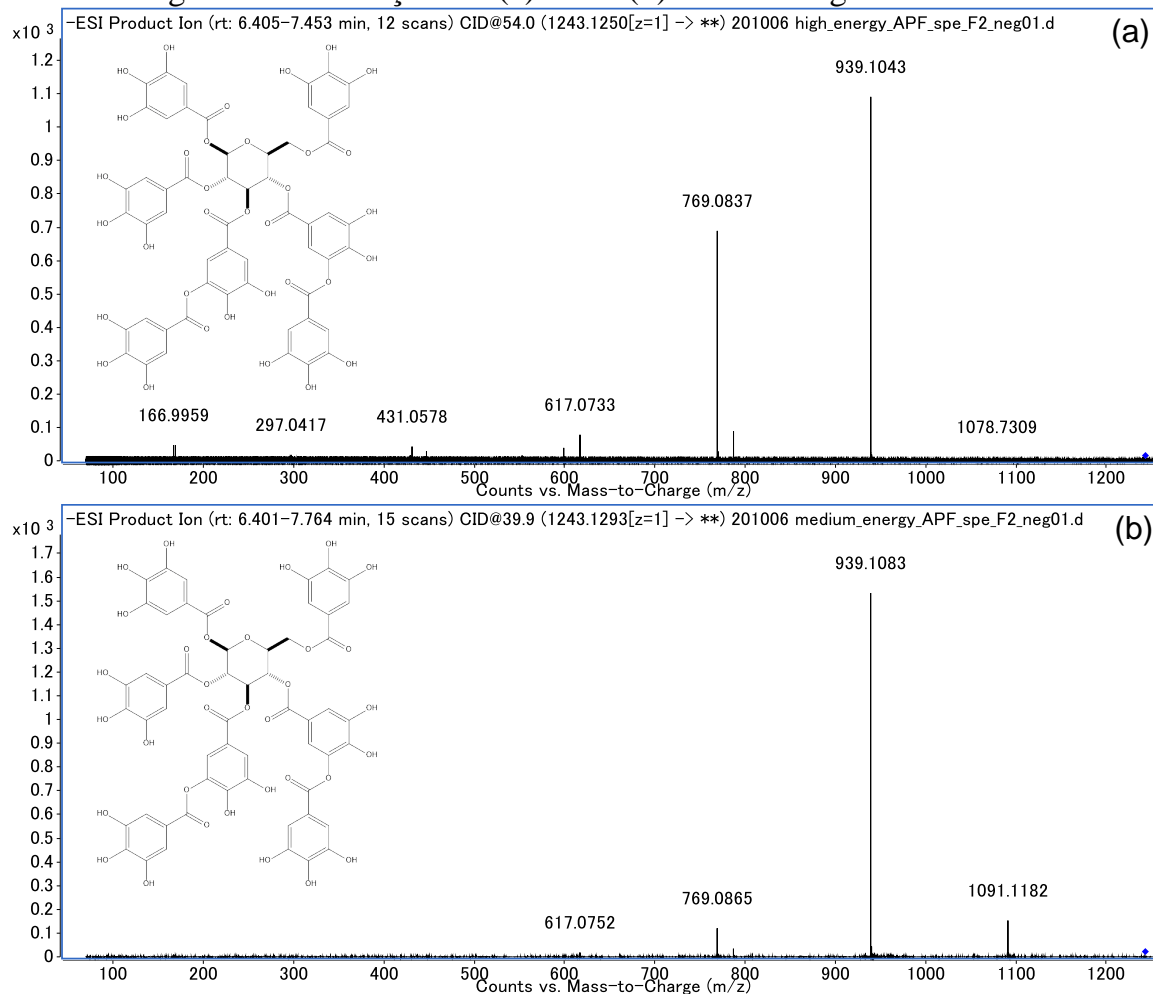


FIGURA A7 - Espectro de MS² do composto de m/z 433,0775 e tr 6,01min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

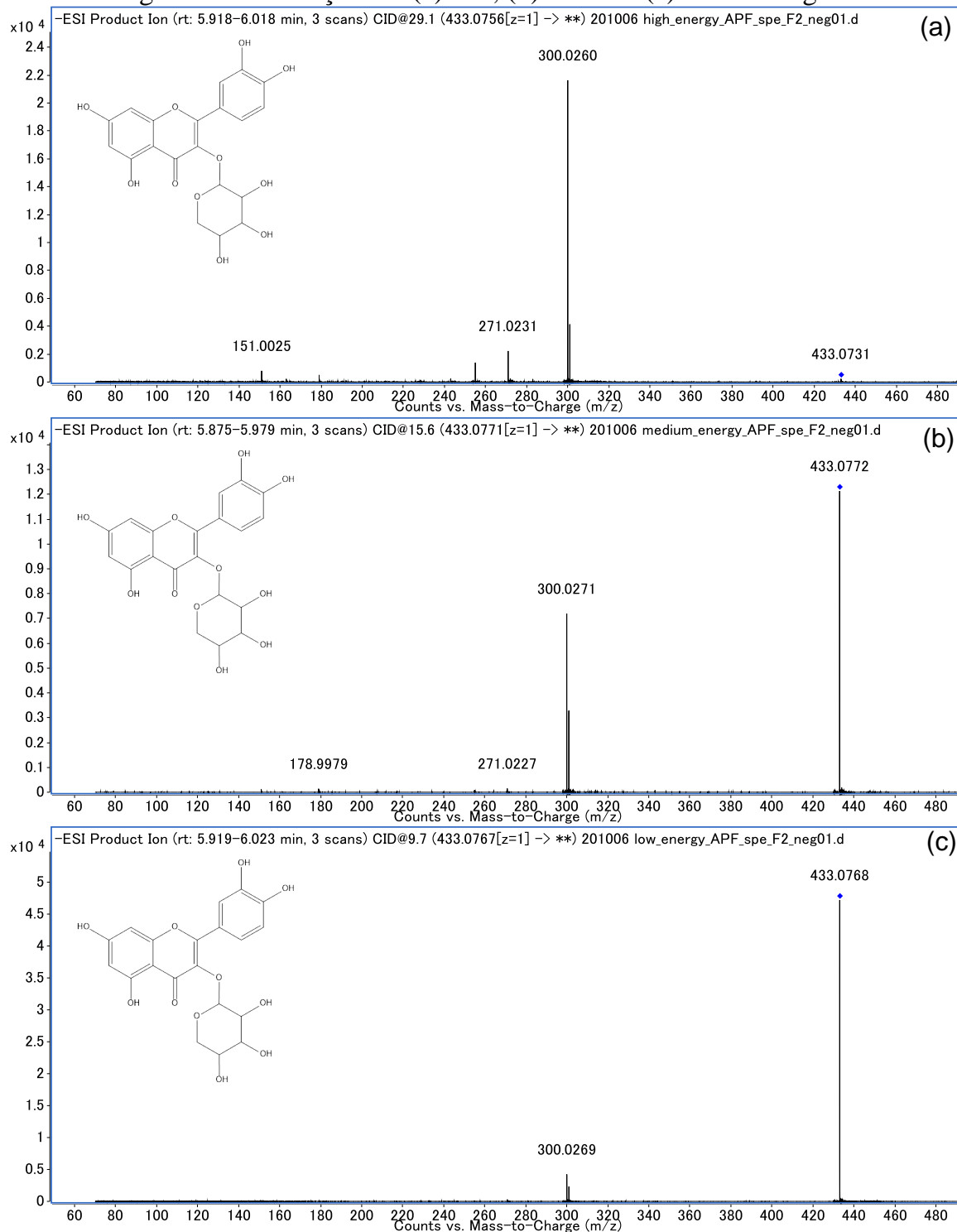


FIGURA A8 - Espectro de MS² do composto de m/z 463,0875 e tr 5,65 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

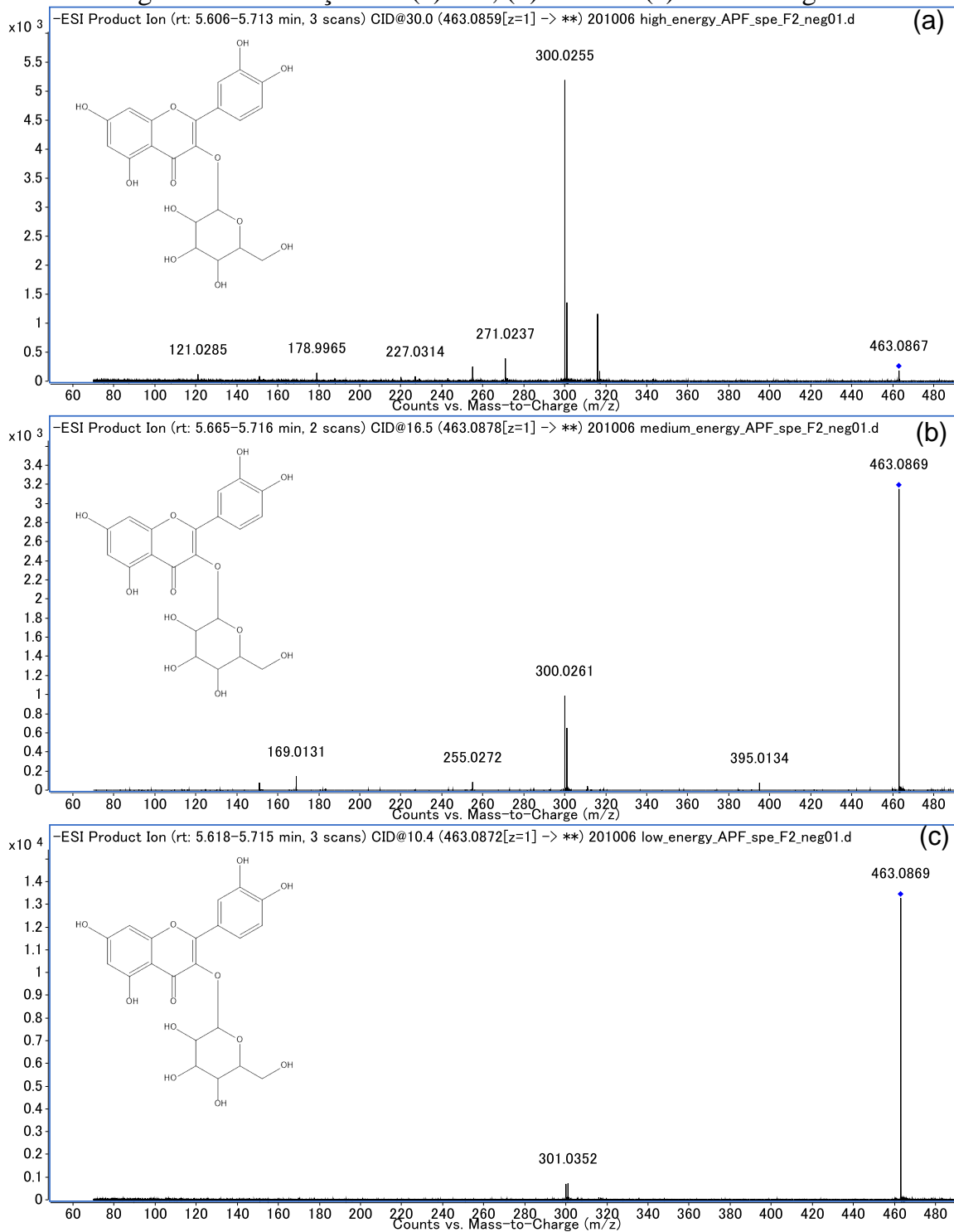


FIGURA A9 - Espectro de MS² do composto de m/z 447,0925 e tr 6,17 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

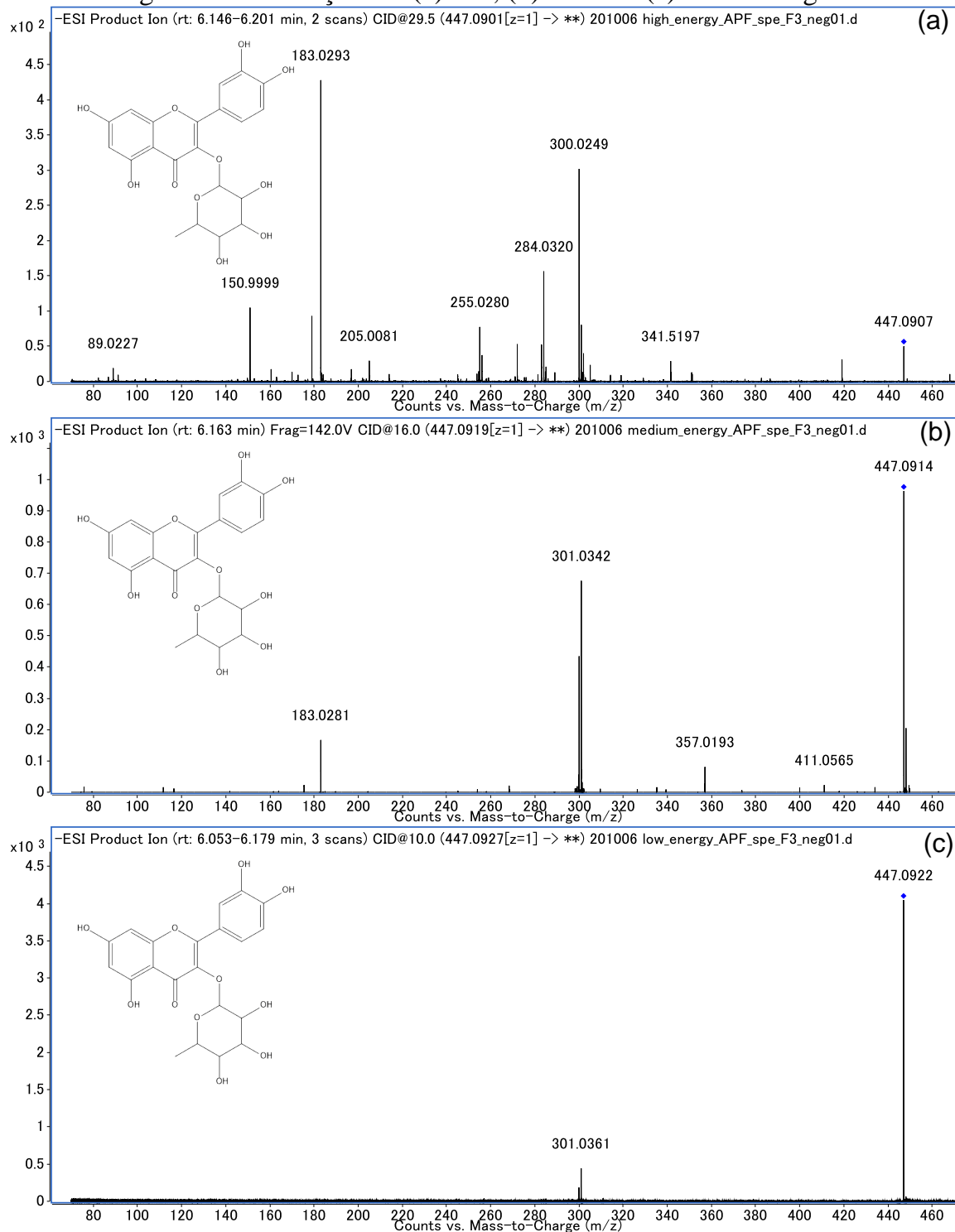


FIGURA A10 - *Mirror match* do íon de m/z 433,08 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como guajavarin. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

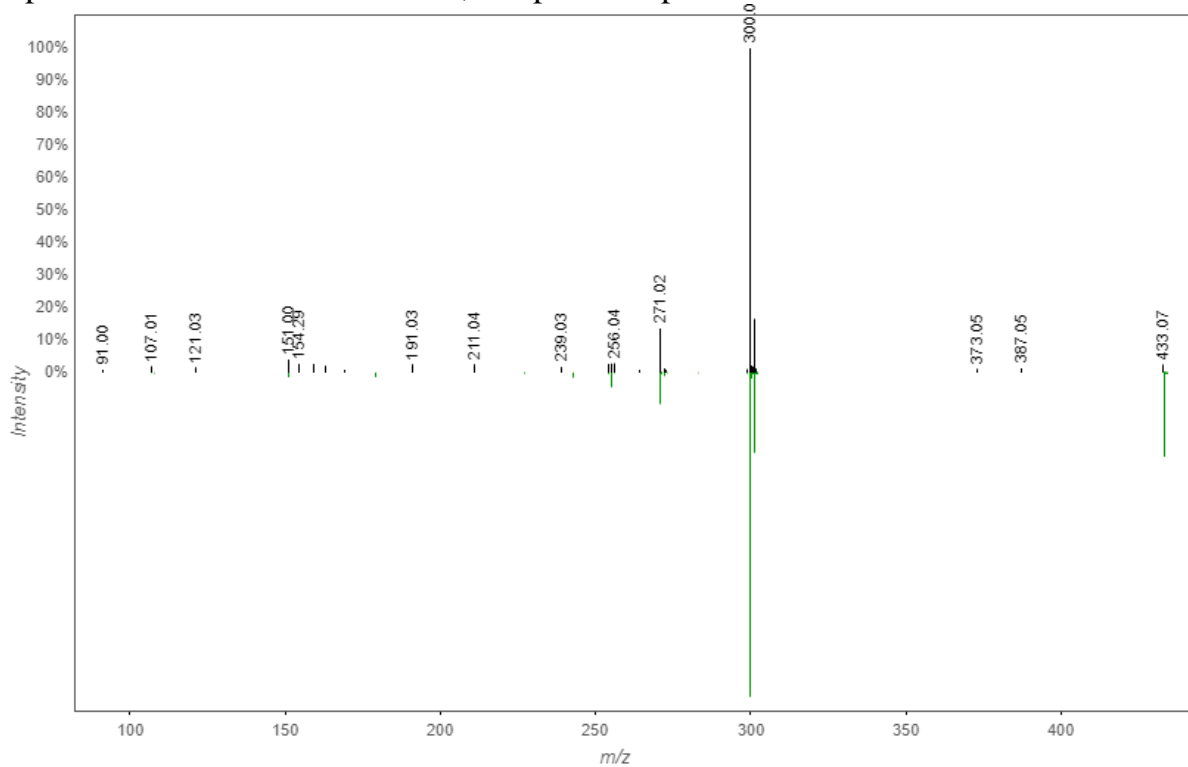


FIGURA A11 - *Mirror match* do íon de m/z 463,09 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como isoquercitrin. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

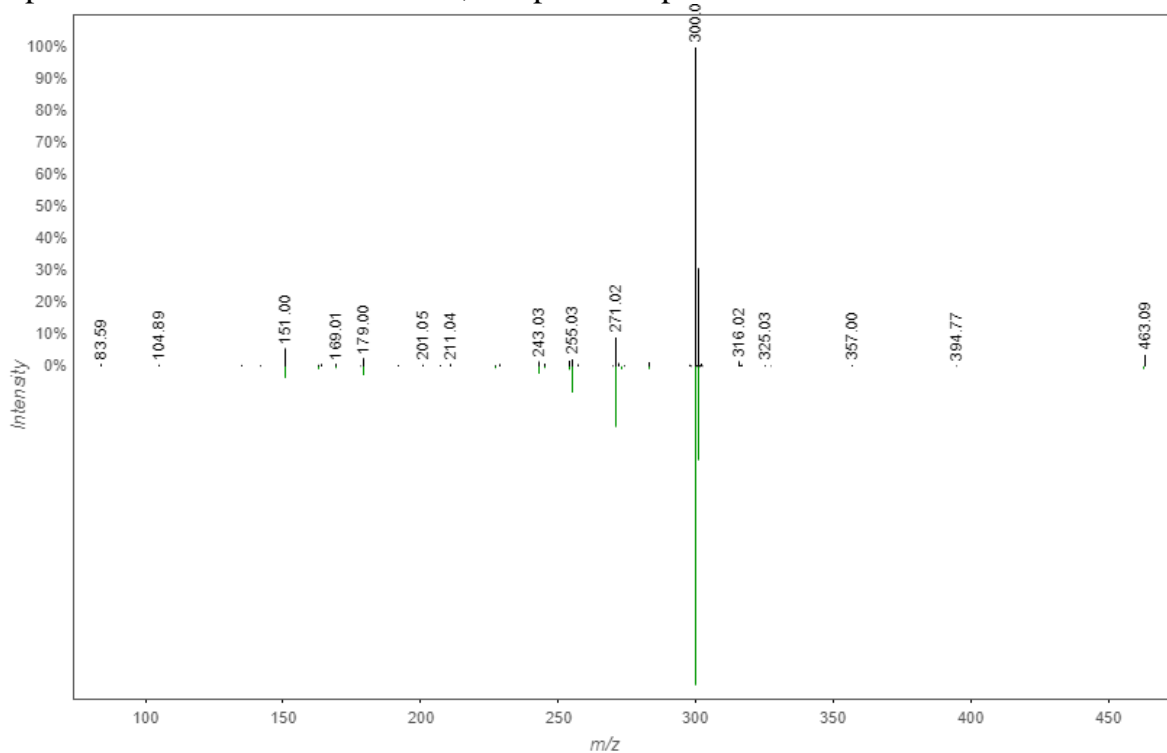


FIGURA A12 - *Mirror match* do íon de m/z 447,09 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como quercitrin. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

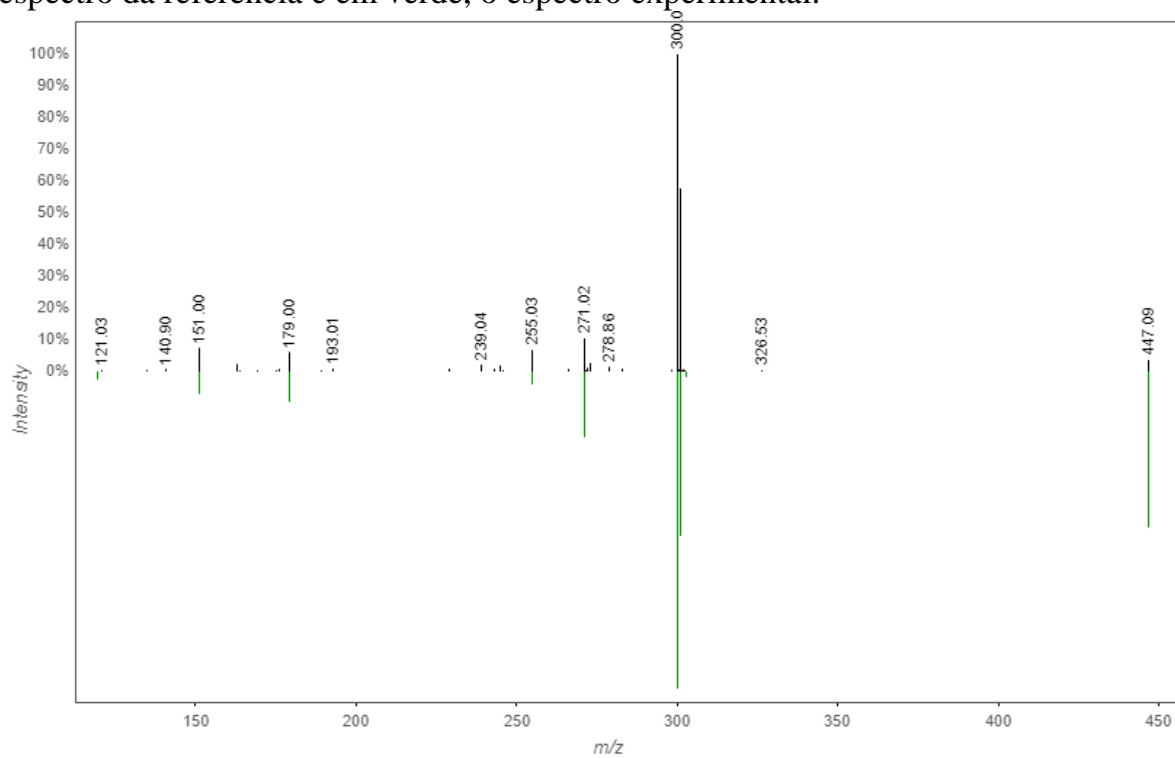


FIGURA A13 - Espectro de MS² do composto de m/z 417,0818 e tr 6,42 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

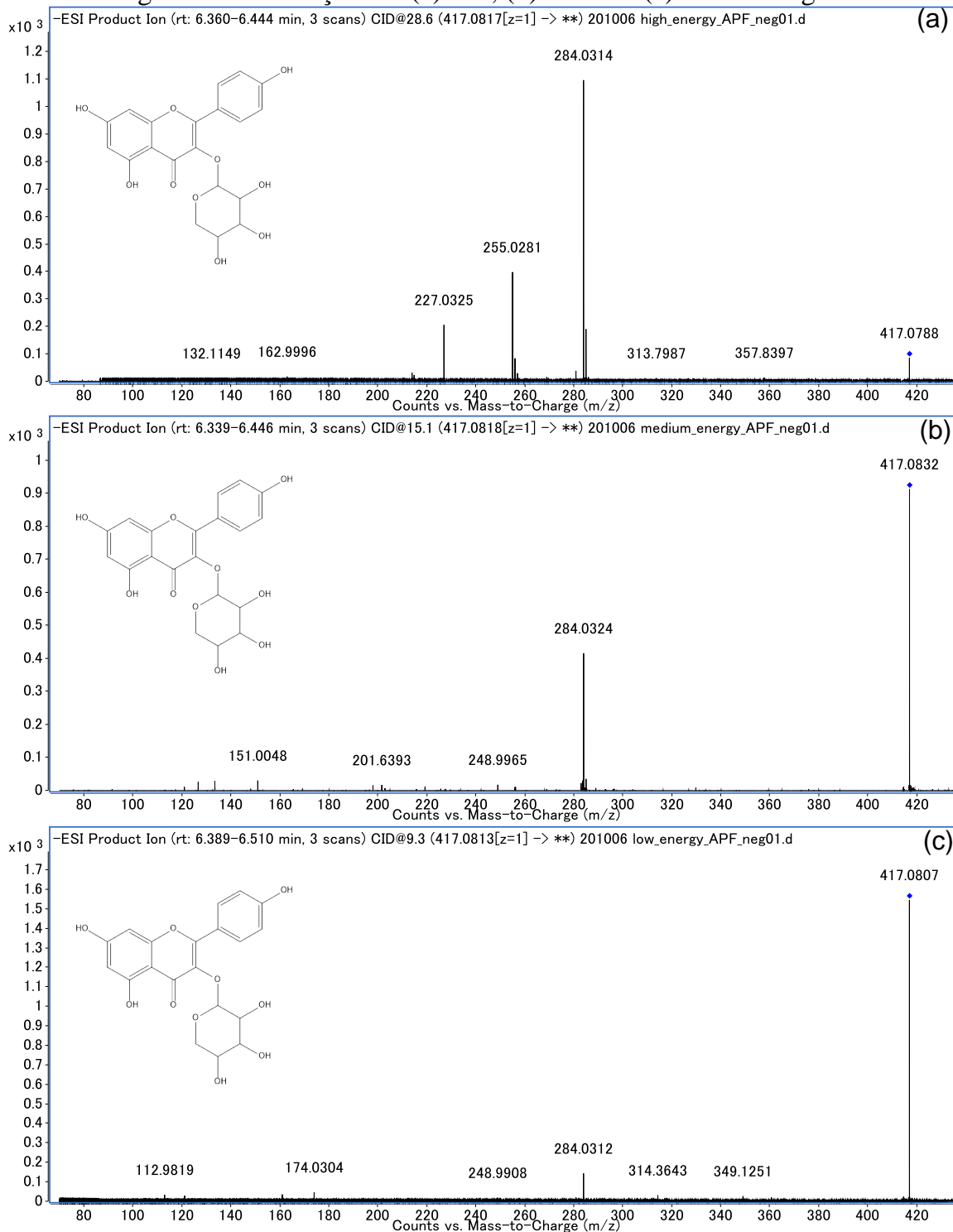


FIGURA A14 - *Mirror match* do íon de m/z 417,08 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como kaempferol-3- α -L-arabinopiranosídeo. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

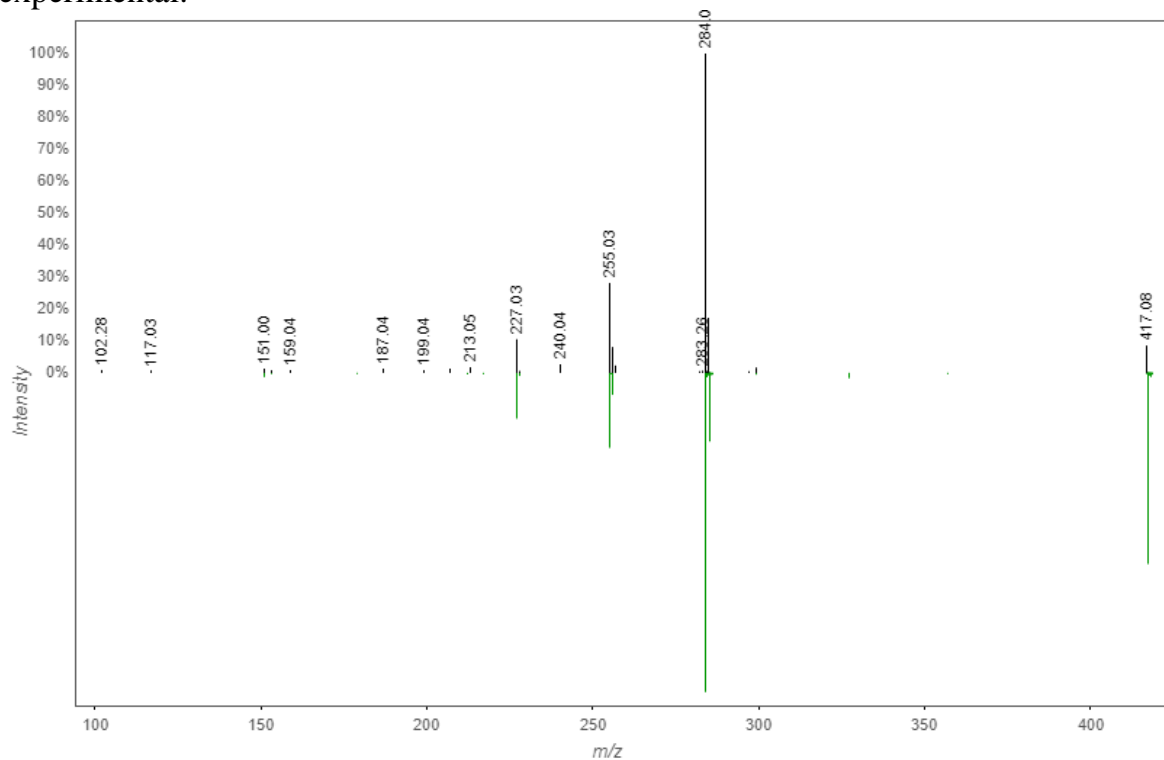


FIGURA A15 - Espectro de MS² do composto de m/z 479,0823 e tr 5,18 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

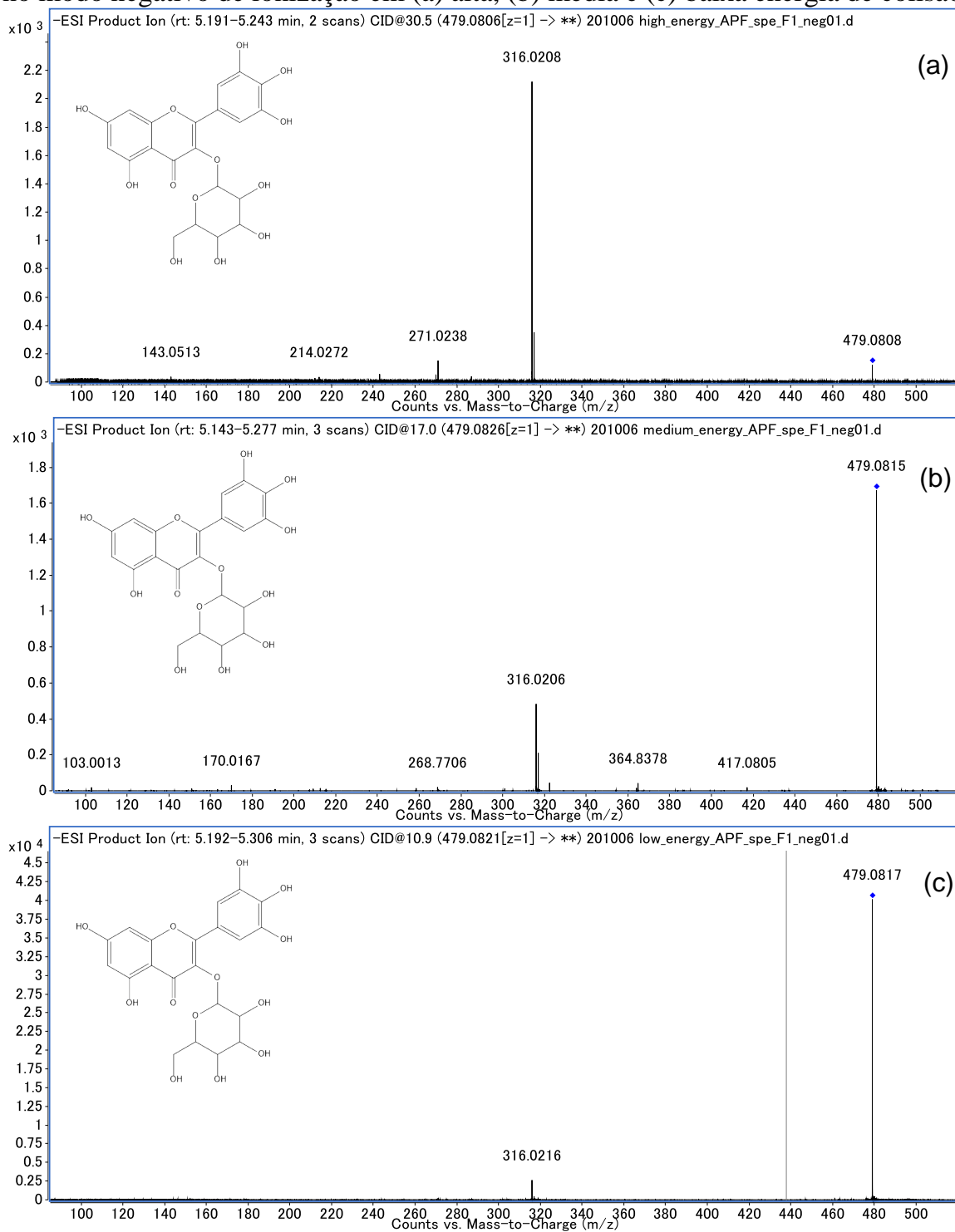


FIGURA A16 - Espectro de MS² do composto de m/z 431,0978 e tr 6,68 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

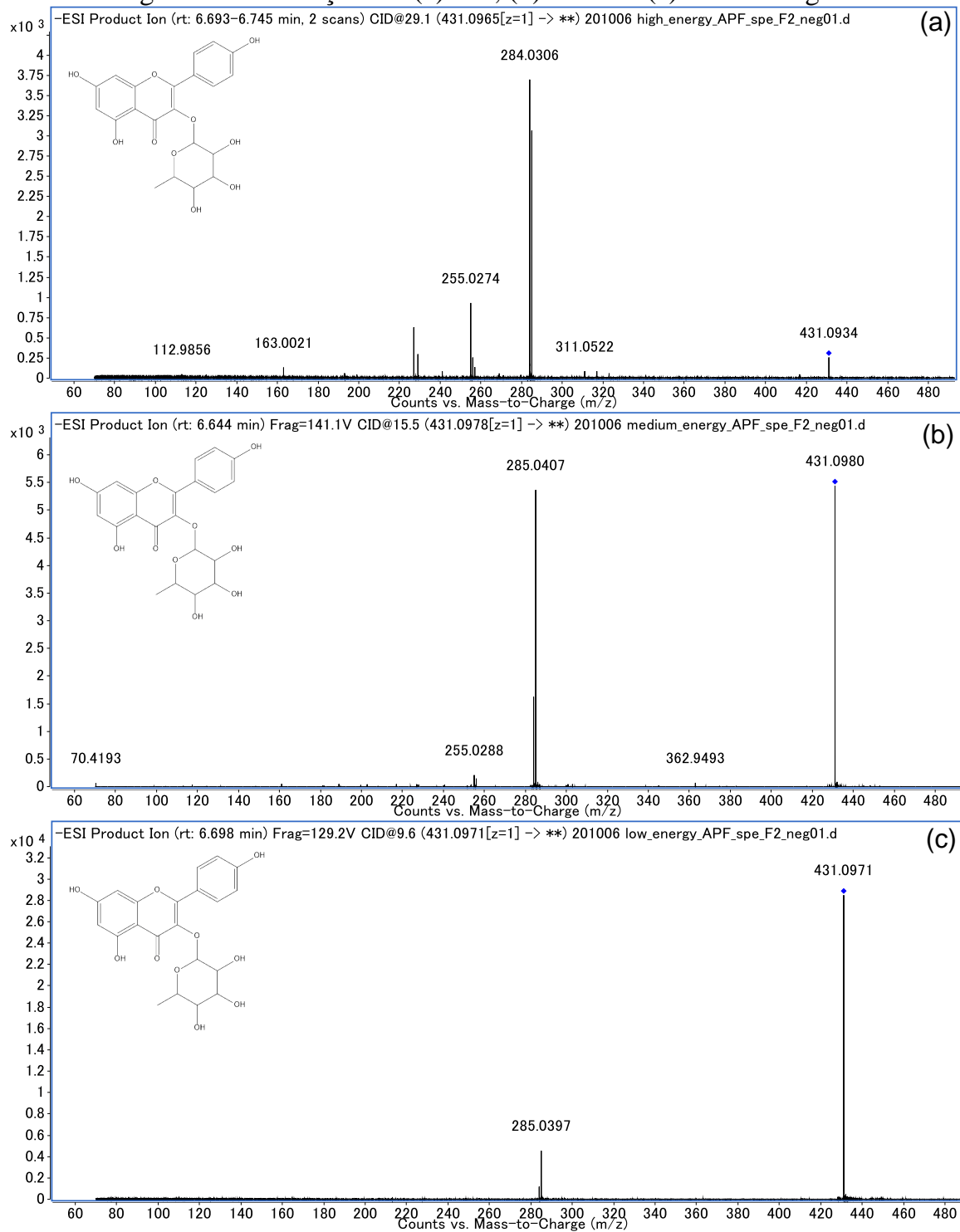


FIGURA A17 - Espectro de MS² do composto de m/z 431,0978 e tr 5,54 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

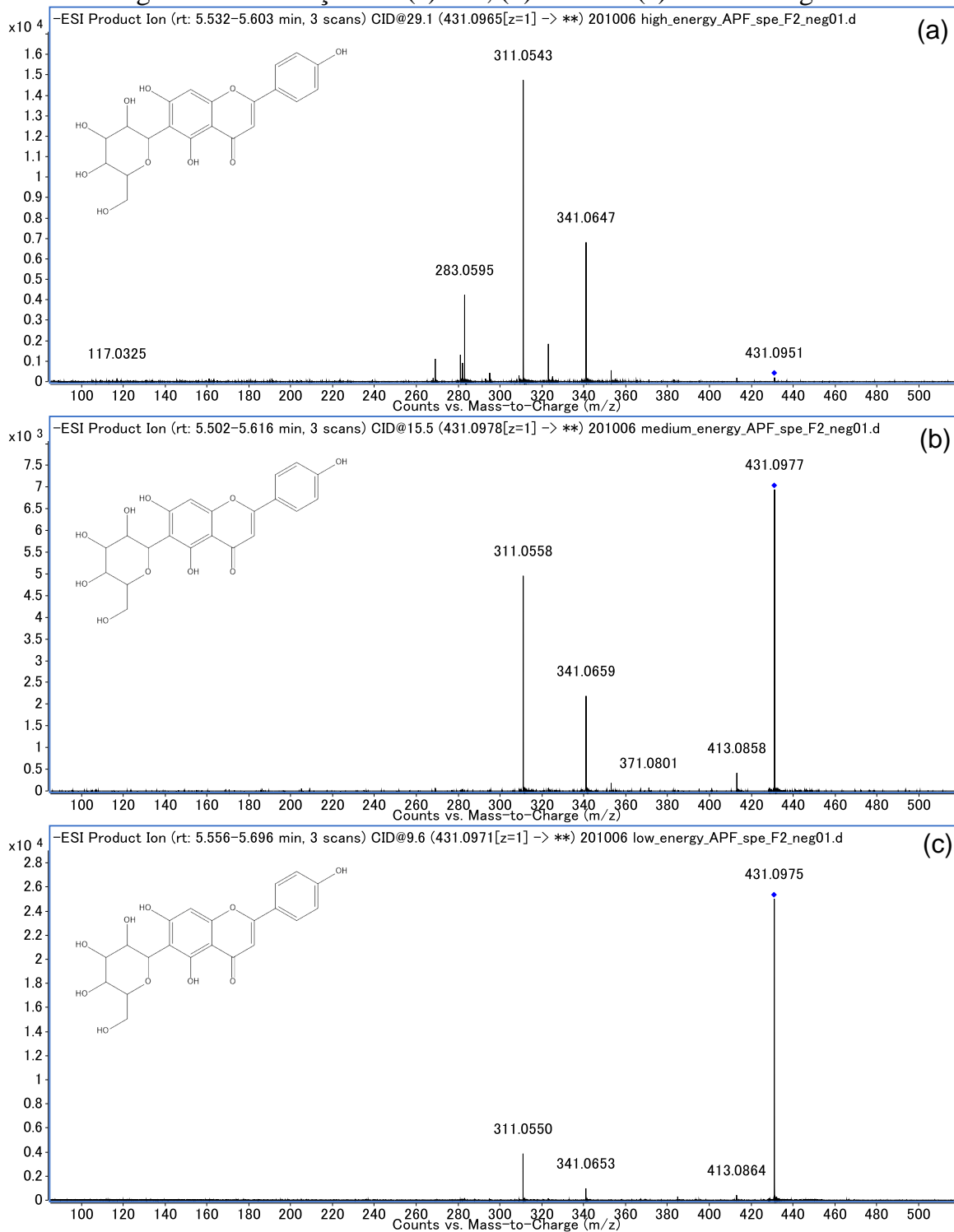


FIGURA A18 - *Mirror match* do íon de m/z 431,10 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como afzelina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

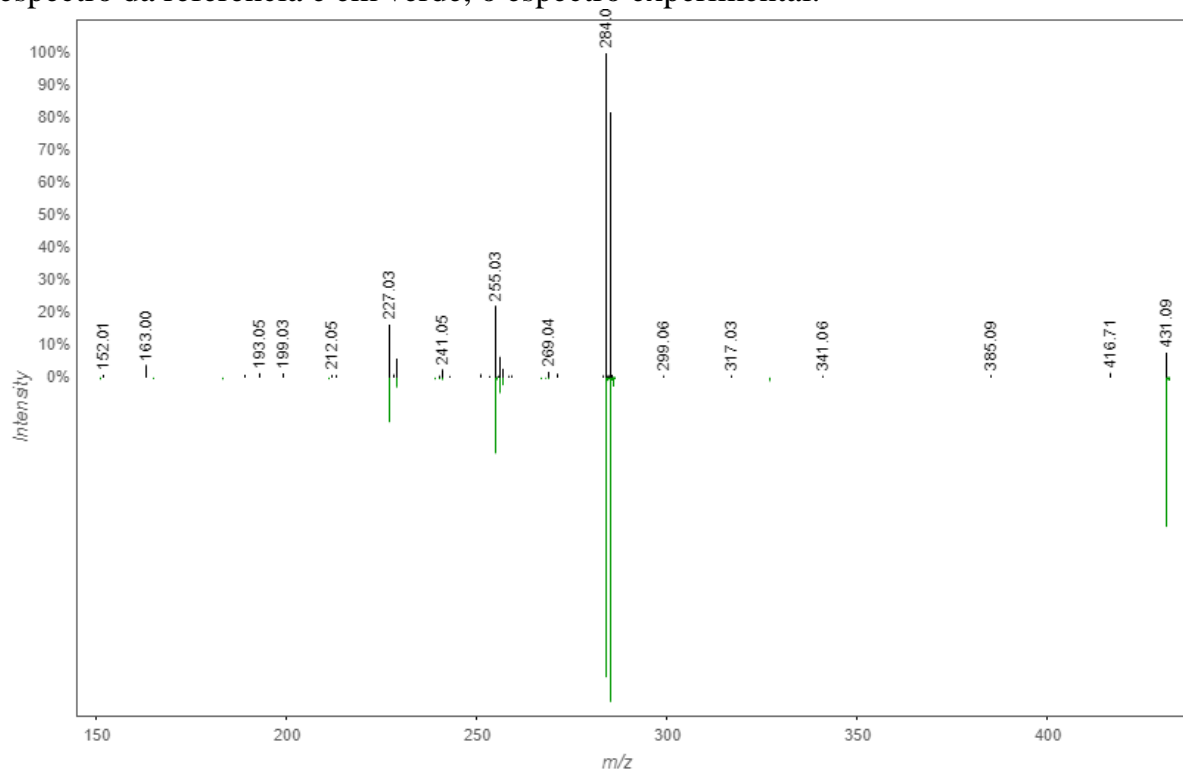


FIGURA A19 - *Mirror match* do íon de m/z 431,10 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como isovitexina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

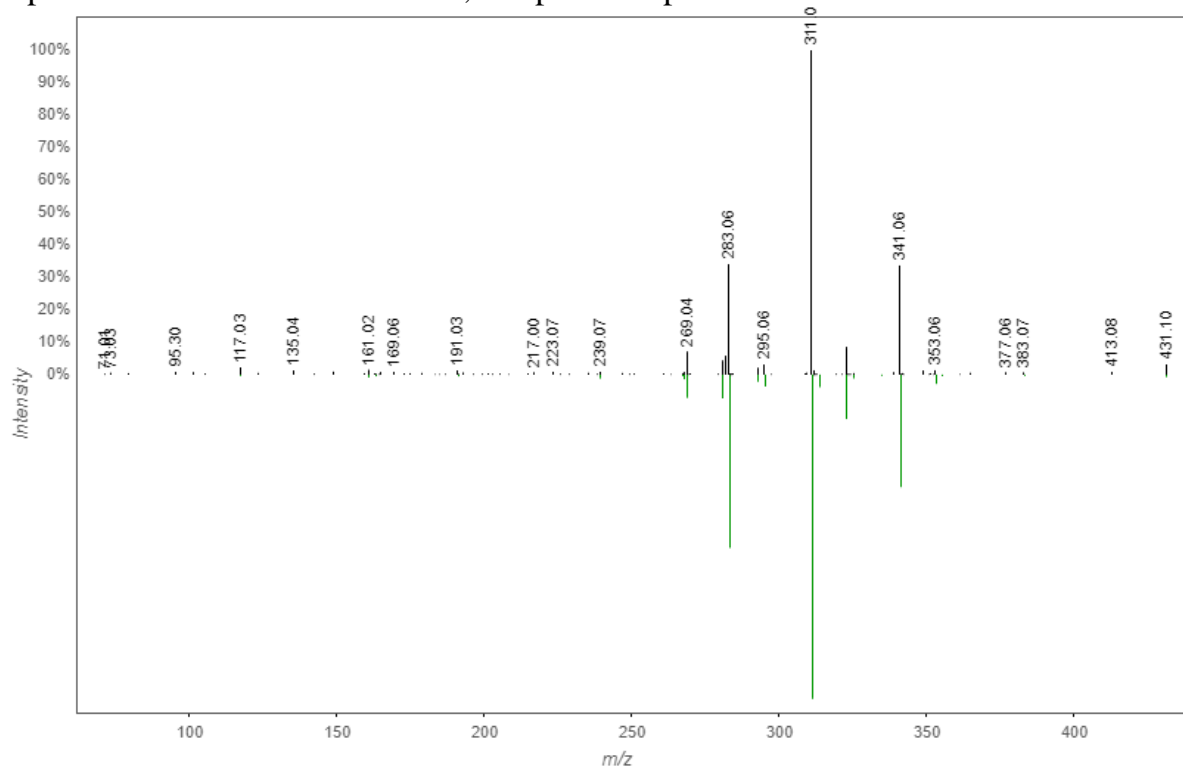


FIGURA A20 - Espectro de MS² do composto de m/z 461,0716 e tr 6,27 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

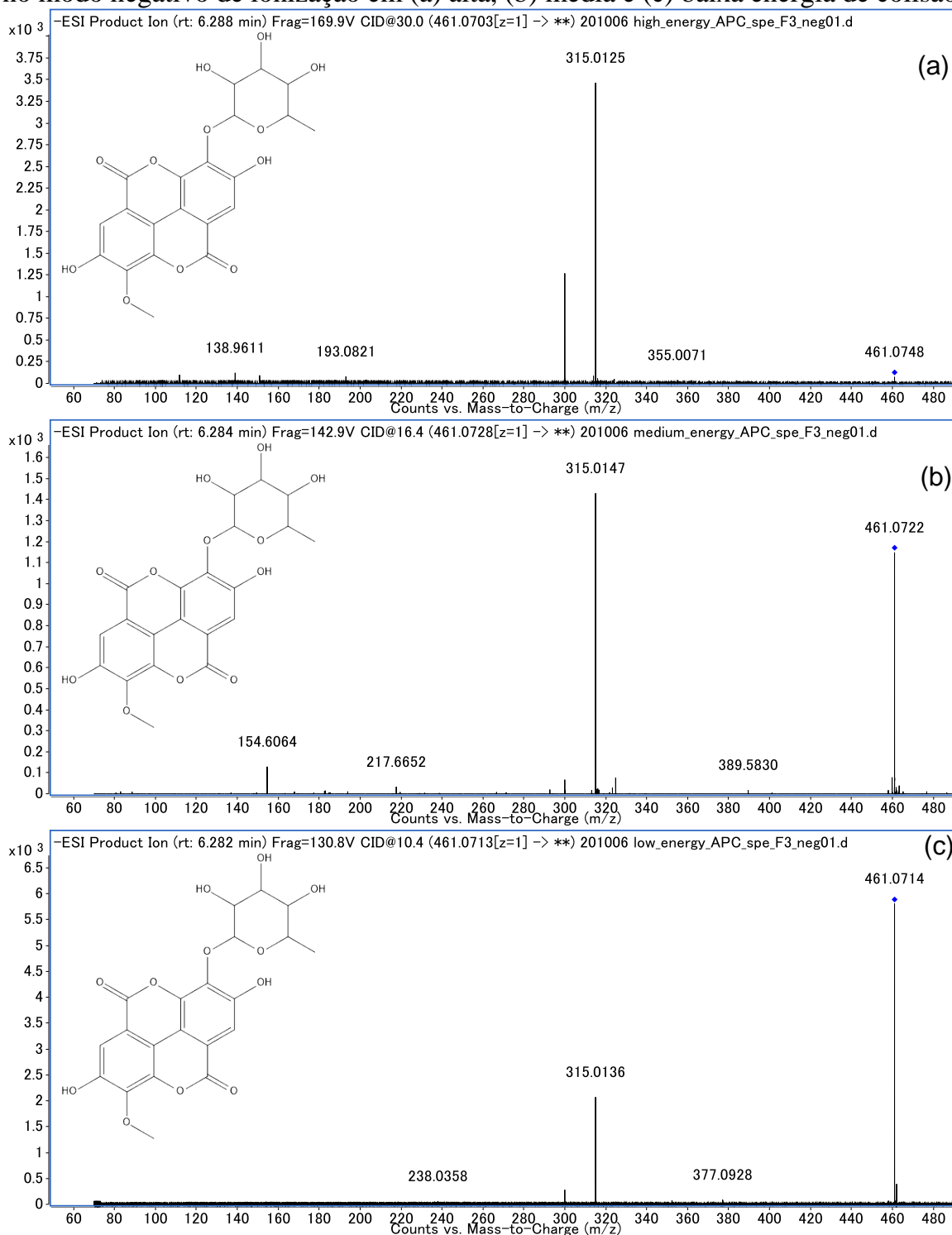


FIGURA A21 - Espectro de MS² do composto de m/z 303,0505 e tr 7,72 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

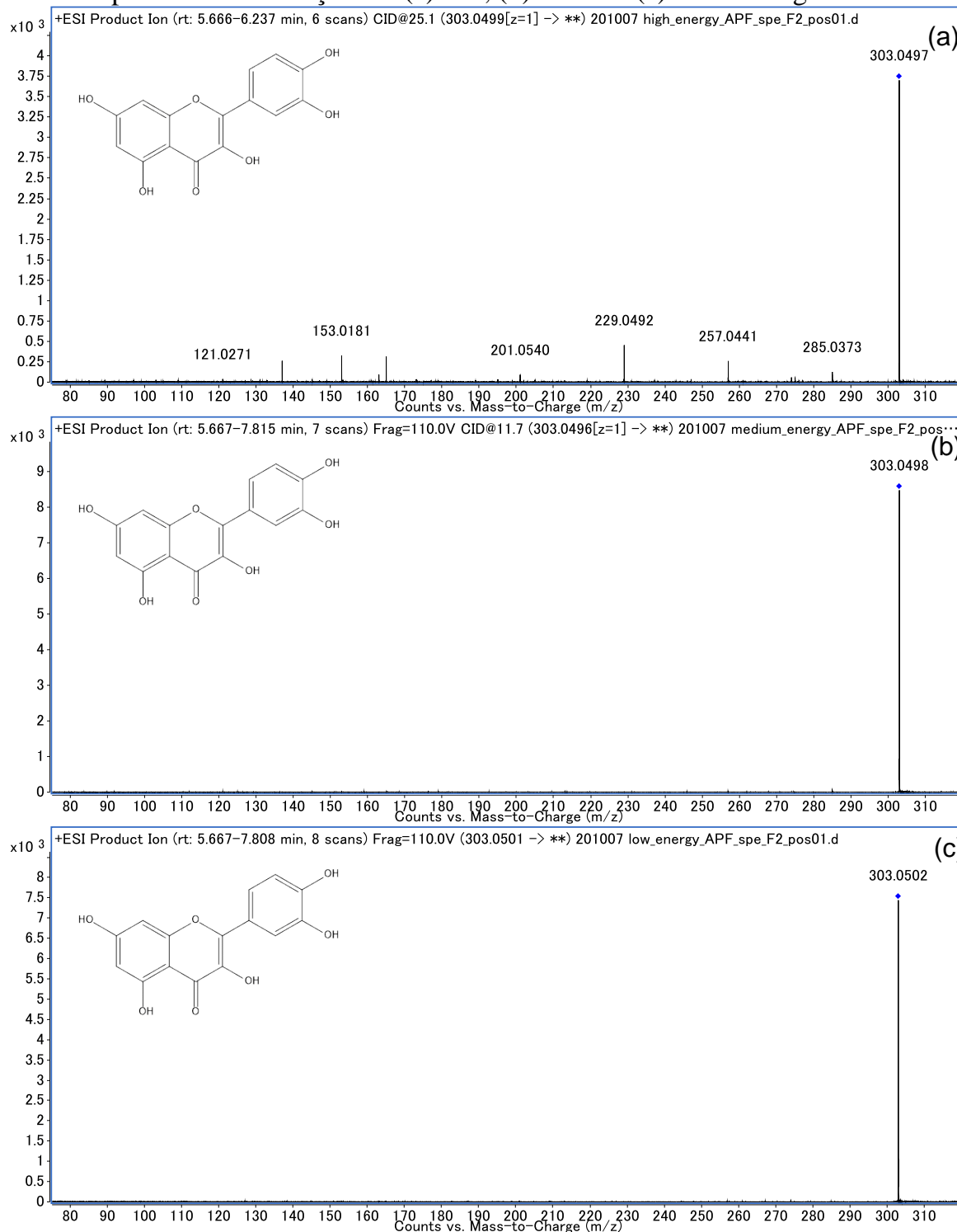


FIGURA A22 - *Mirror match* do íon de m/z 303,05 obtido no modo positivo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como quercetina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

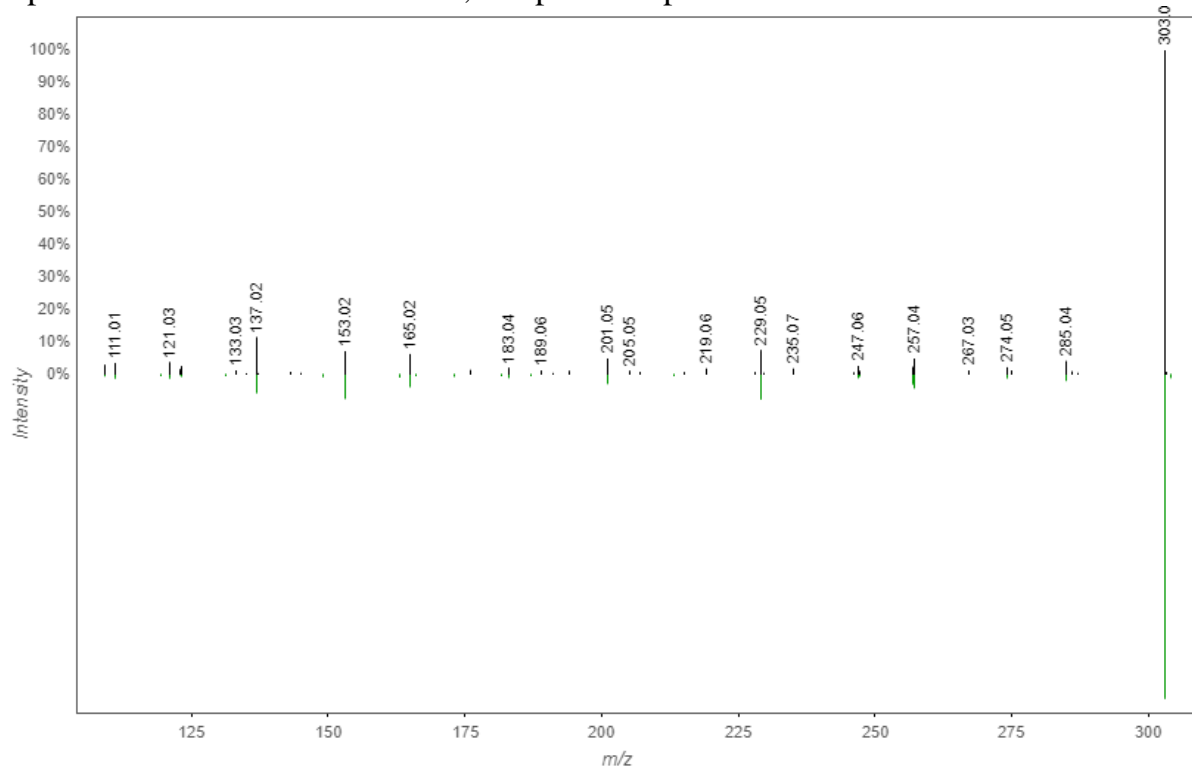


FIGURA A23 - Espectro de MS² do composto de m/z 319,0450 e tr 5,60 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

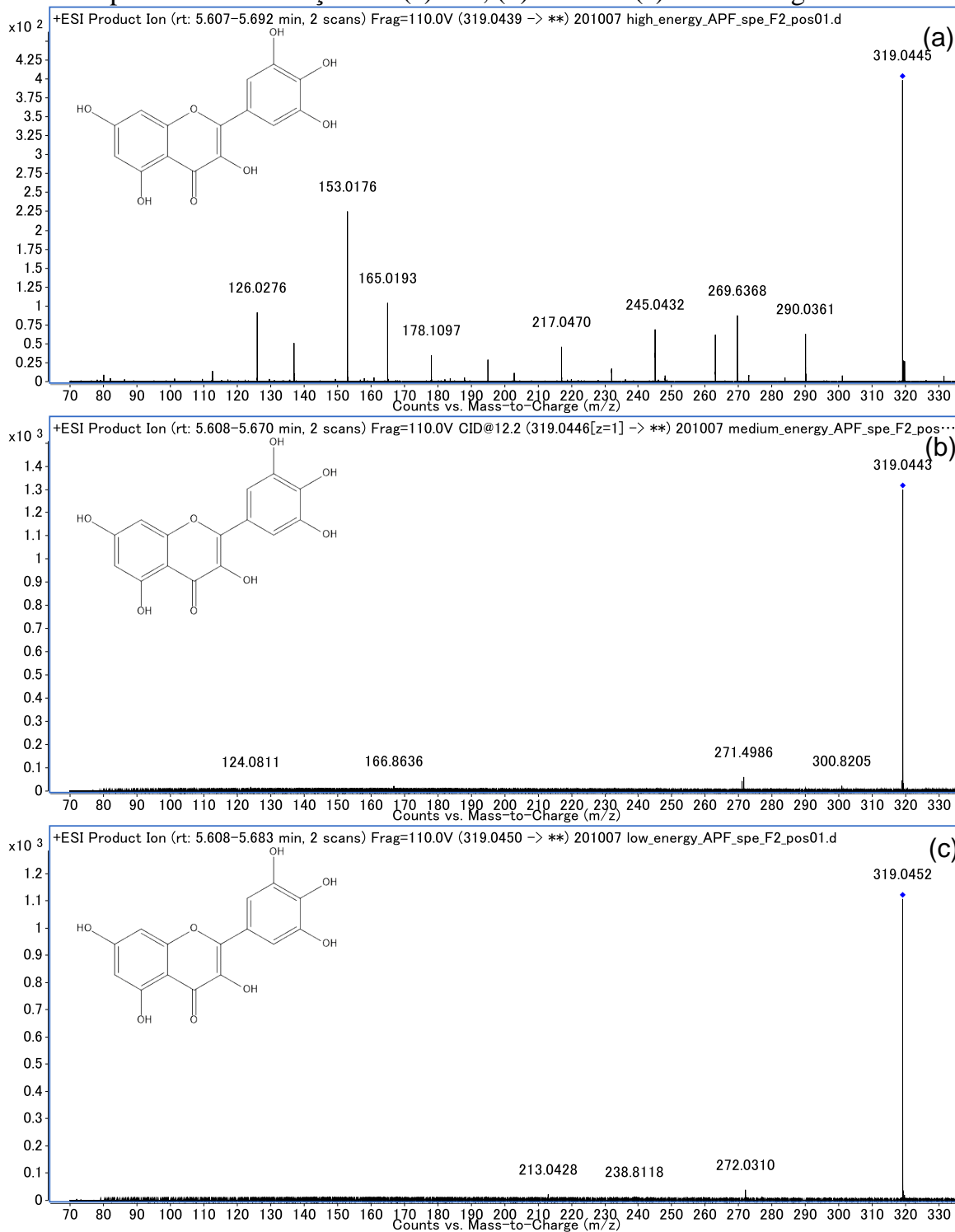


FIGURA A24 - Espectro de MS² do composto de m/z 479,0822 e tr 5,70 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

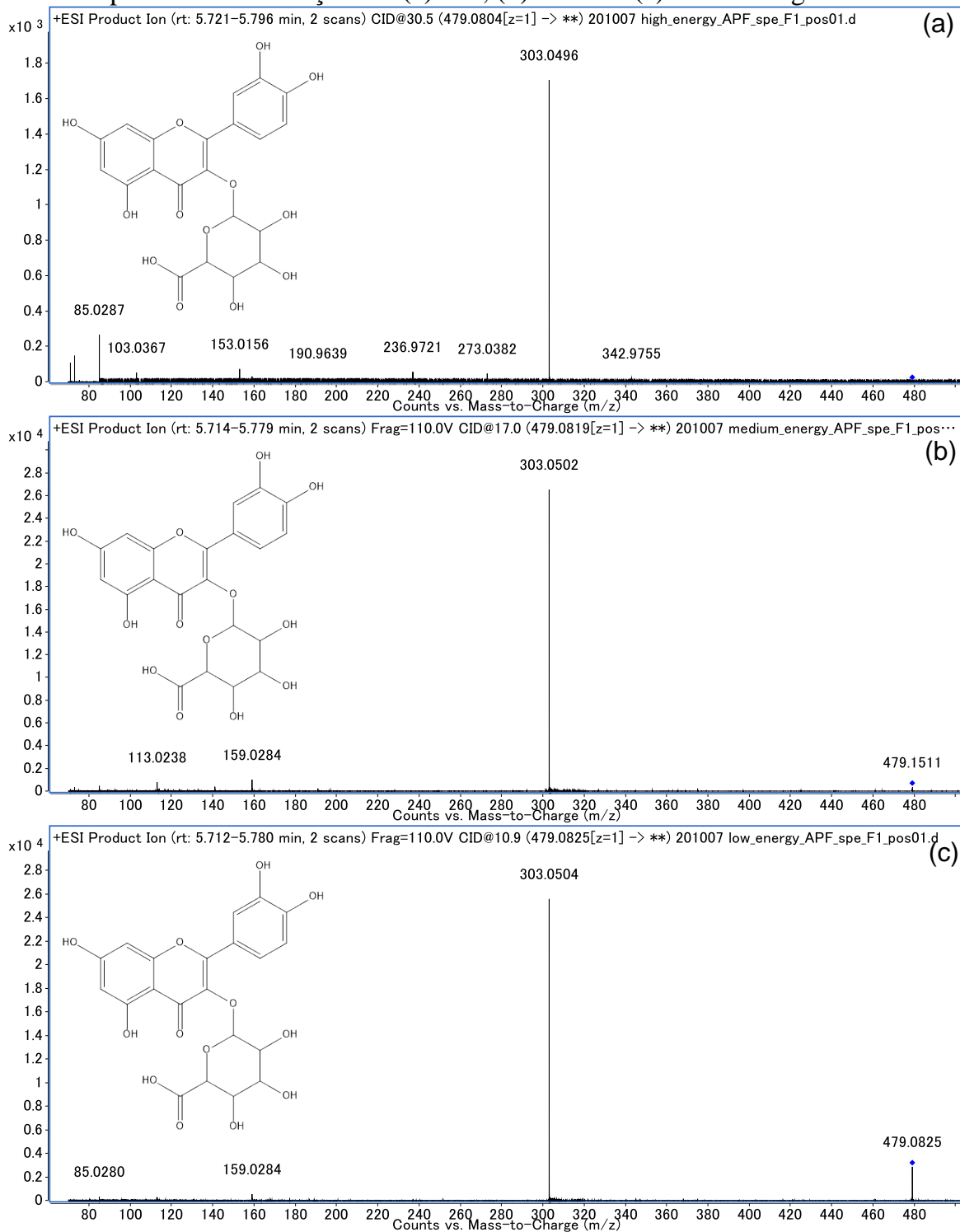


FIGURA A25 - Espectro de MS² do composto de m/z 479,1187 e tr 7,20 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

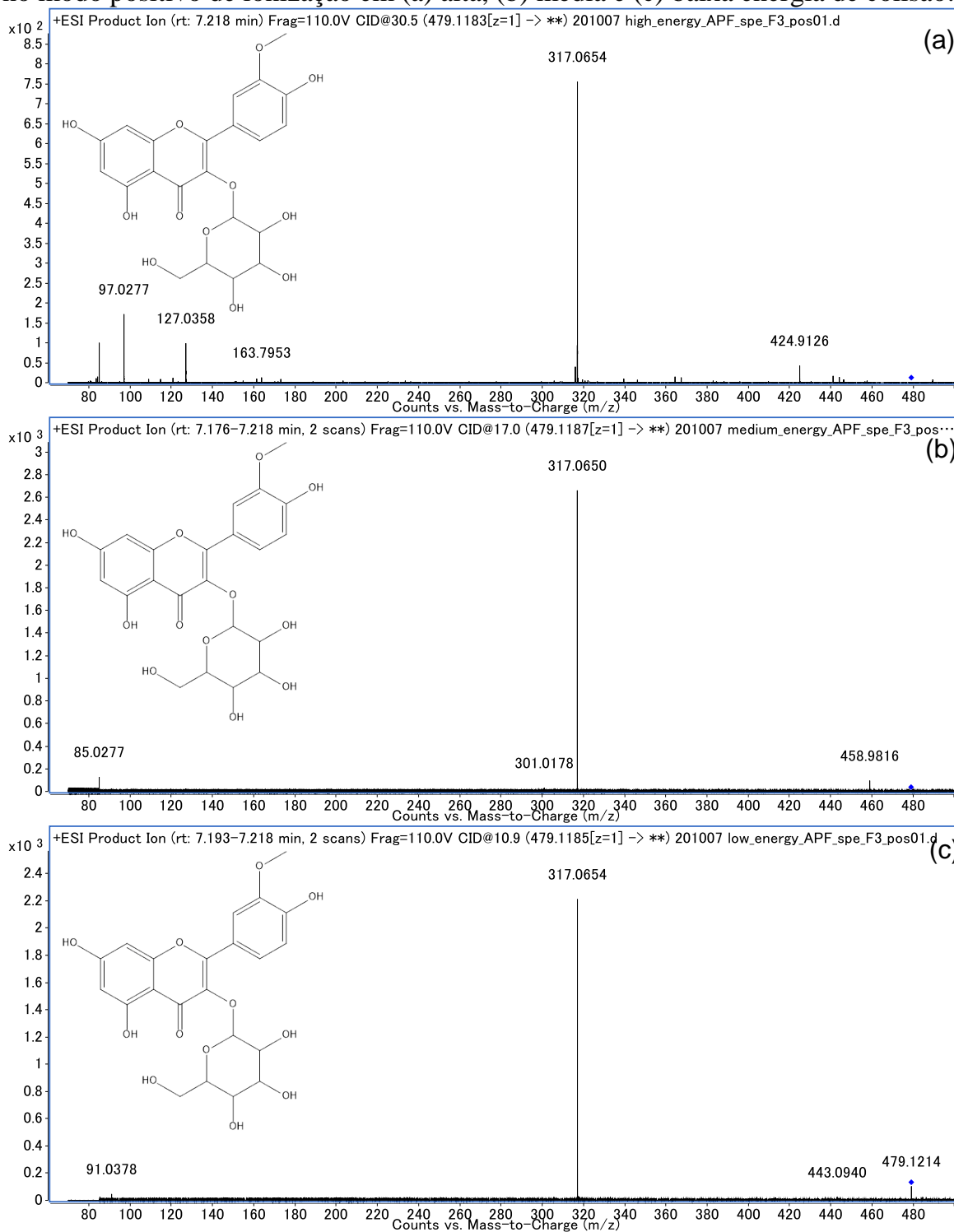


FIGURA A26 - *Mirror match* do íon de m/z 301,00 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido elágico. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

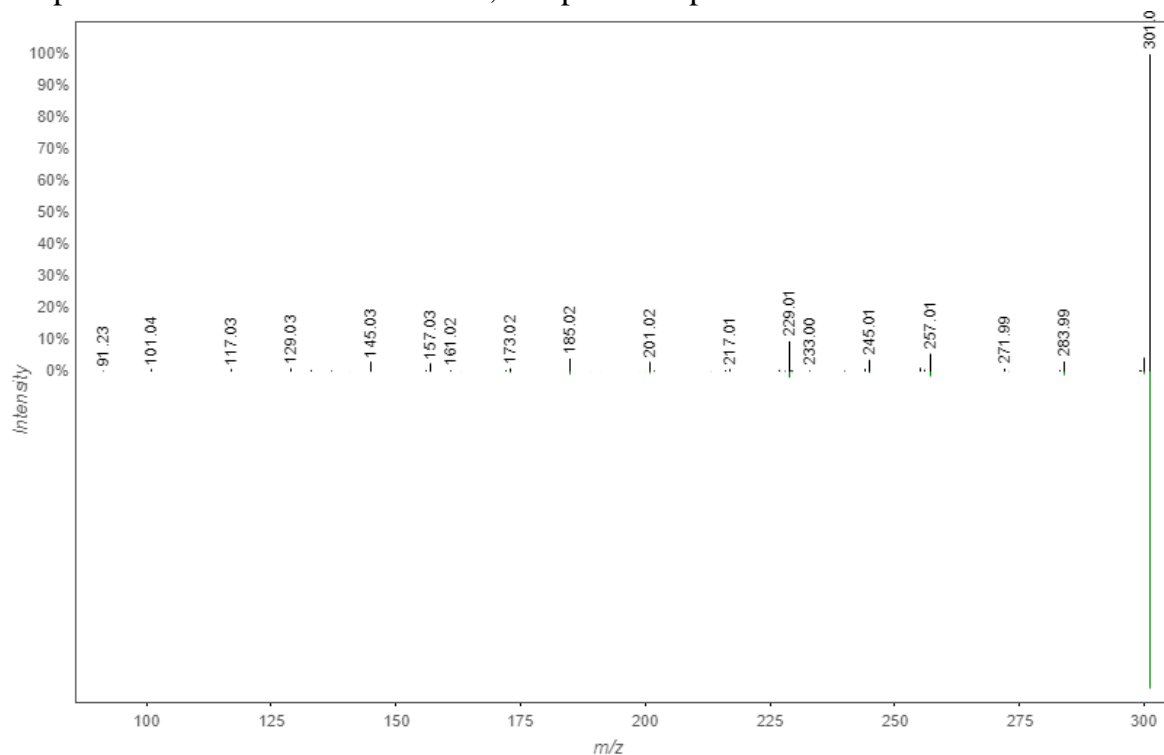


FIGURA A27 - *Mirror match* do íon de m/z 599,10 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como quercetina-3-O-(2''galoil)- α -L-ramnopyranosídeo. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

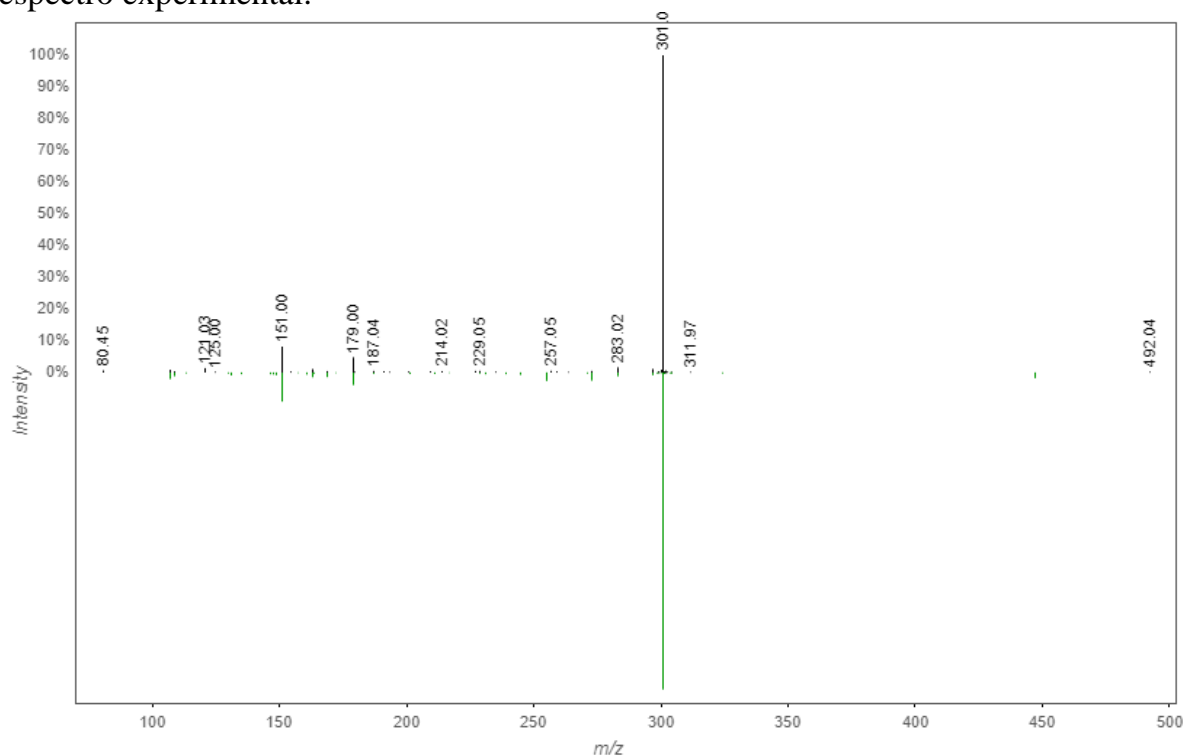


FIGURA A28 - Espectro de MS² do composto de m/z 599,1030 e t_R 7,05 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

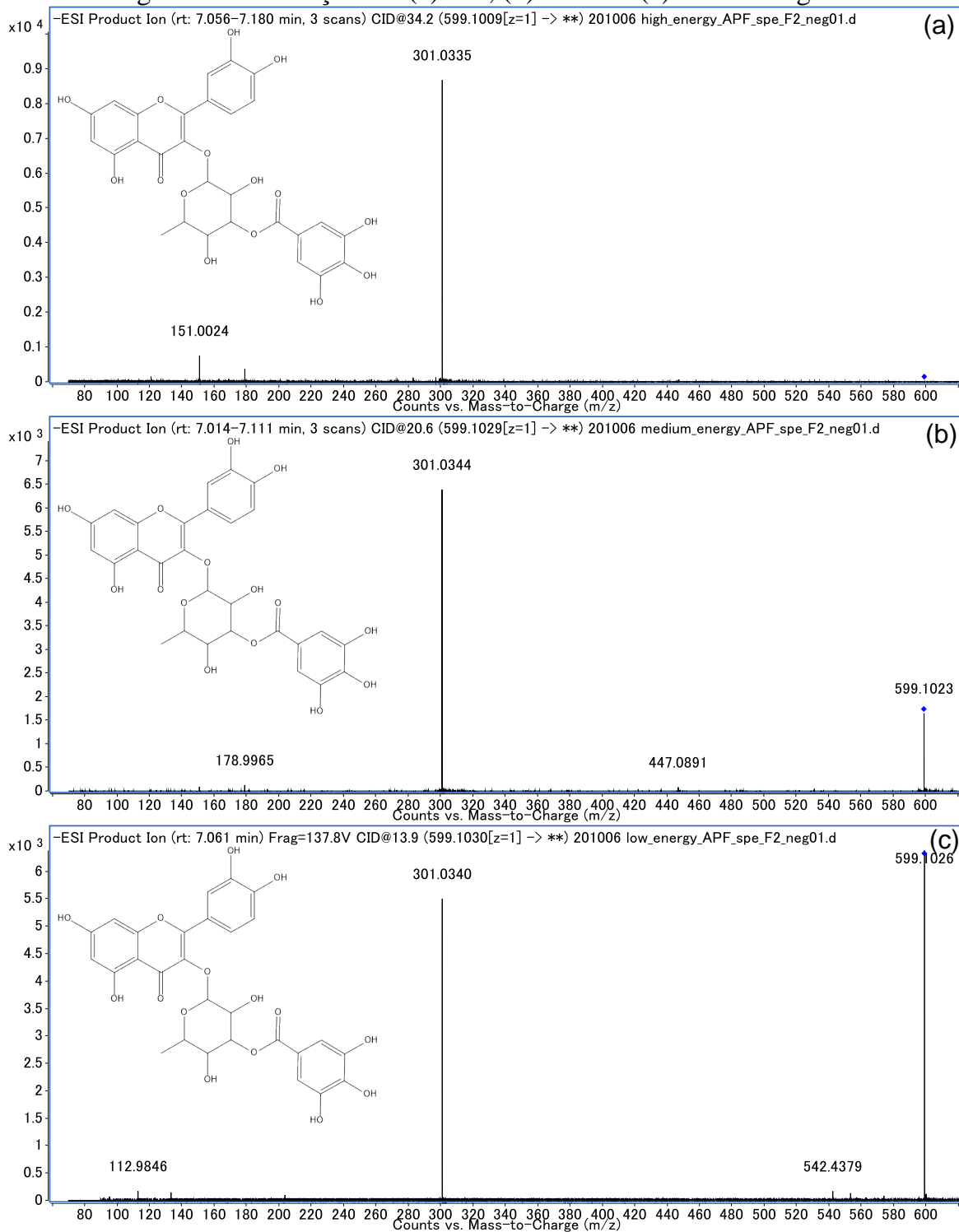


FIGURA A29 - Espectro de MS² do composto de m/z 300,9985 e tr 5,70 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

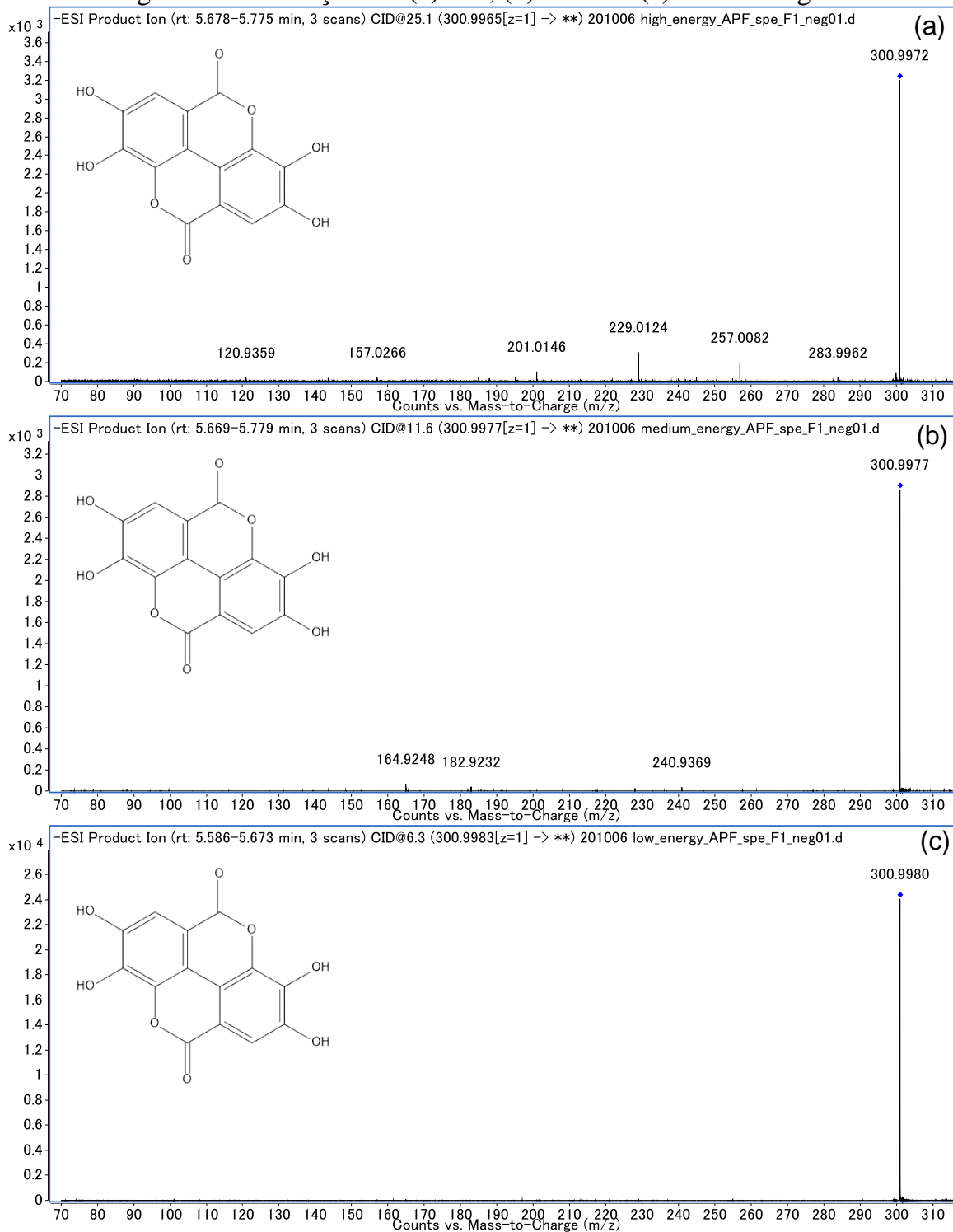


FIGURA A30 - Espectro de MS² do composto de m/z 305,0659 e tr 0,82 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

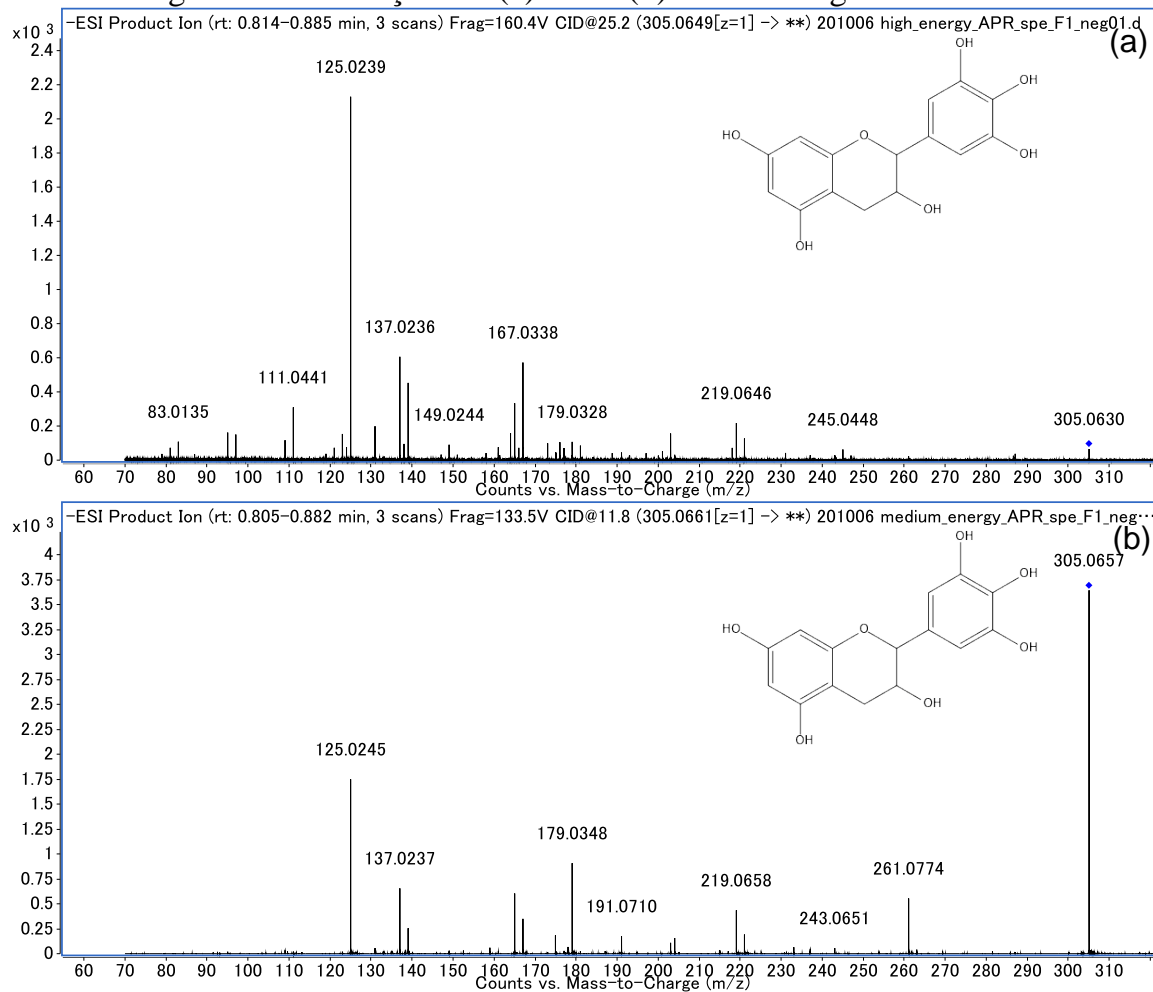


FIGURA A31 - Espectro de MS² do composto de m/z 305,0659 e tr 1,55 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média e energia de colisão.

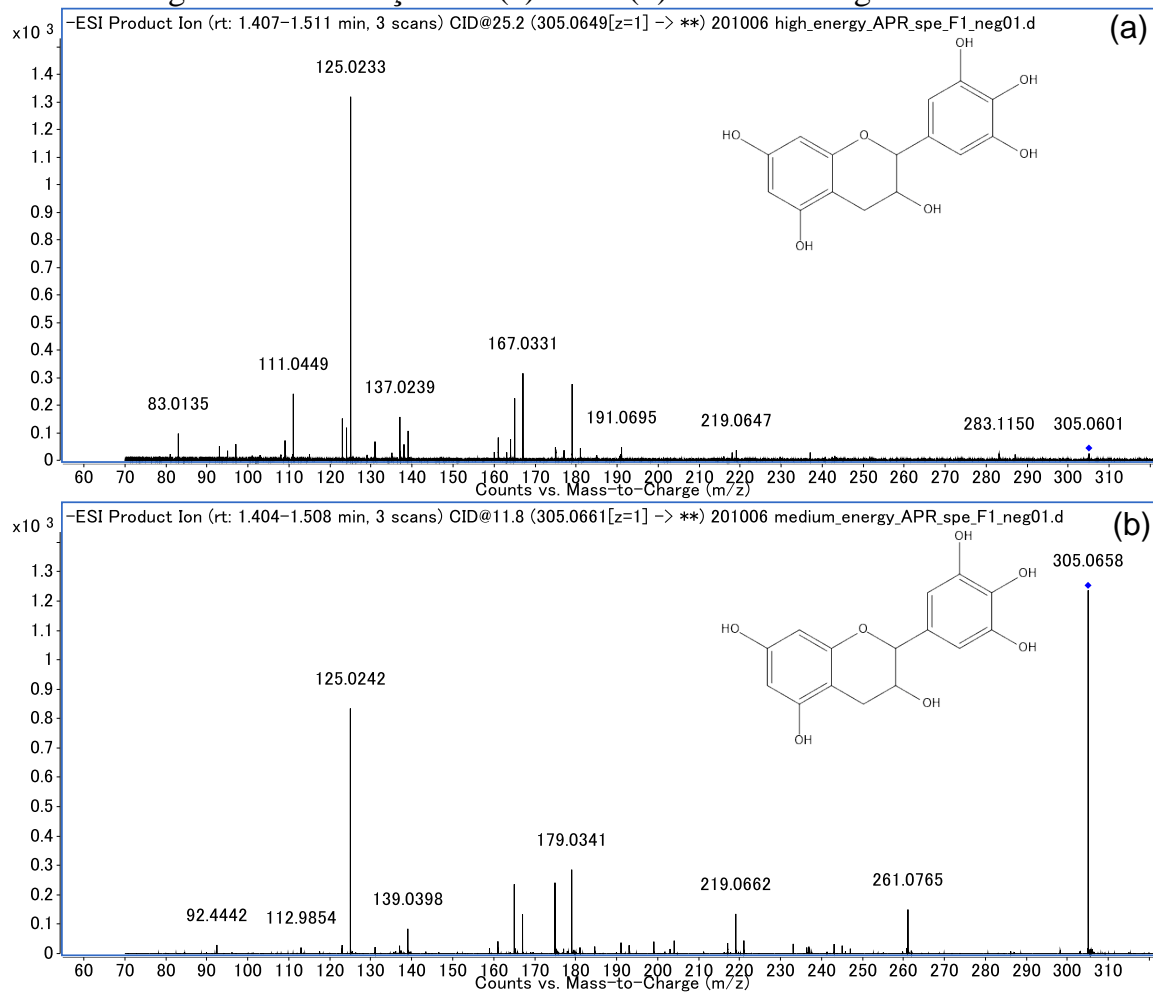


FIGURA A32 - Espectro de MS² do composto de m/z 305,0659 e tr 3,01 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

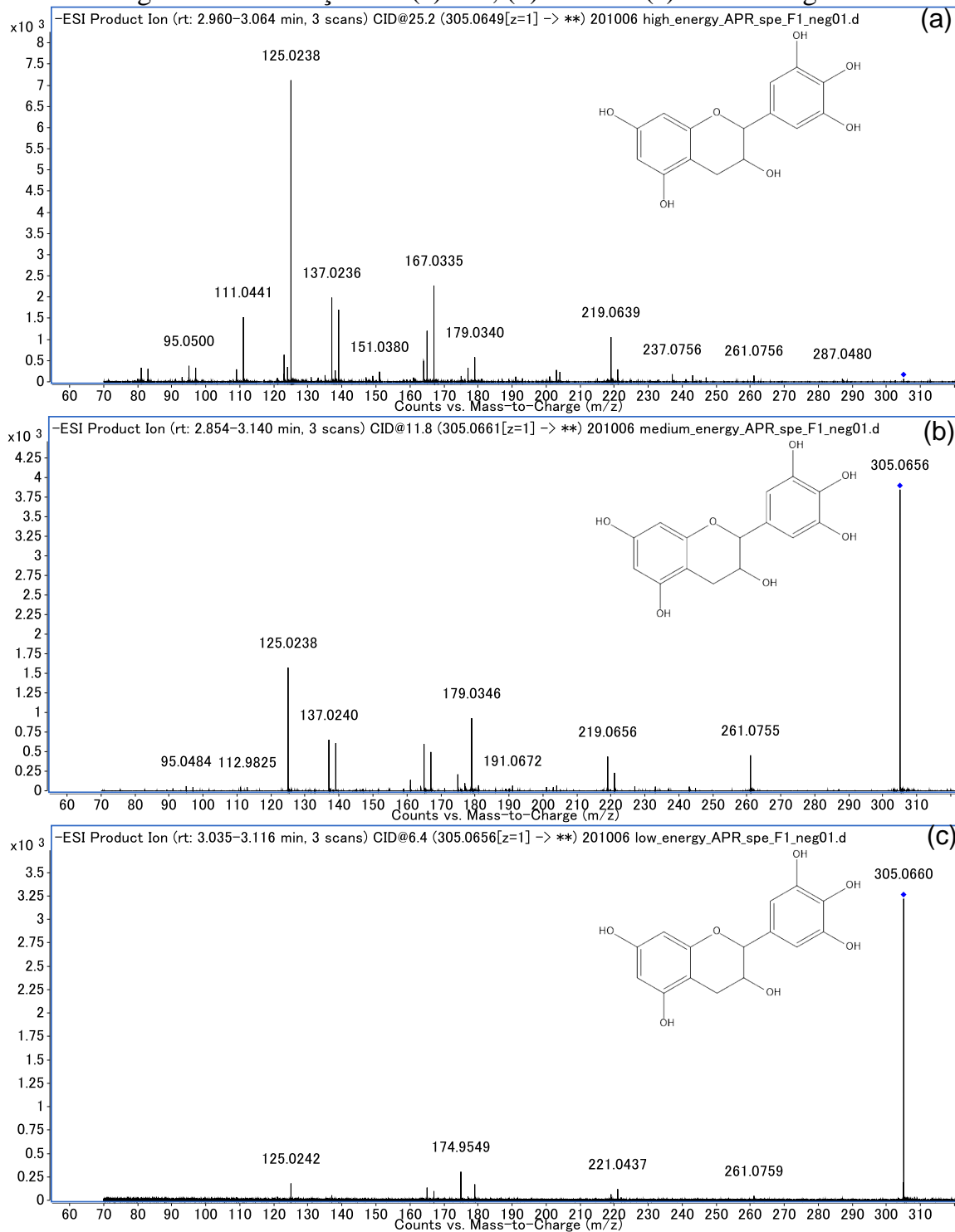


FIGURA A33 - *Mirror match* do íon de m/z 305,06 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como epigalocatequina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

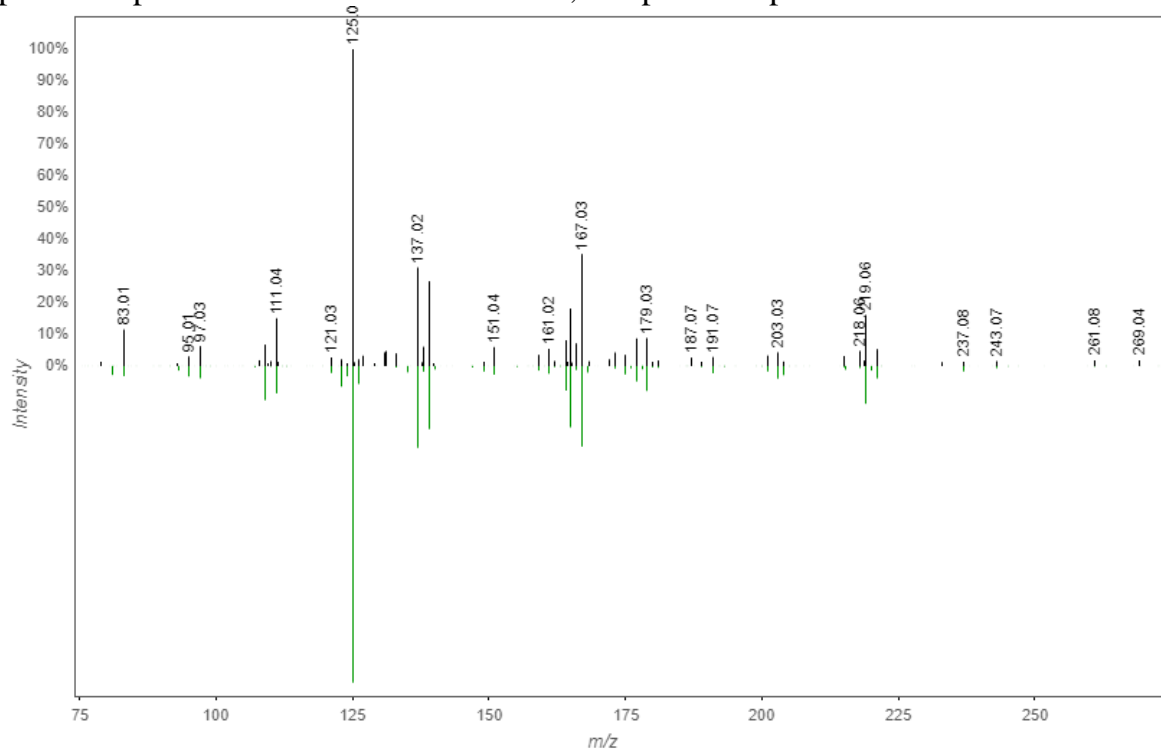


FIGURA A34 - Espectro de MS² do composto de m/z 289,0711 e tr 4,27 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

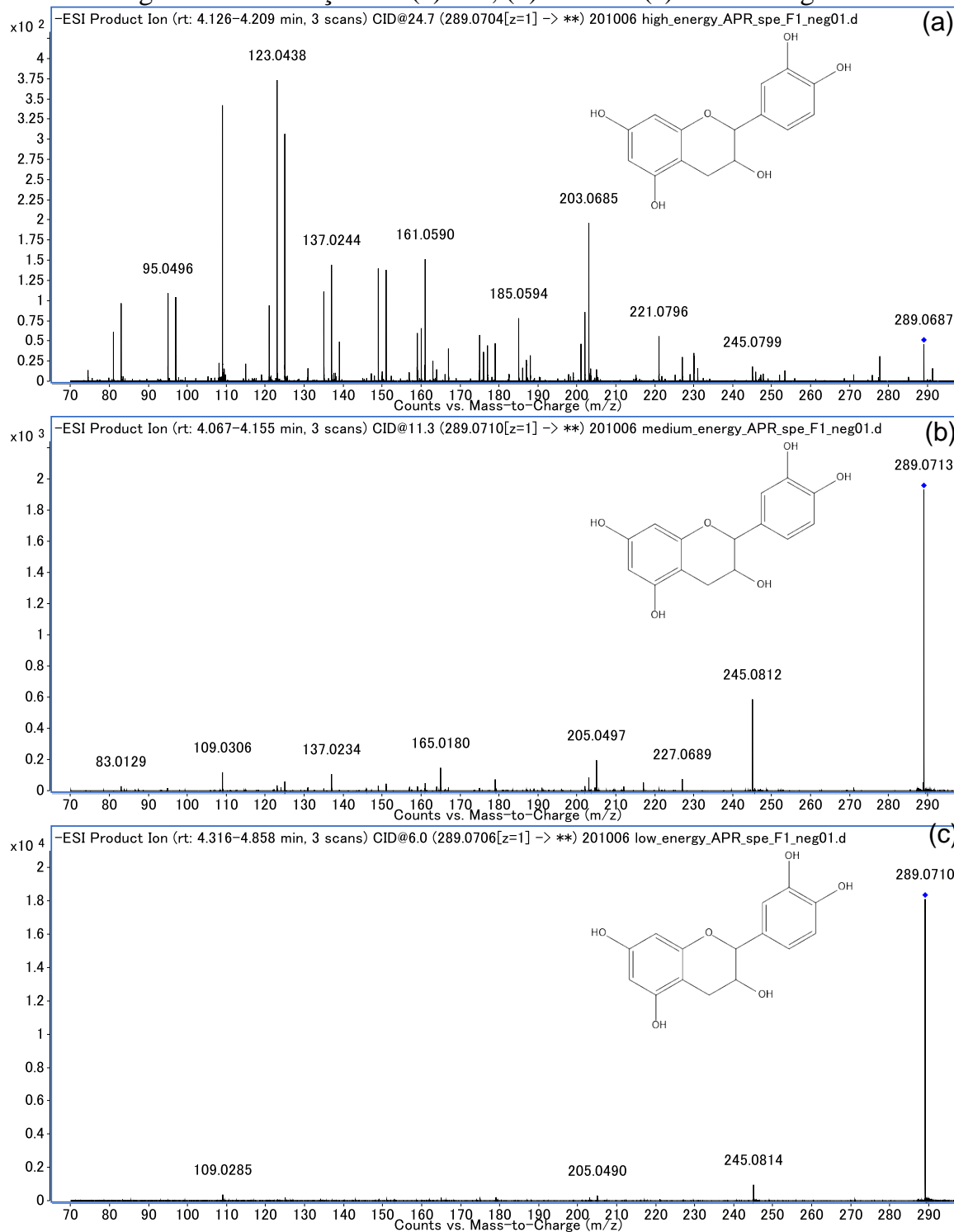


FIGURA A35 - *Mirror match* do íon de m/z 289,07 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como epicatequina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

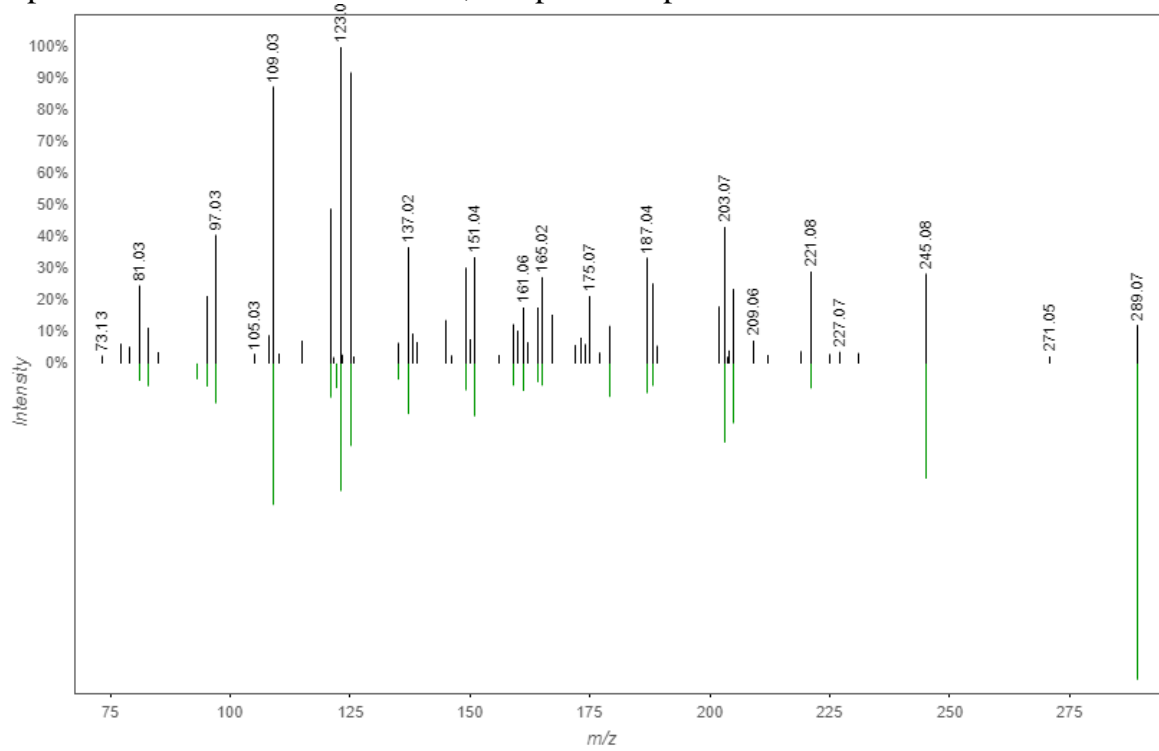


FIGURA A36 - Espectro de MS² do composto de m/z 319,0451 e tr 5,08 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão

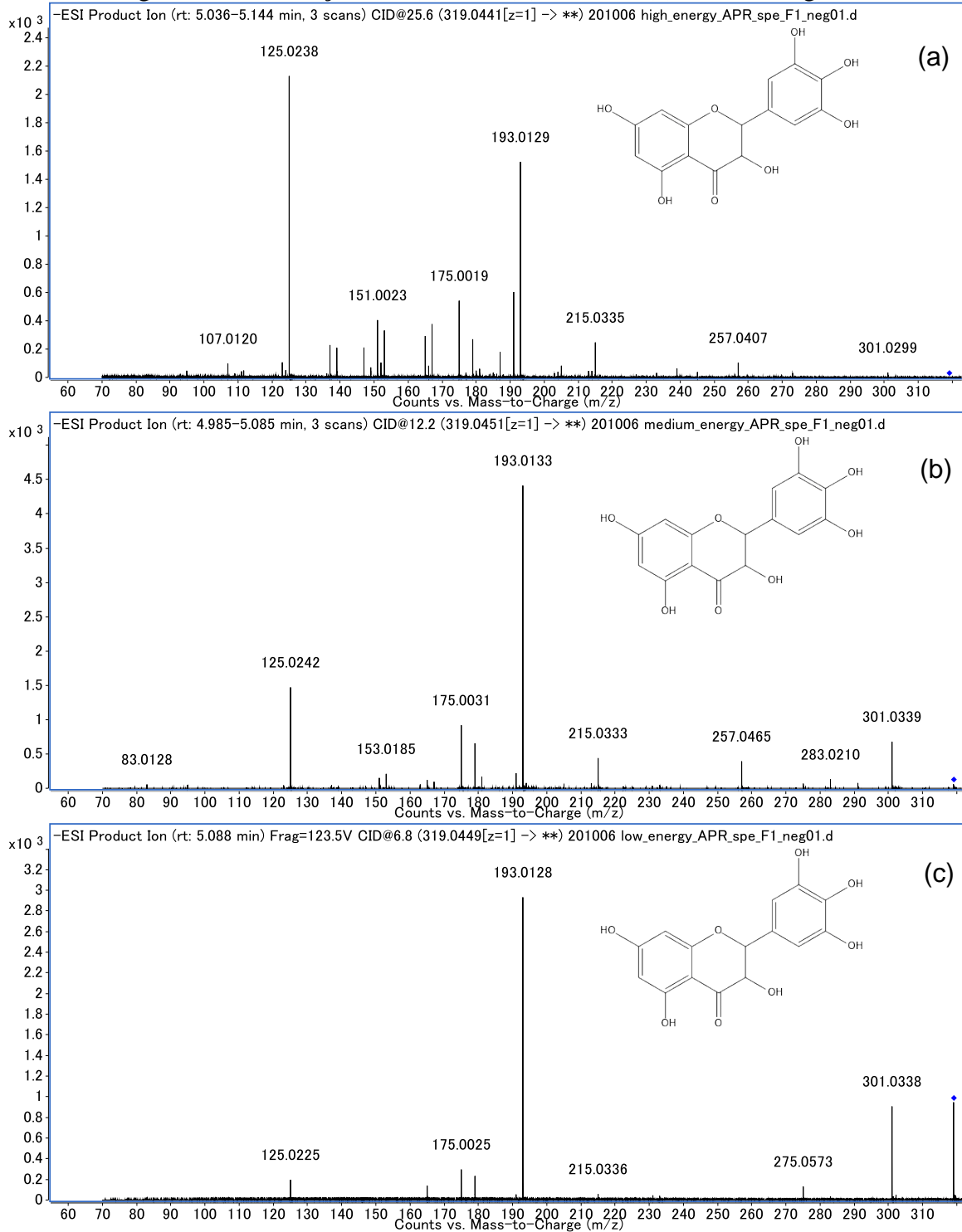


FIGURA A37 - Espectro de MS² do composto de m/z 303,0508 e tr 6,06 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

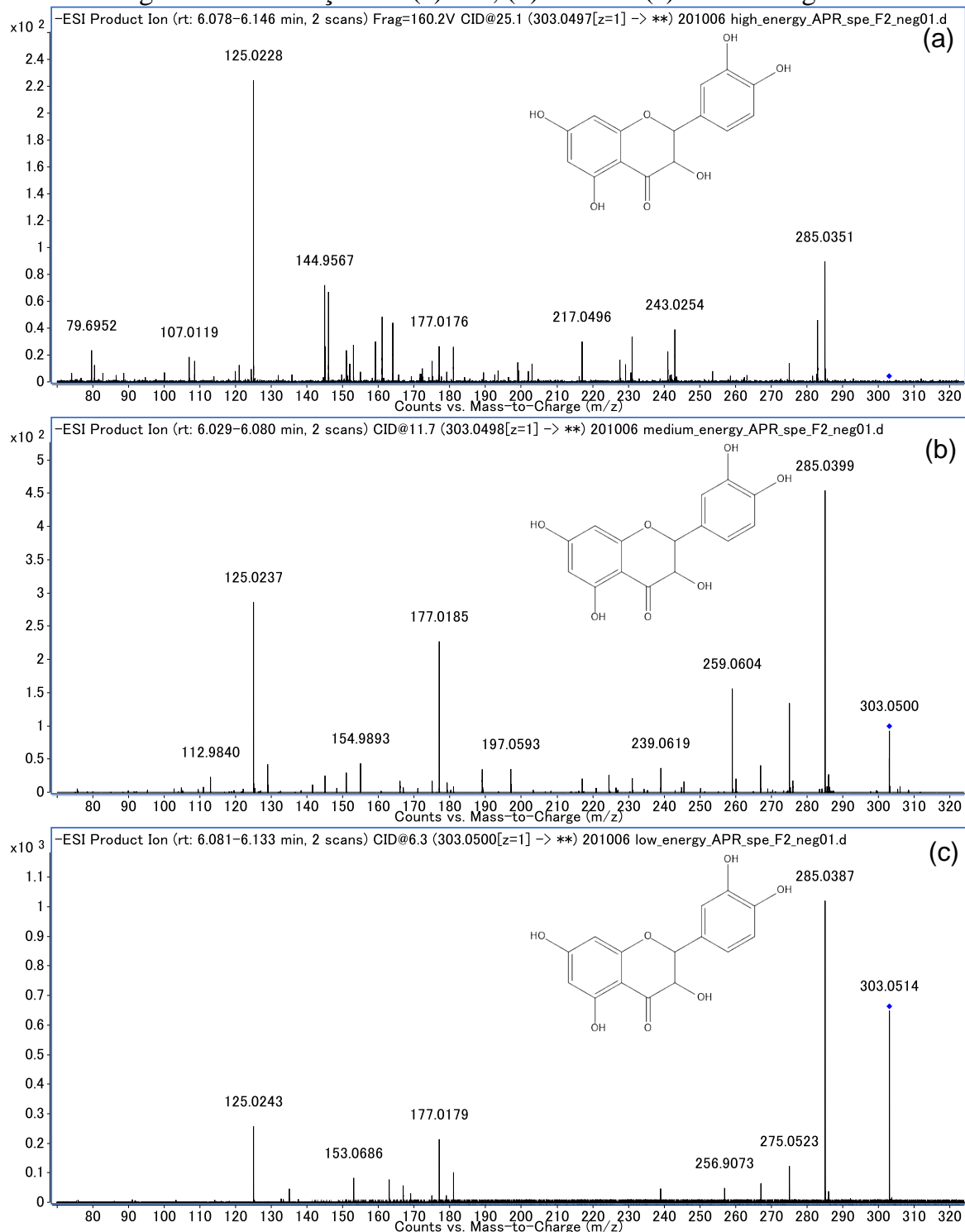


FIGURA A38 - *Mirror match* do íon de m/z 303,05 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como taxifolina. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

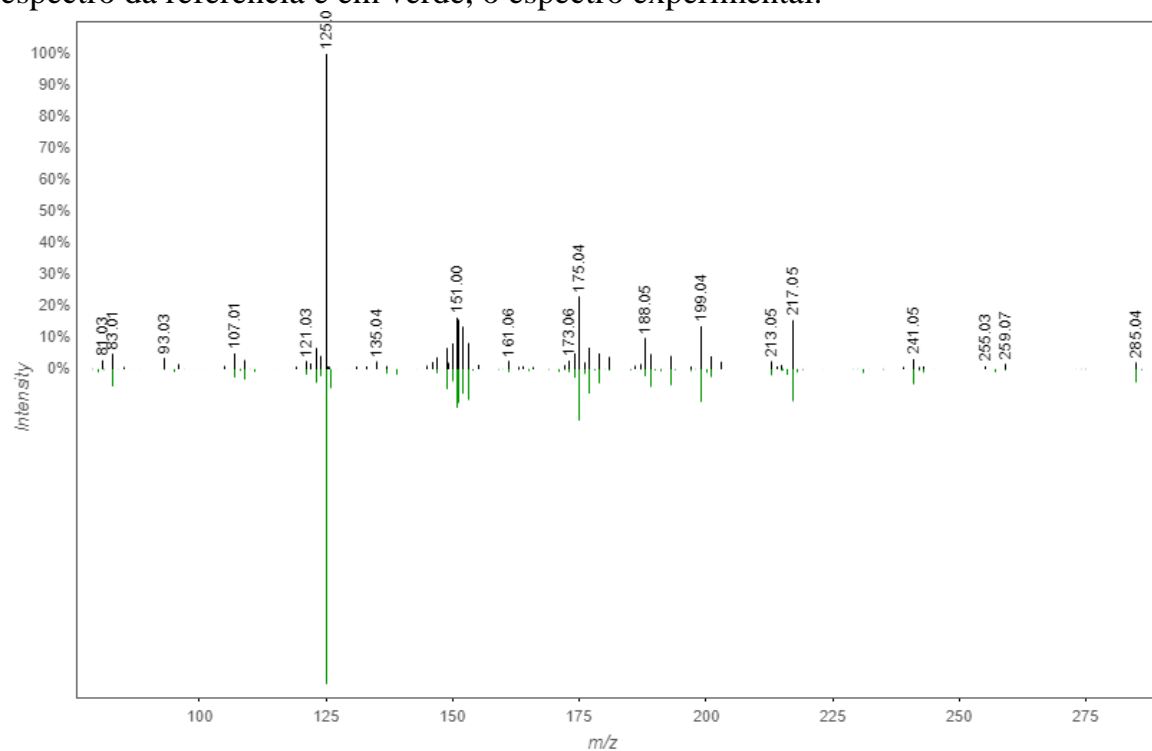


FIGURA A39 - Espectro de MS² do composto de m/z 459,0925 e tr 4,95 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

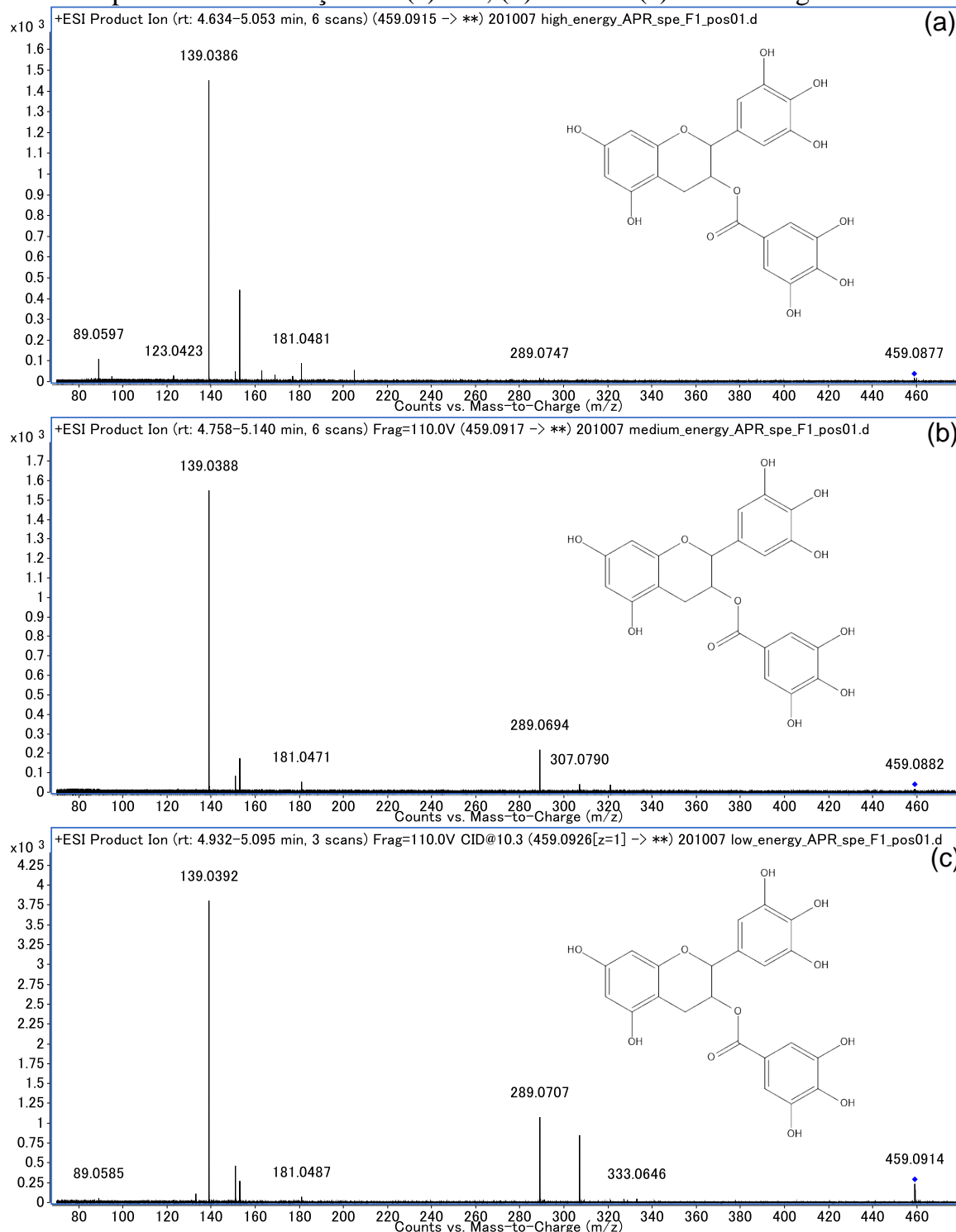


FIGURA A40 - Espectro de MS² do composto de m/z 443,0975 e tr 5,83 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

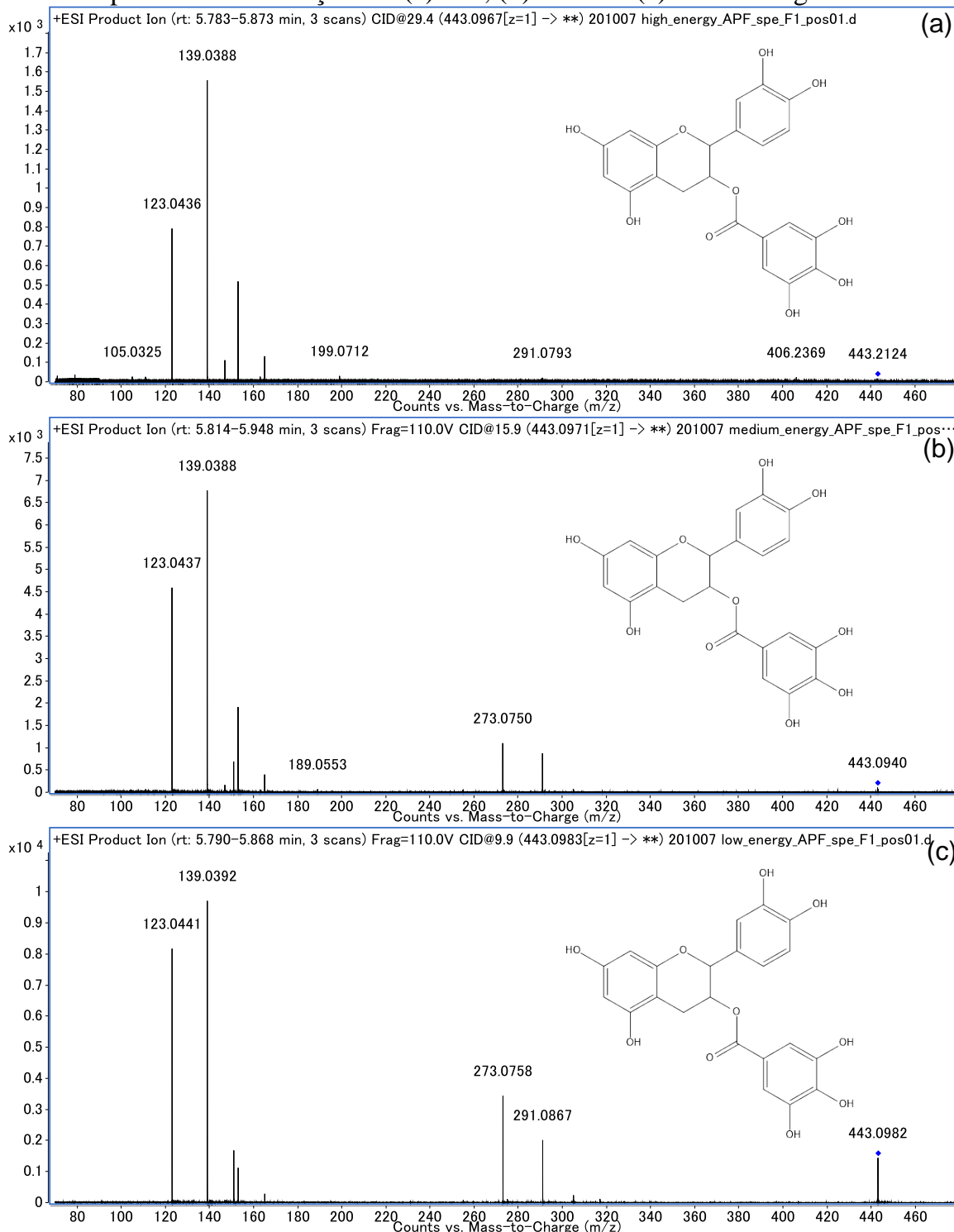


FIGURA A41 - Espectro de MS² do composto de m/z 329,2324 e tr 8,71 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

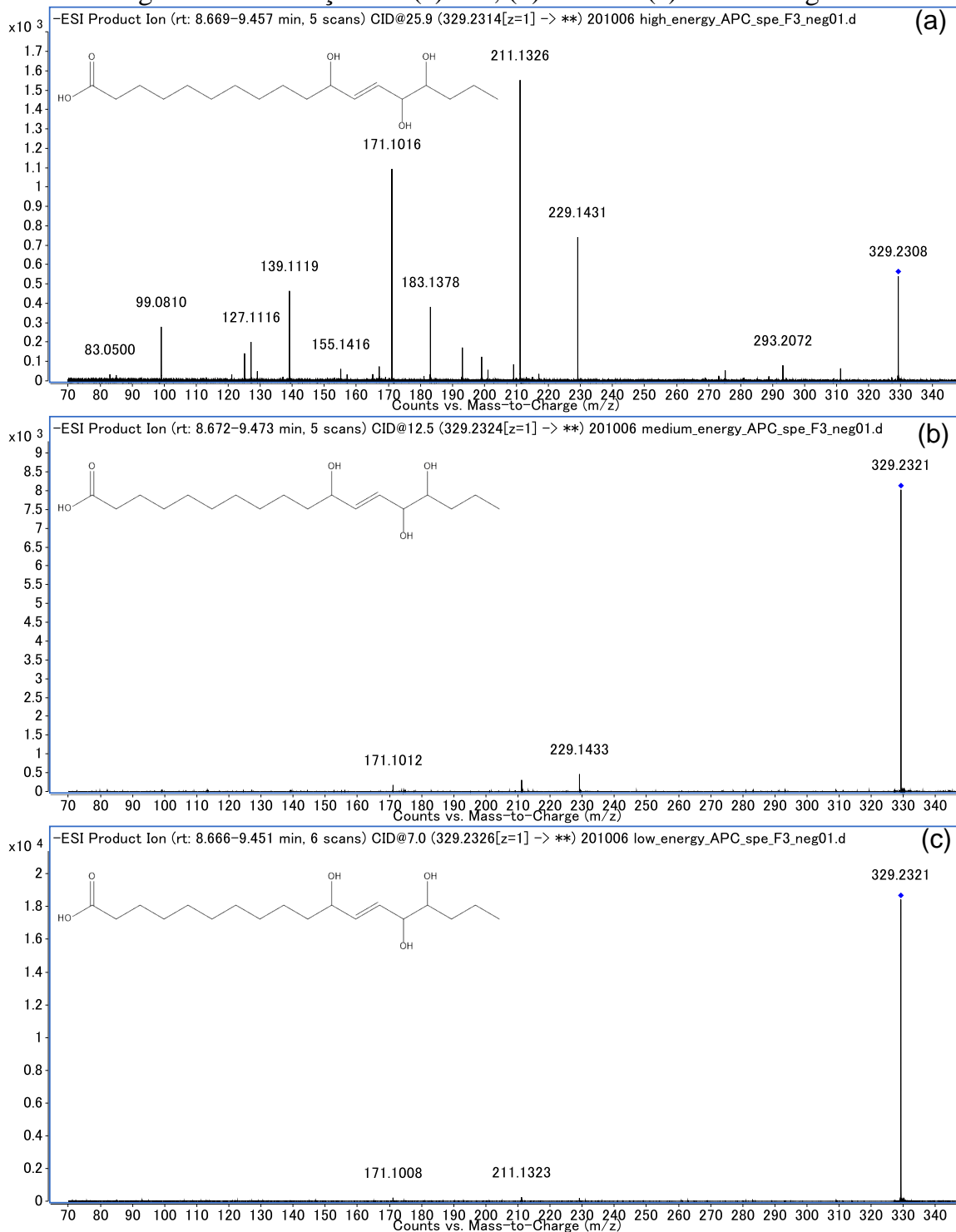


FIGURA A42 - Espectro de MS2 do composto de m/z 343,2479 e tr 10,11 min obtidos no modo negativo de ionização em alta energia de colisão

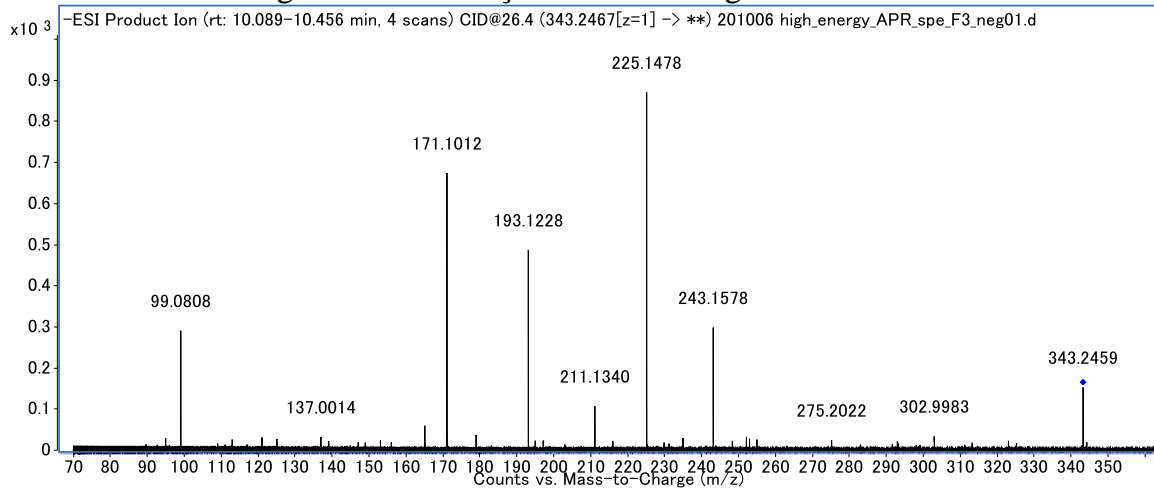


FIGURA A43 - Espectro de MS² do composto de m/z 327,2169 e tr 8,24 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

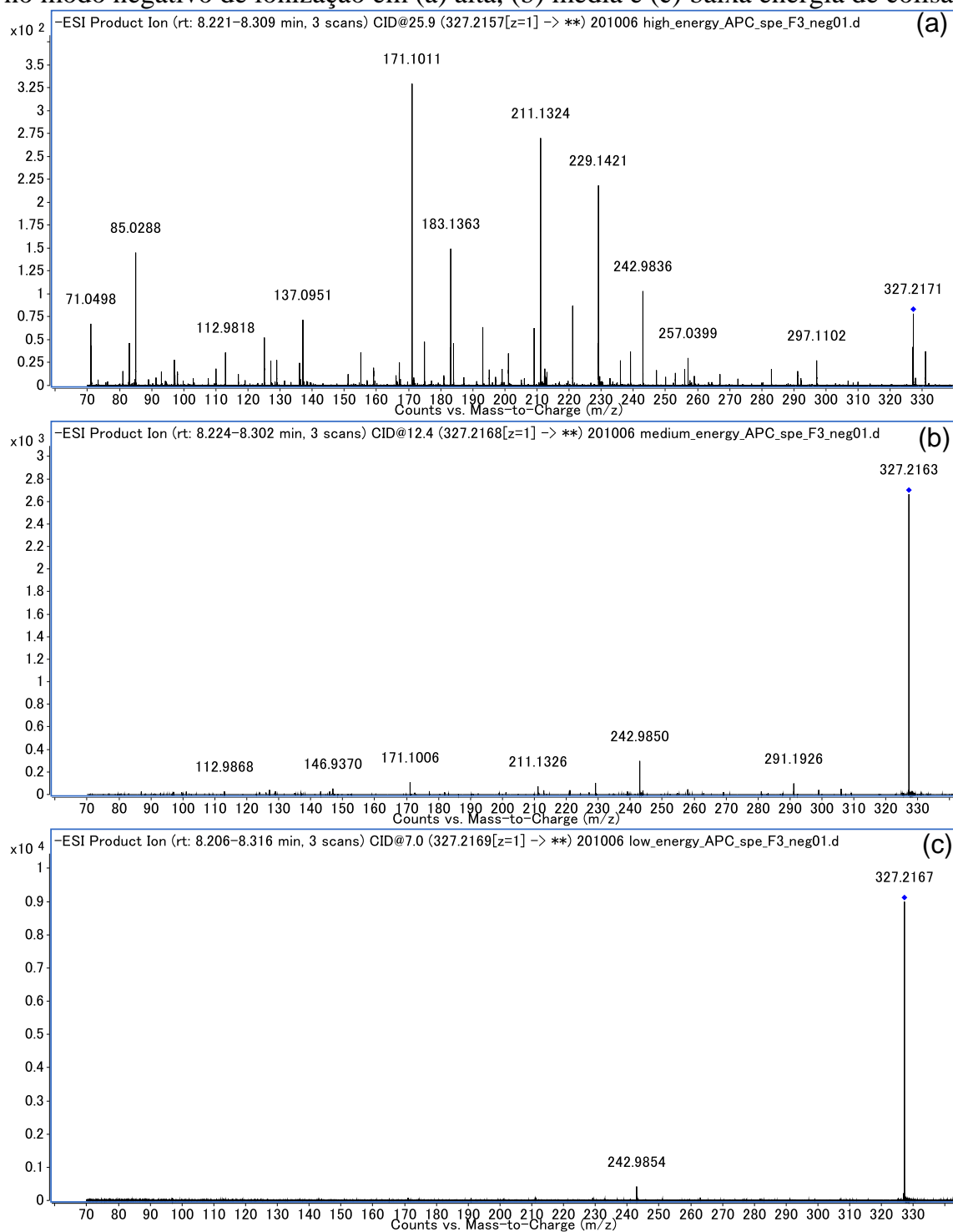


FIGURA A44 - Espectro de MS² do composto de m/z 191,0556 e tr 4,25 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

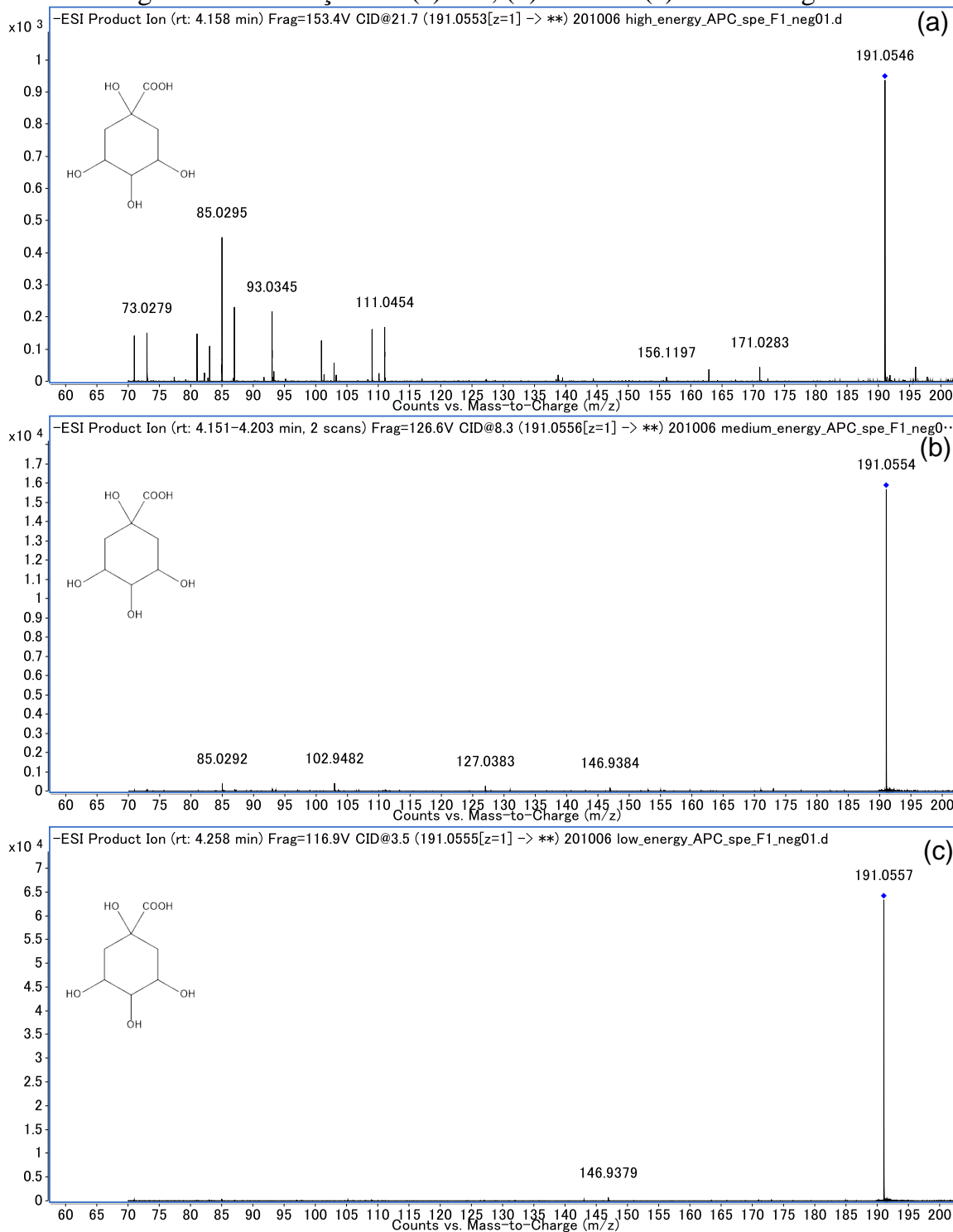


FIGURA A45 - Espectro de MS² do composto de m/z 191,0556 e tr 4,72 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

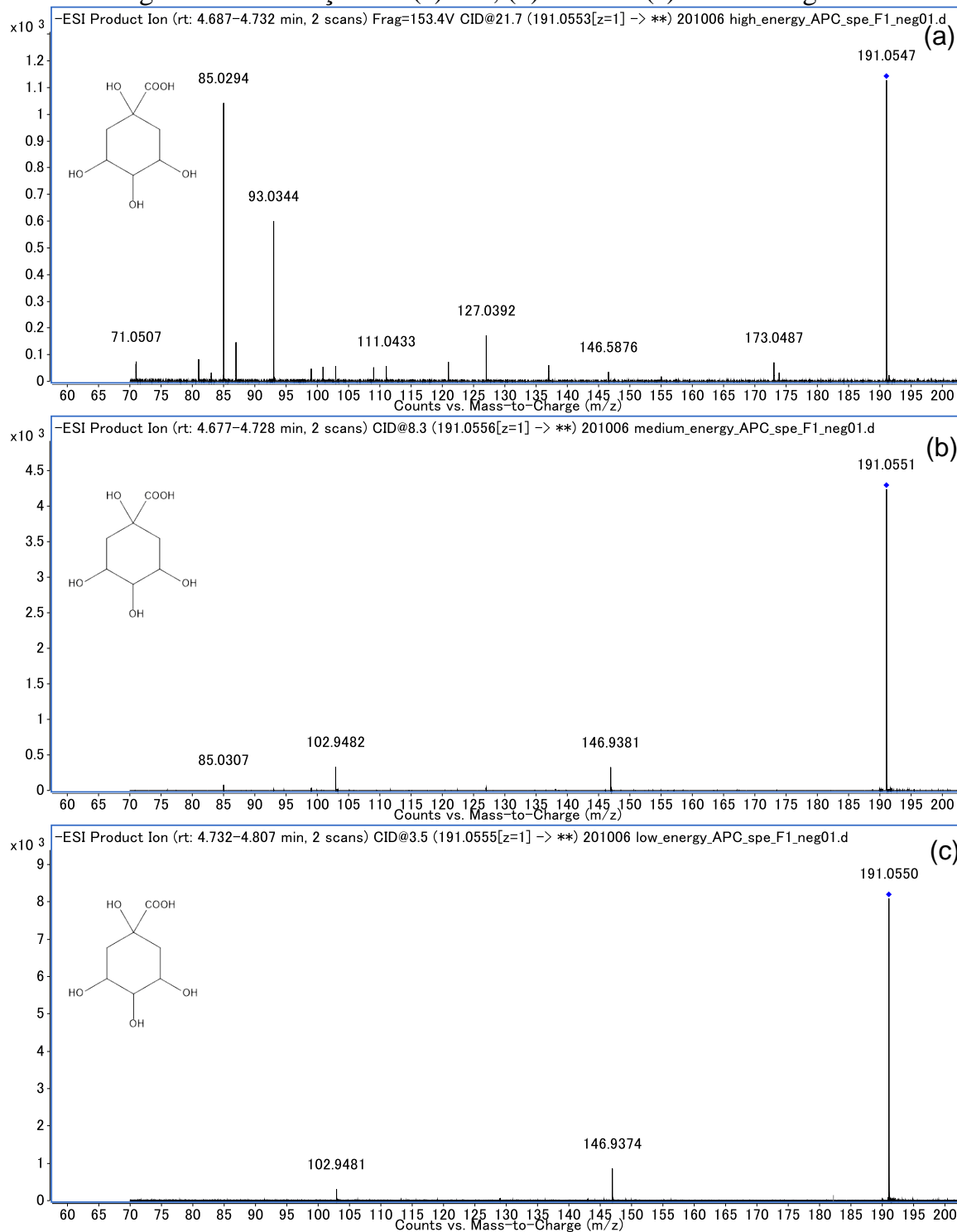


FIGURA A46 - *Mirror match* do íon de m/z 191,06 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido quínico. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

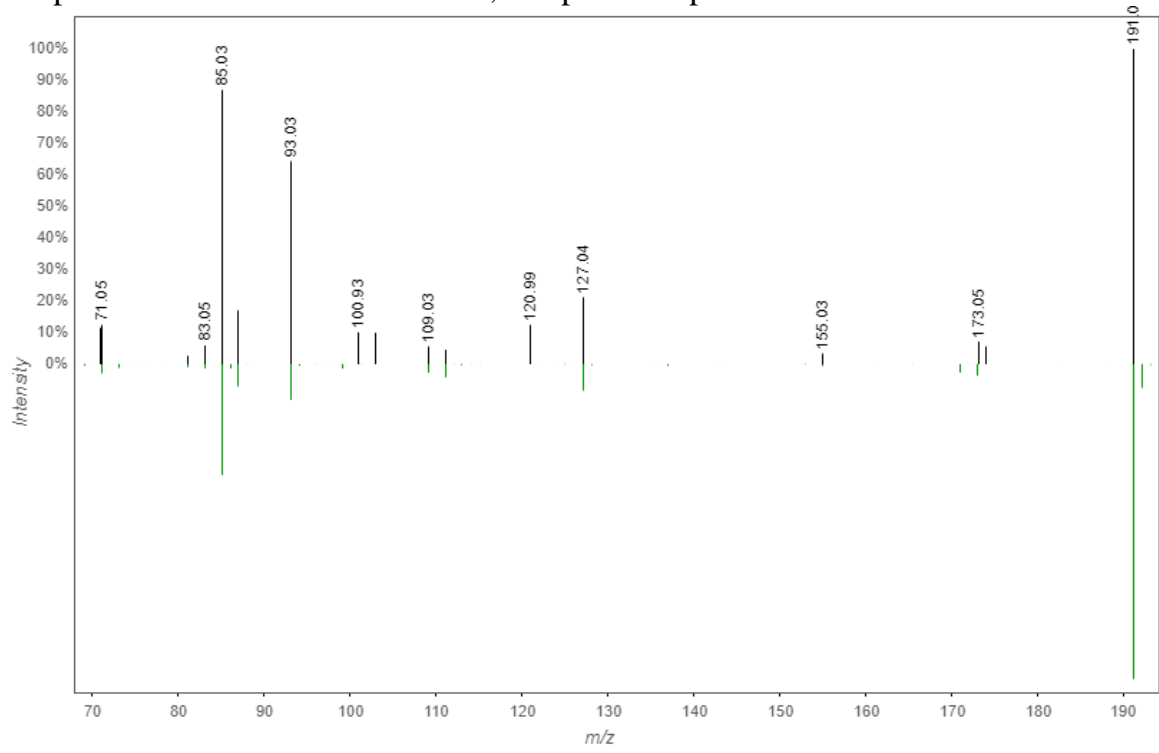


FIGURA A47 - Espectro de MS² do composto de m/z 337,0923 e tr 4,87 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

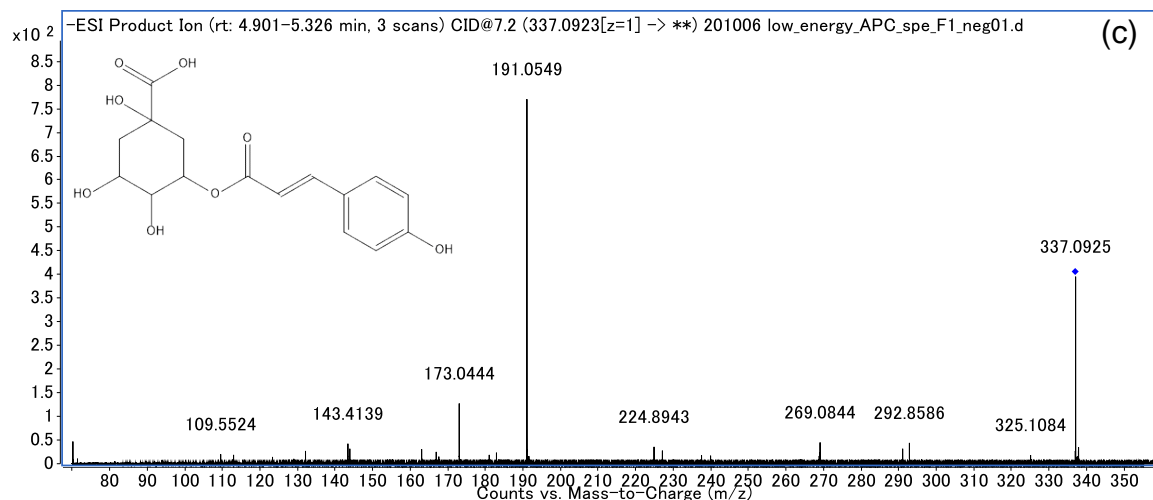
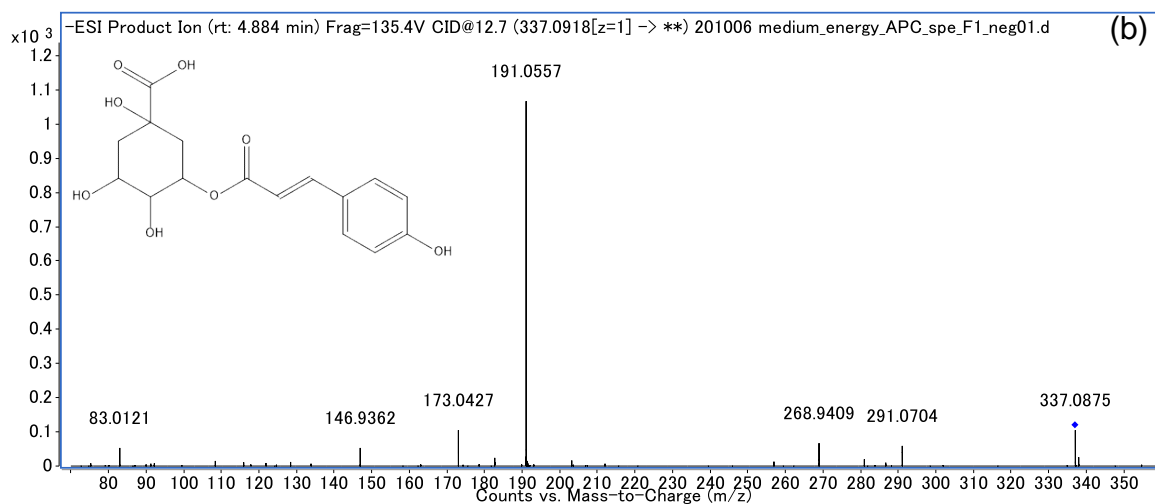
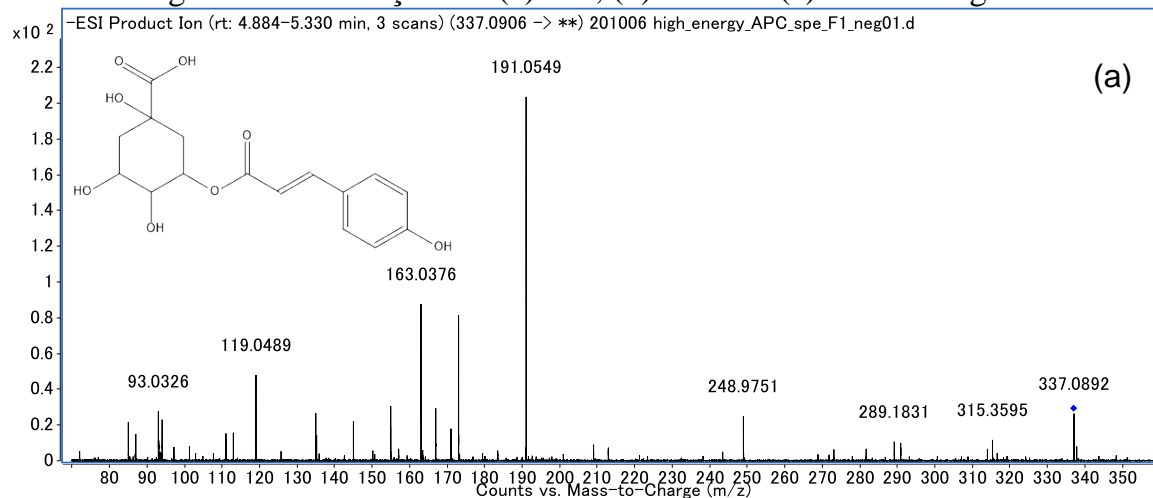


FIGURA A48 - *Mirror match* do íon de m/z 337,09 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido 3-*p*-coumaroil quínico. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

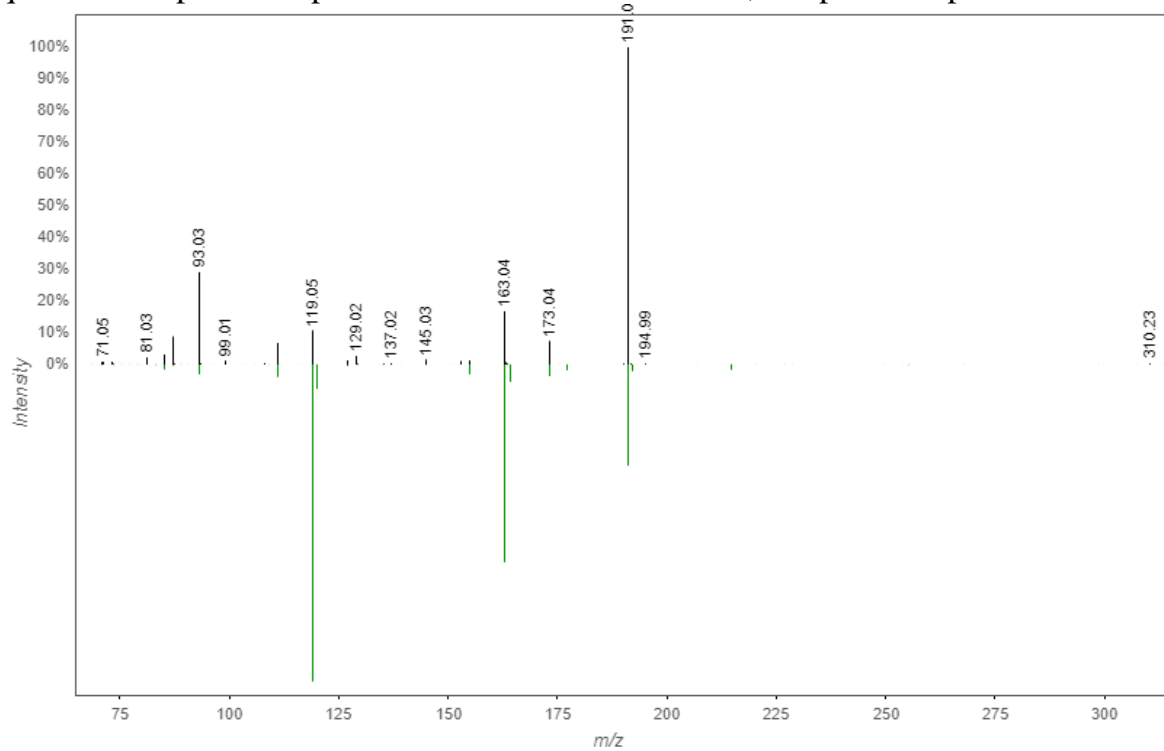


FIGURA A49 - Espectro de MS² do composto de m/z 353,0869 e tr 4,25 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

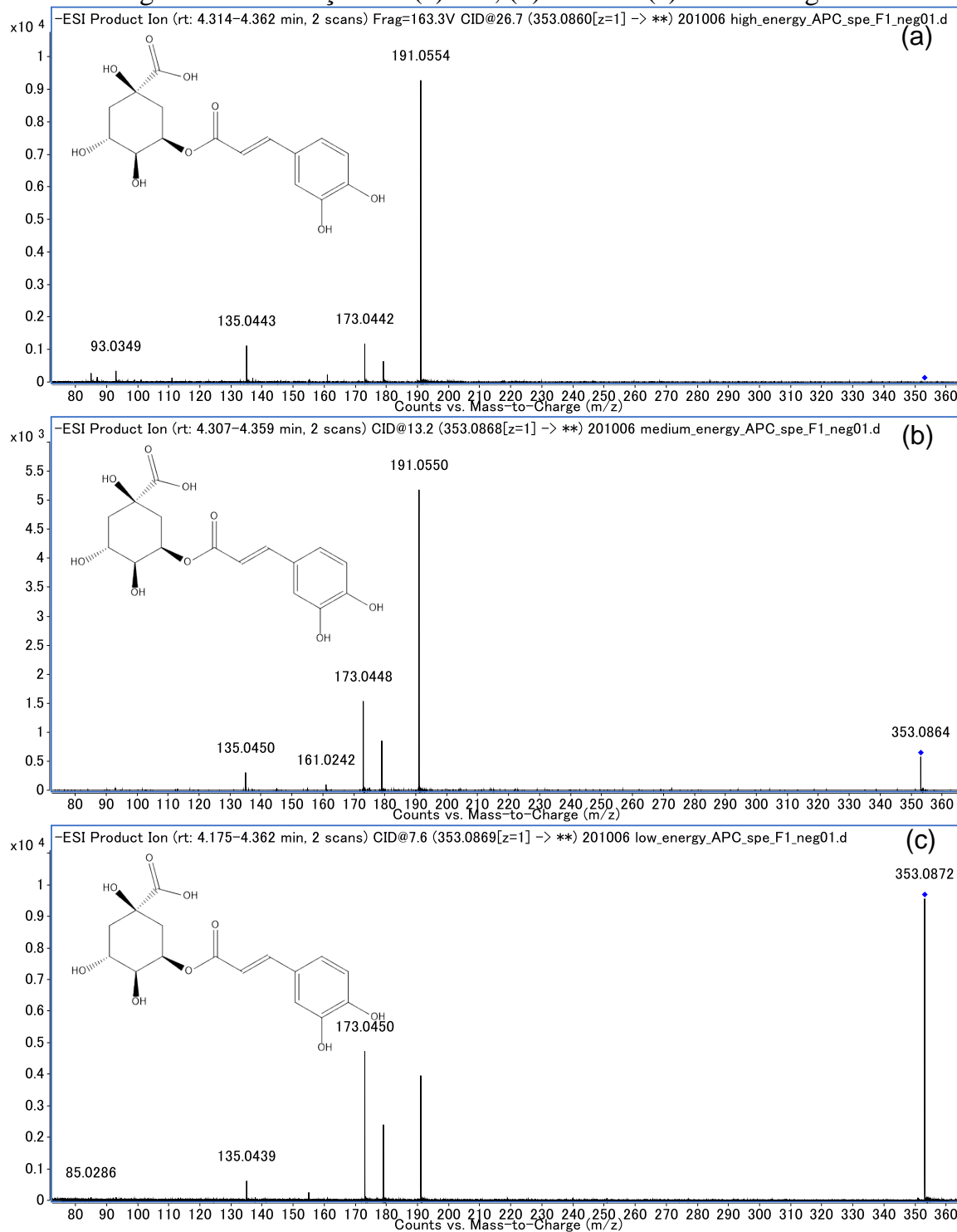


FIGURA A50 - Espectro de MS² do composto de m/z 353,0869 e tr 4,72 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

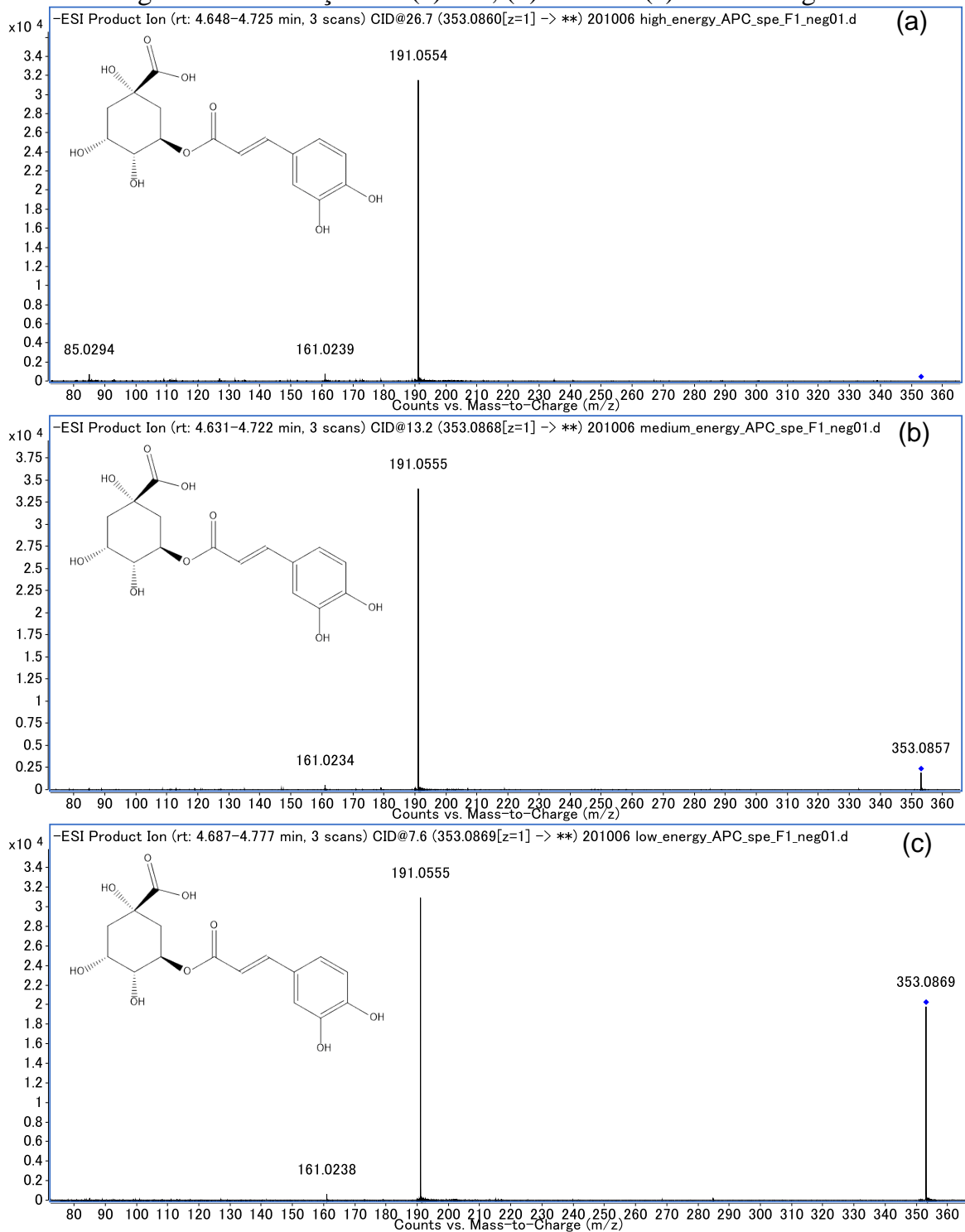


FIGURA A51 - *Mirror match* do íon de m/z 353,09 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

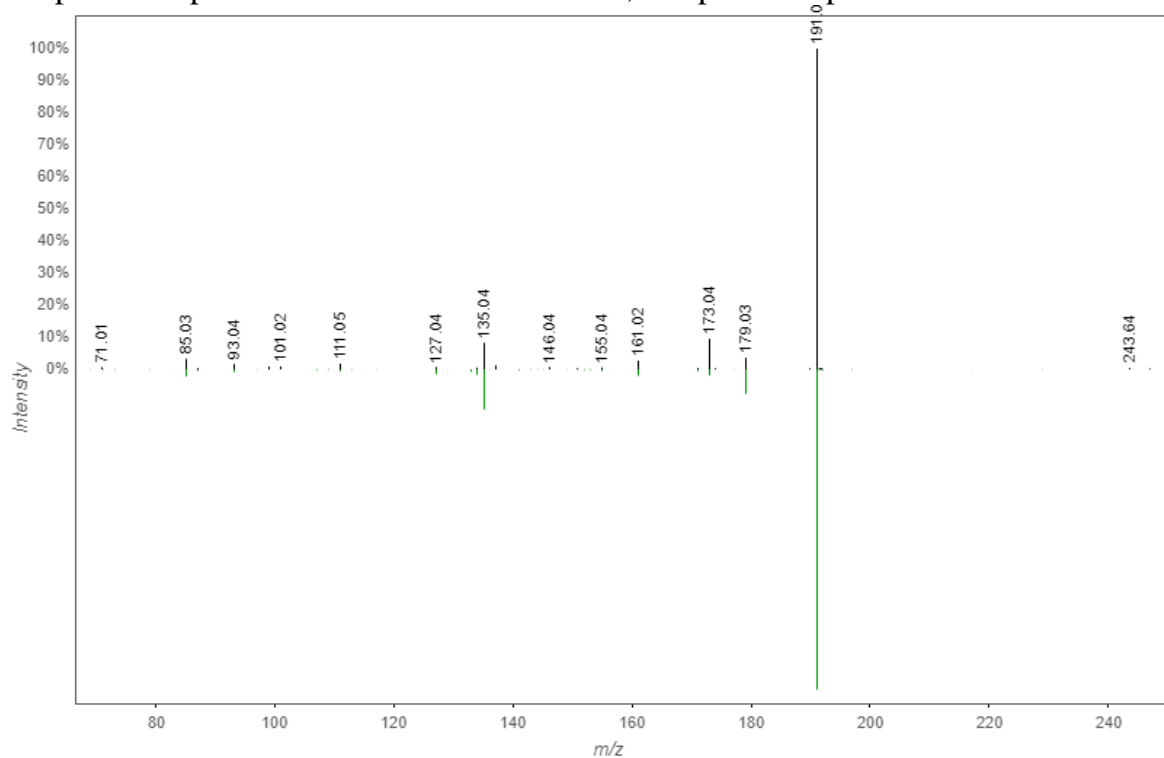


FIGURA A52 - *Mirror match* do íon de m/z 353,09 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido clorogênico. Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

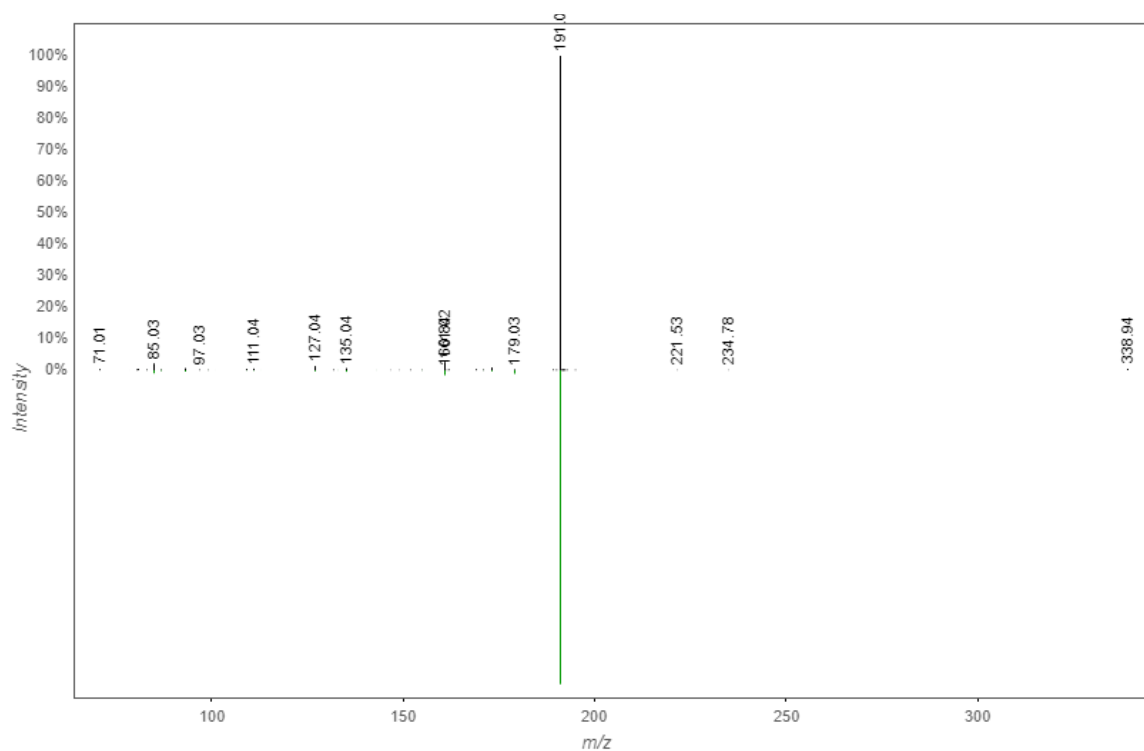


FIGURA A53 - Espectro de MS² do composto de m/z 343,0658 e tr 0,77 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

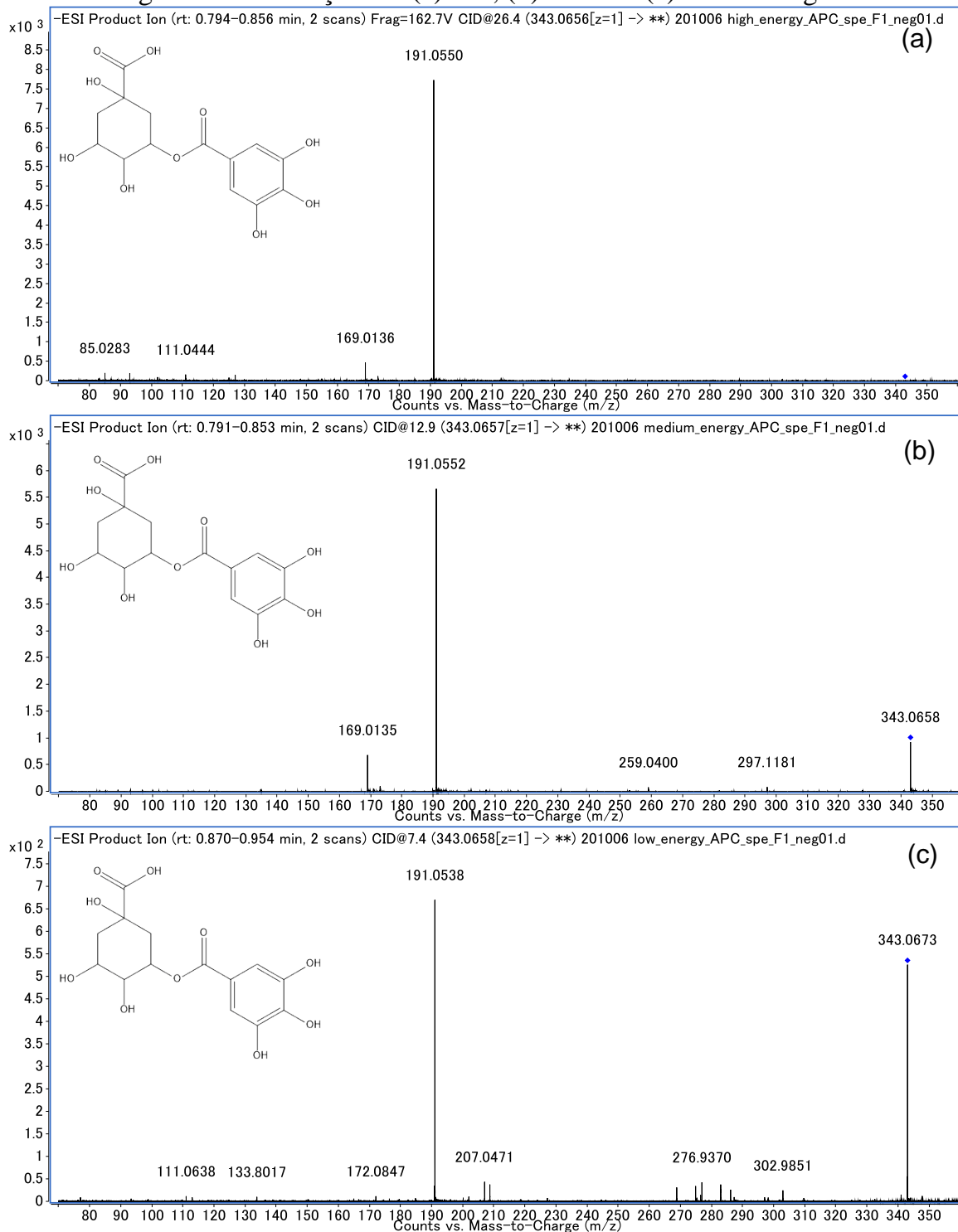


FIGURA A54 - Espectro de MS² do composto de m/z 343,0658 e tr 1,68 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

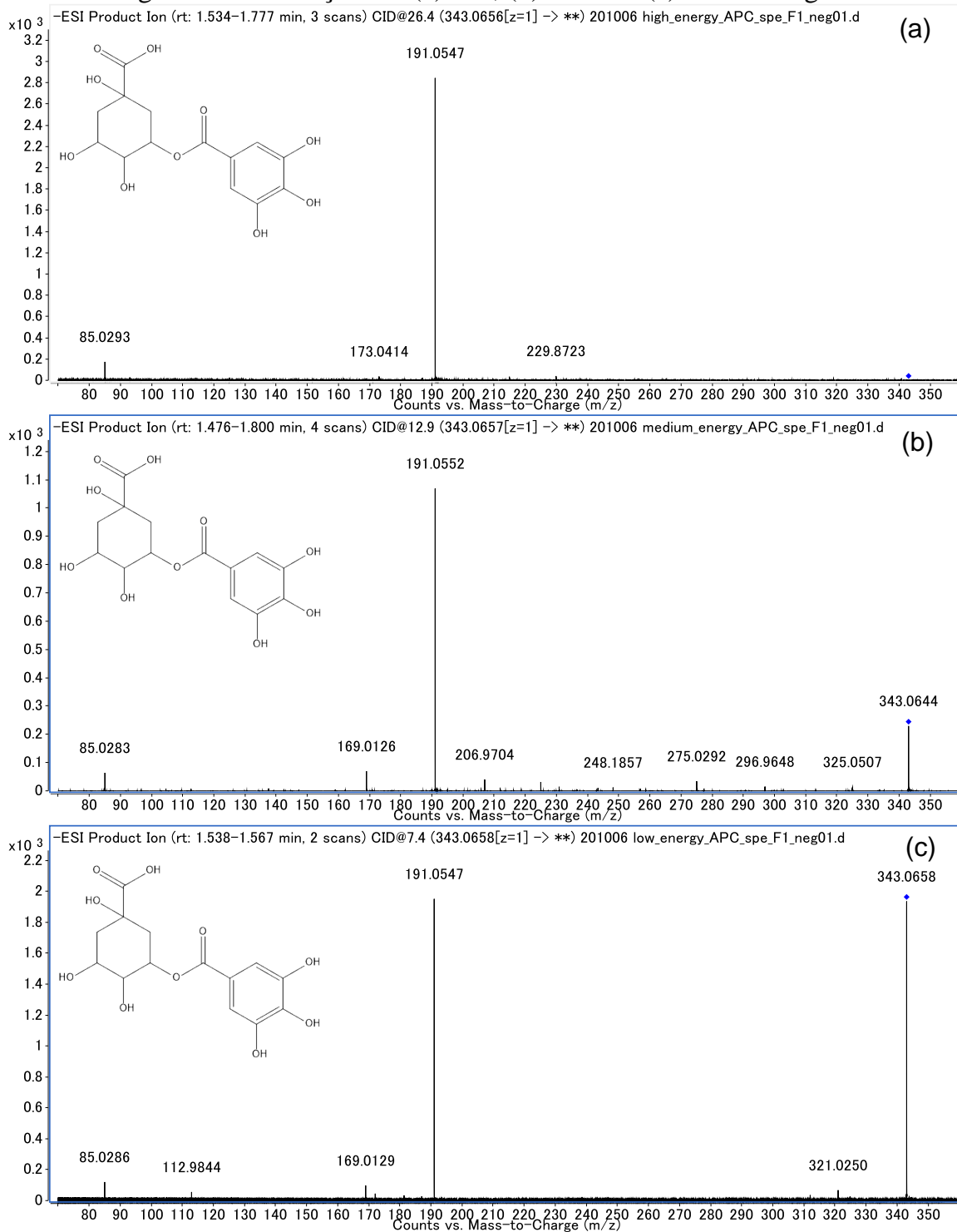


FIGURA A55 - Espectro de MS² do composto de m/z 369,1172 e tr 5,39 min obtidos no modo positivo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

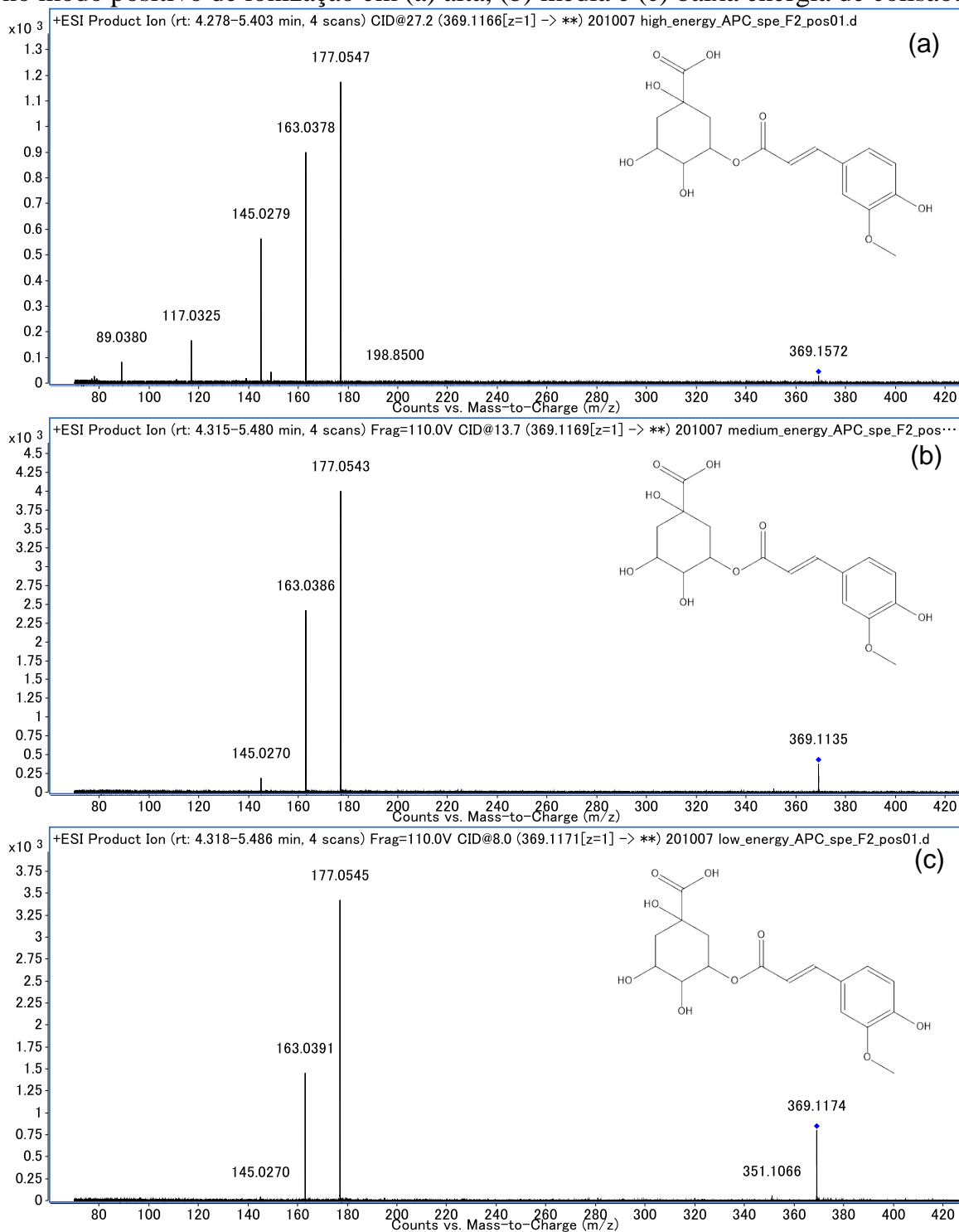


FIGURA A56 - Espectro de MS² do composto de m/z 525,1182 e tr 8,04 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

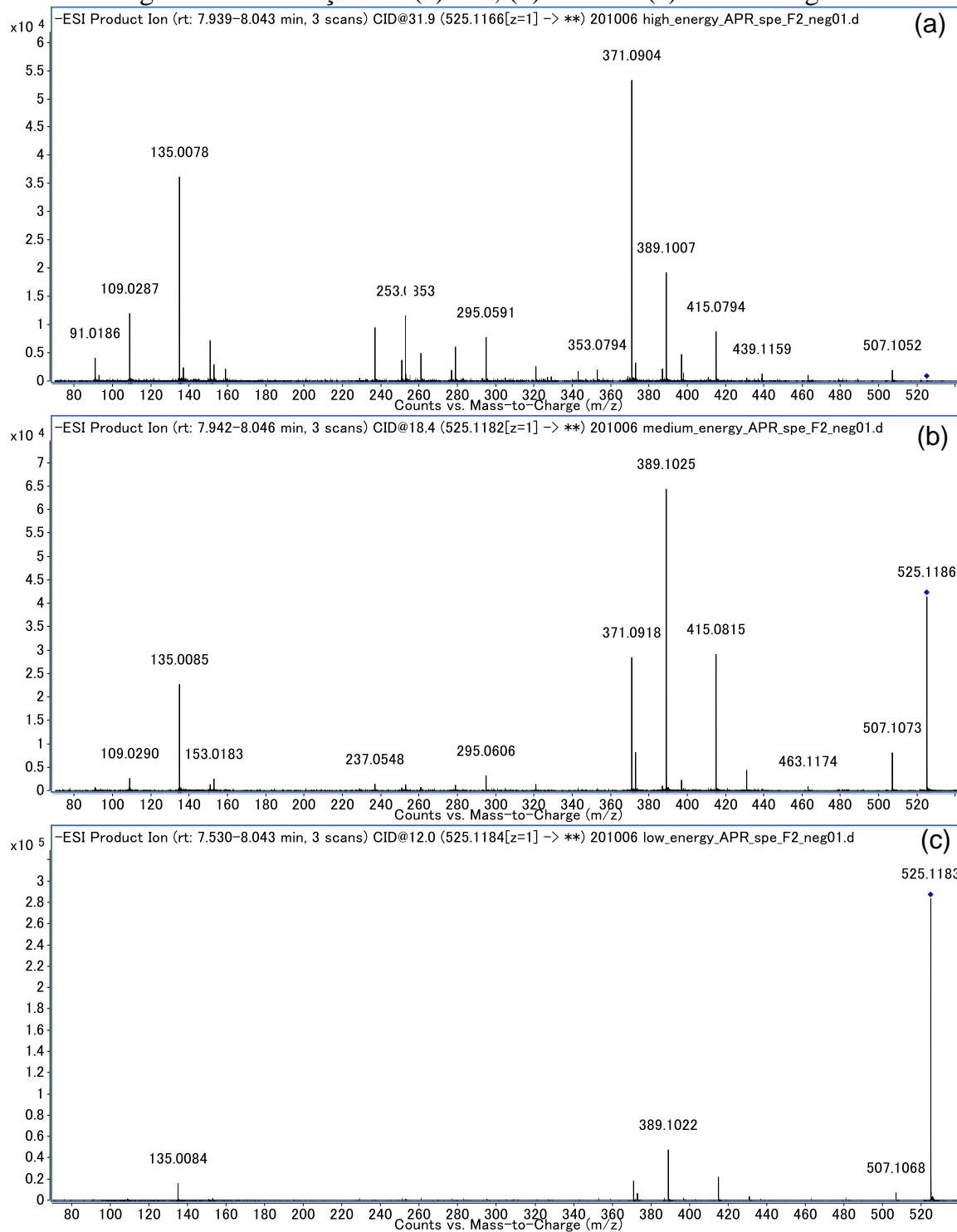


FIGURA A57 - Espectro de MS² do composto de m/z 525,1182 e tr 8,61 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

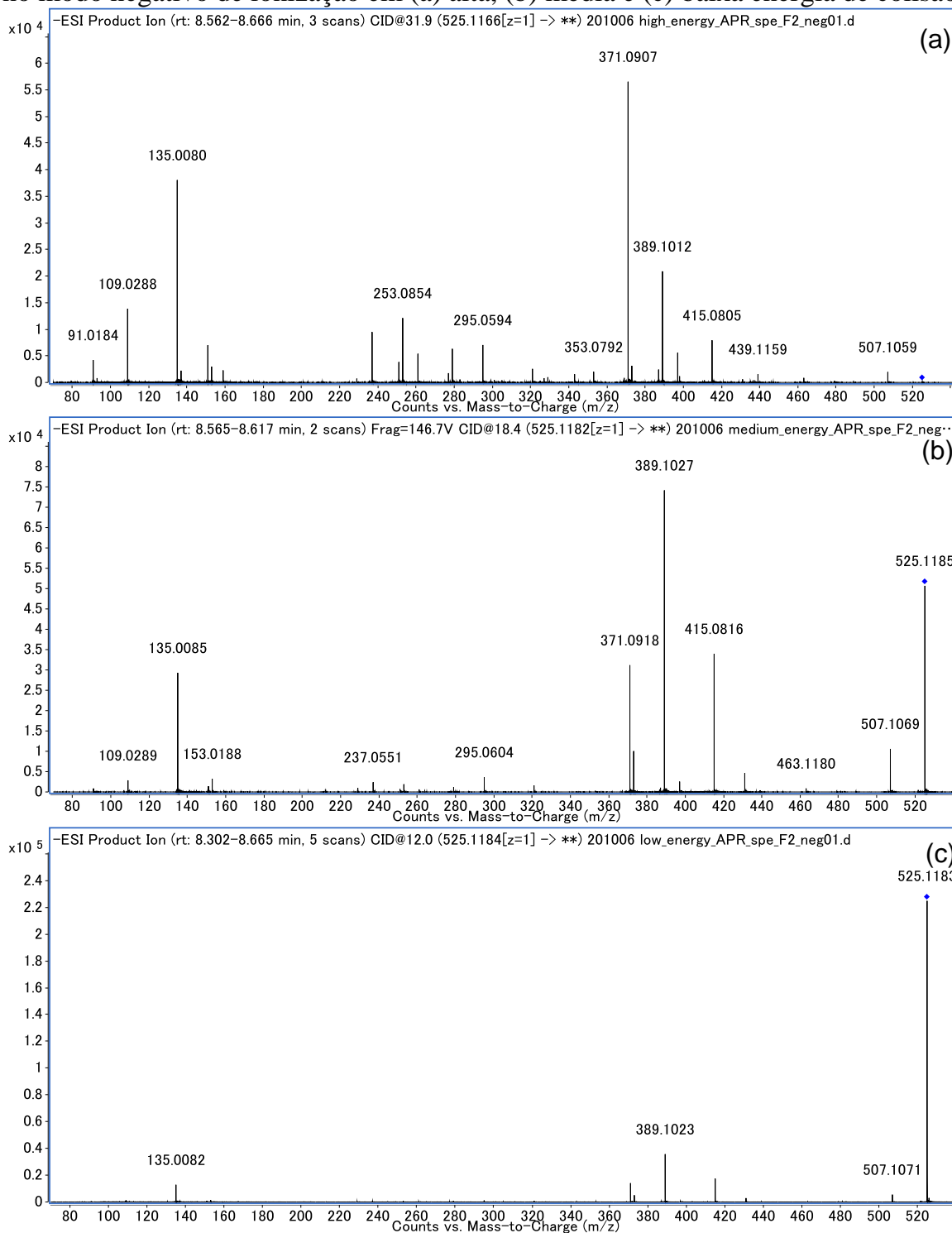


FIGURA A58 - Espectro de MS² do composto de m/z 541,1182 e tr 7,19 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

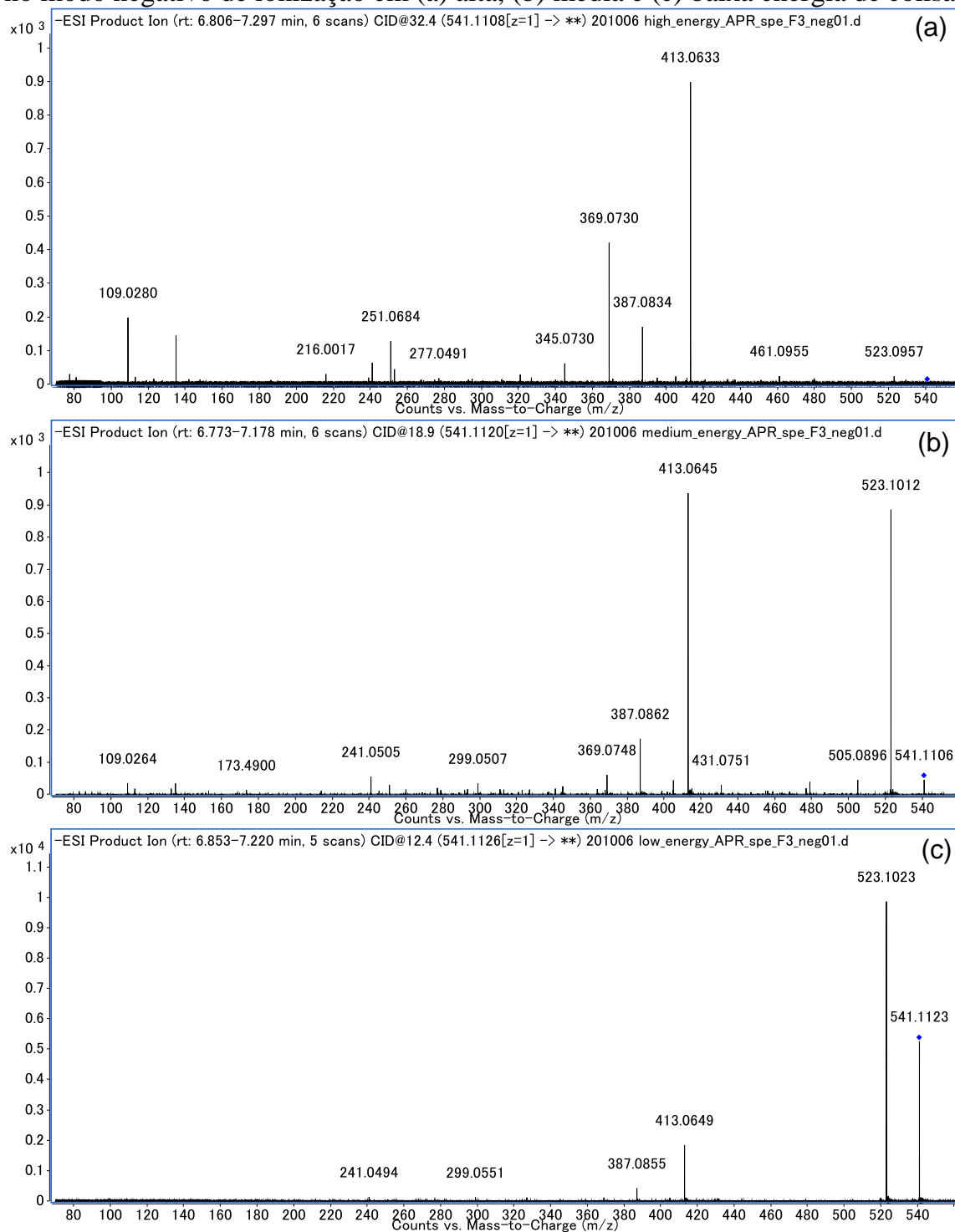


FIGURA A59 - Espectro de MS² do composto de m/z 287,0556 e tr 7,62 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

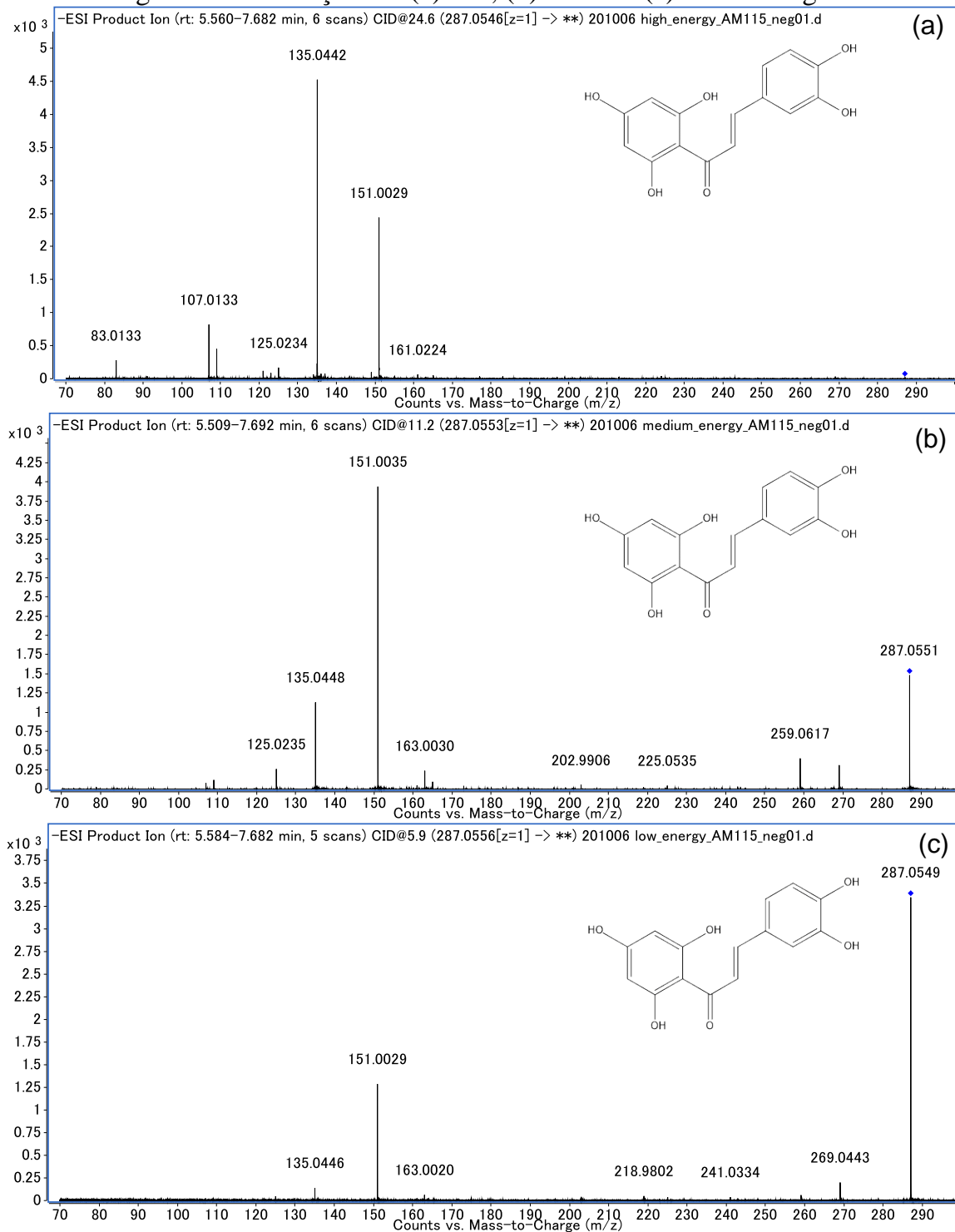


FIGURA A60 - Espectro de MS² do composto de m/z 523,1022 e tr 7,70 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

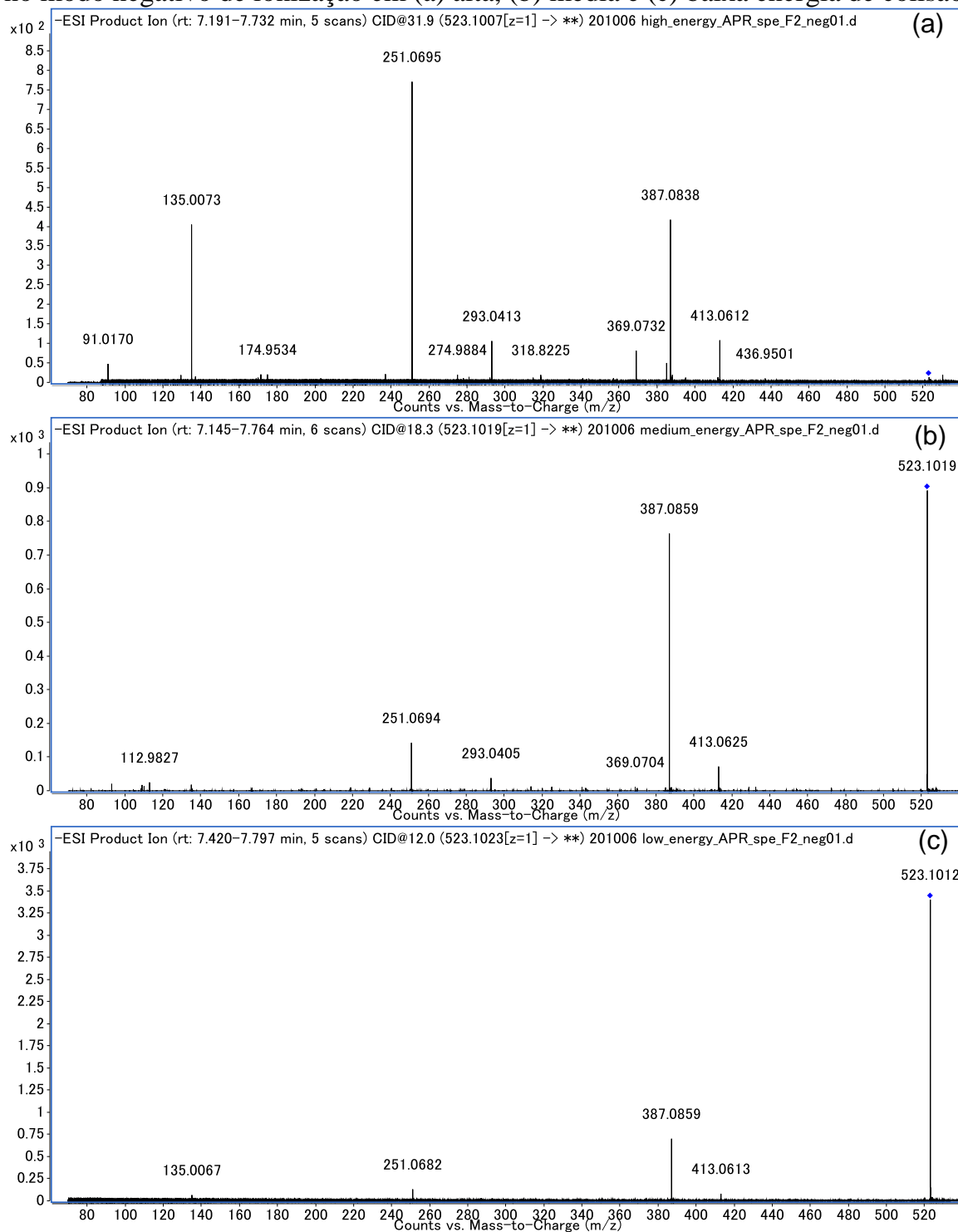


FIGURA A61 - Espectro de MS² do composto de m/z 523,1022 e tr 8,74 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

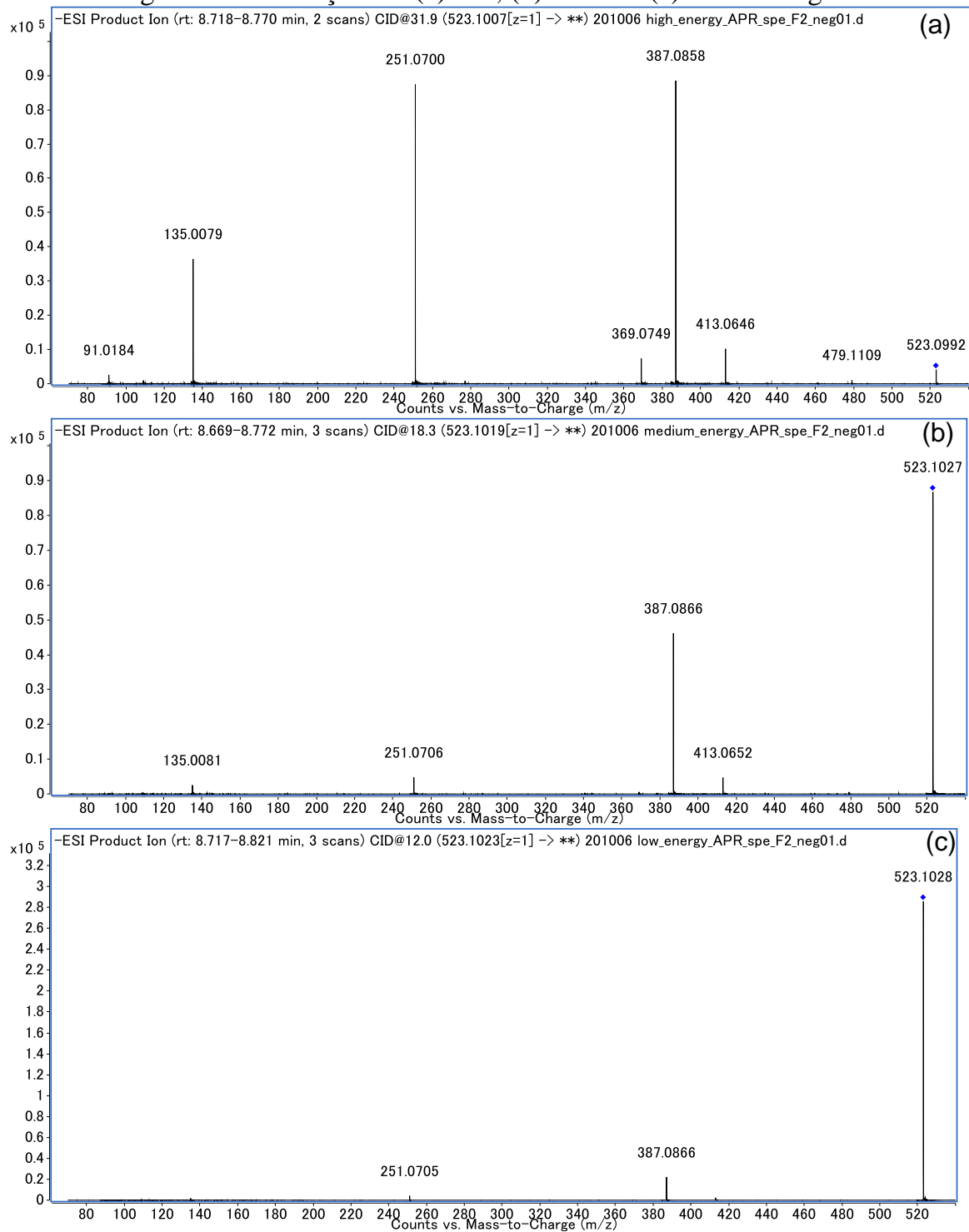


FIGURA A62 - Espectro de MS² do composto de m/z 523,1022 e tr 9,75 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

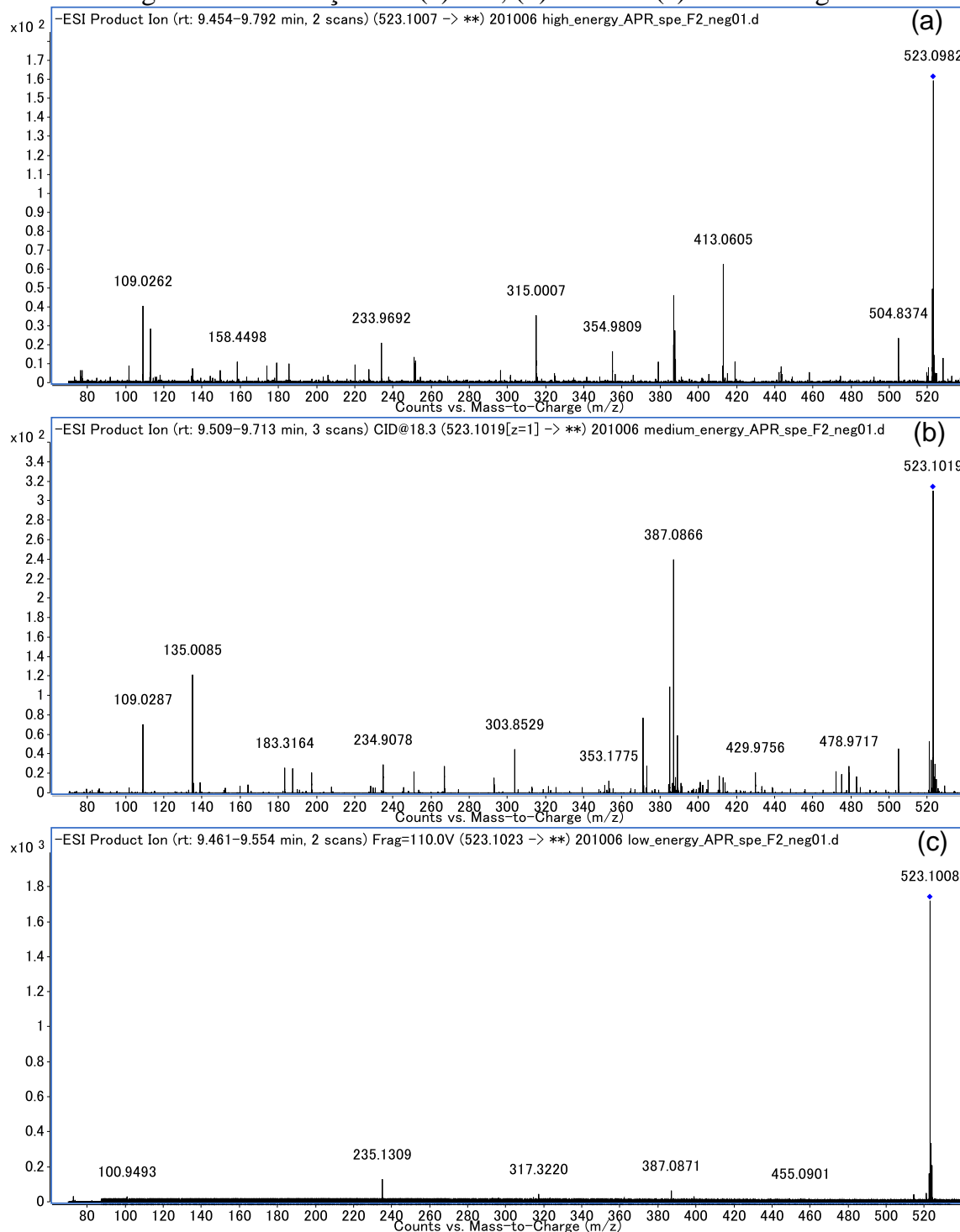


FIGURA A63 - Espectro de MS² do composto de m/z 539,0967 e tr 7,86 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

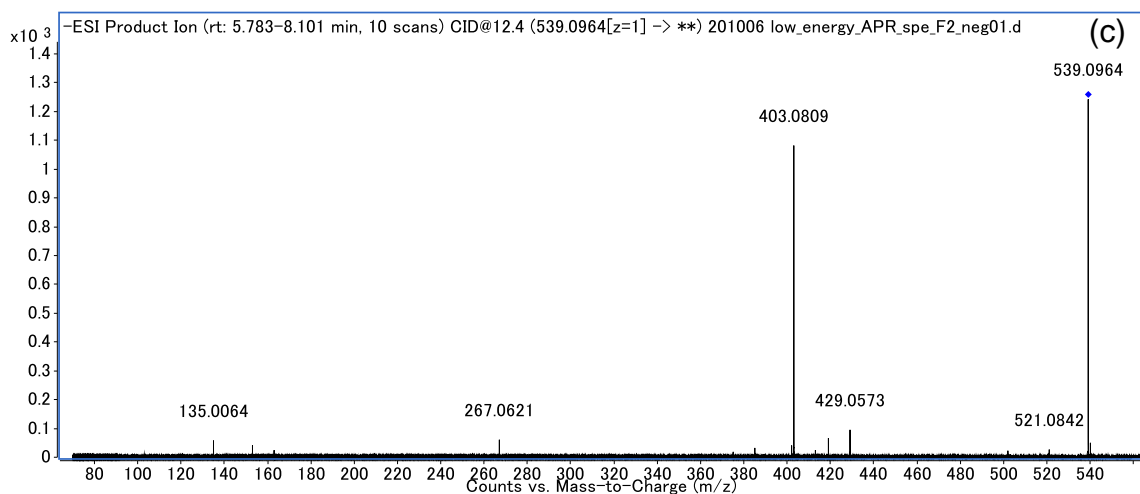
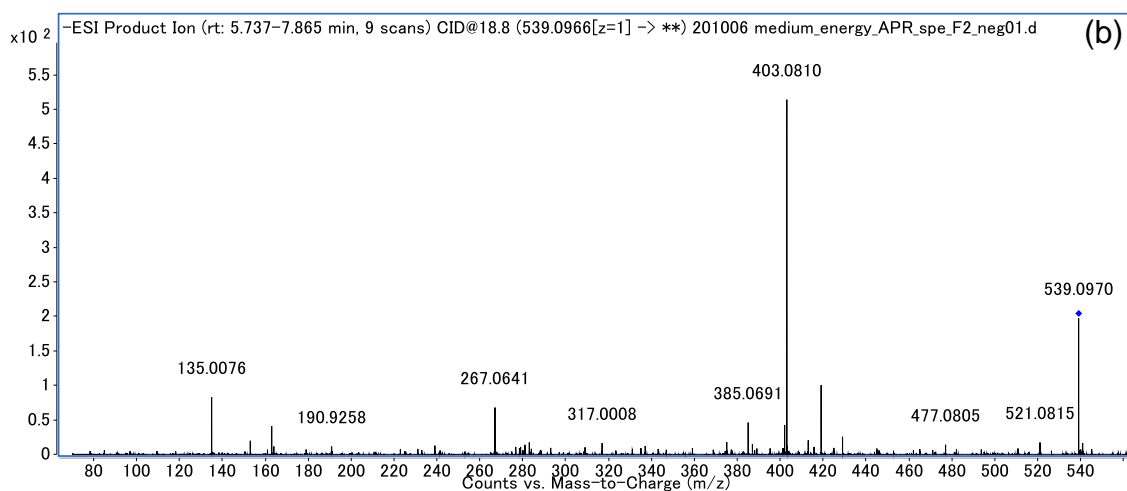
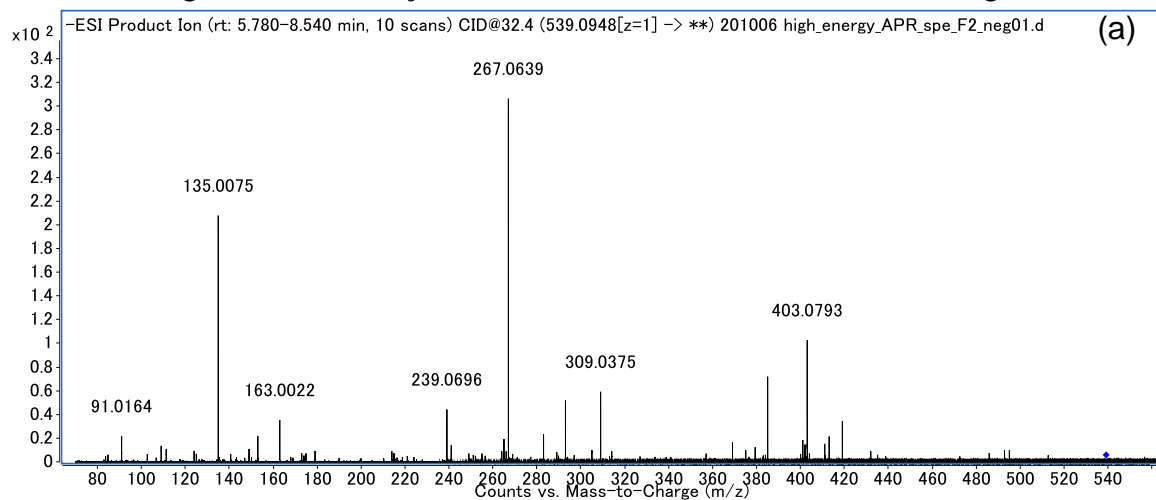


FIGURA A64 - Espectro de MS² do composto de m/z 387,0866 e tr 9,07 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

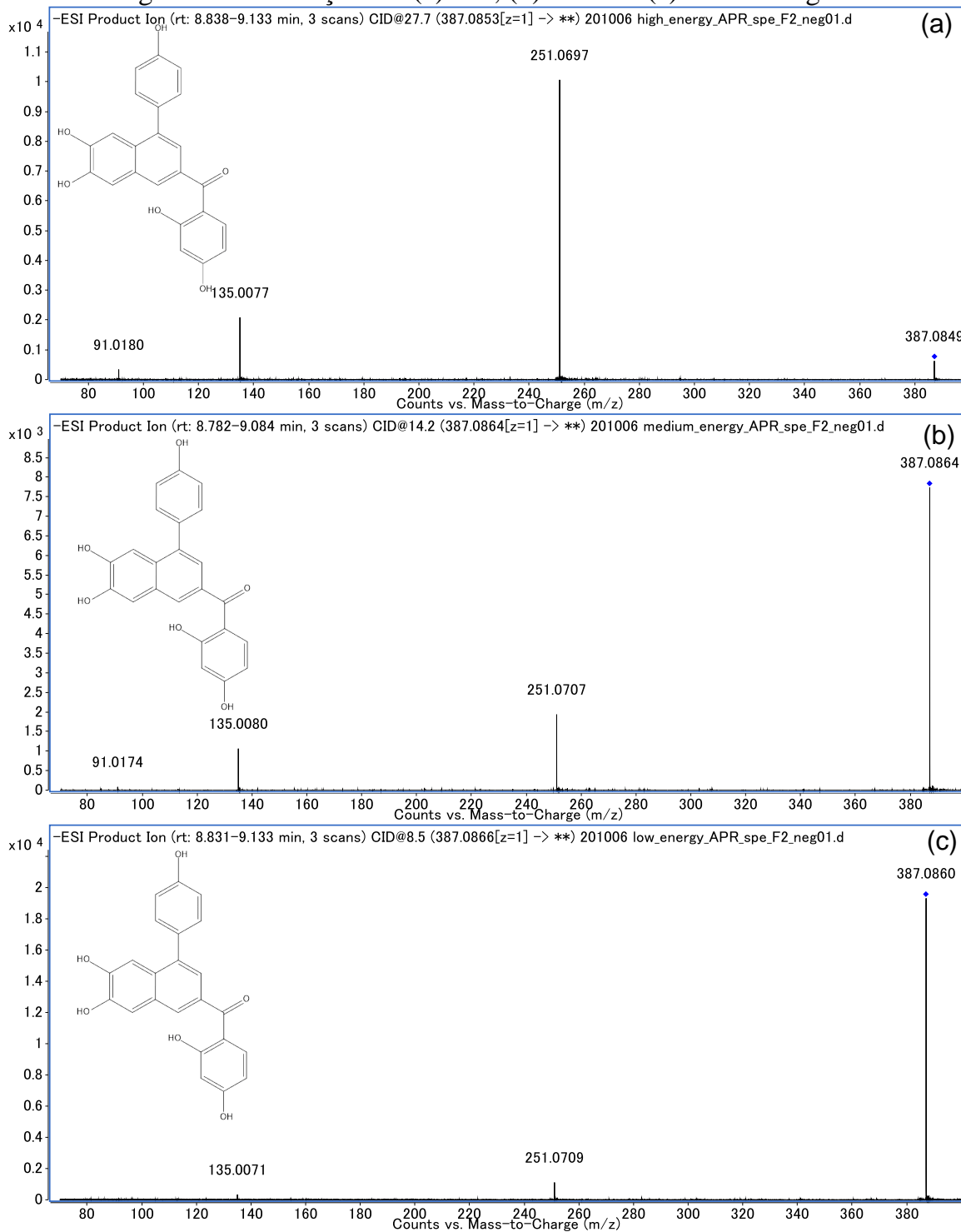


FIGURA A65 - Espectro de MS² do composto de m/z 183,0293 e tr 4,30 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

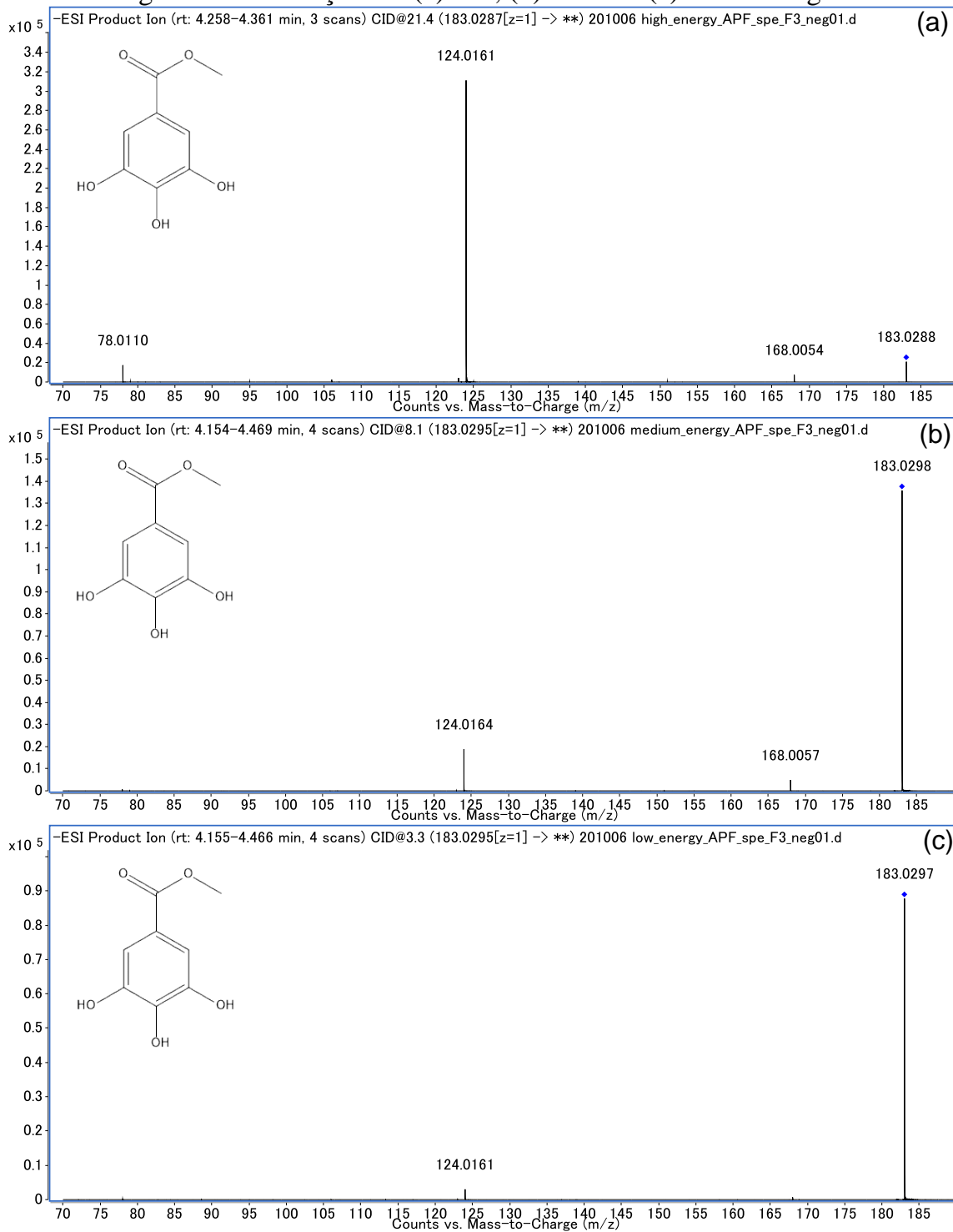


FIGURA A66 - Espectro de MS² do composto de m/z 183,0293 e tr 5,75 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

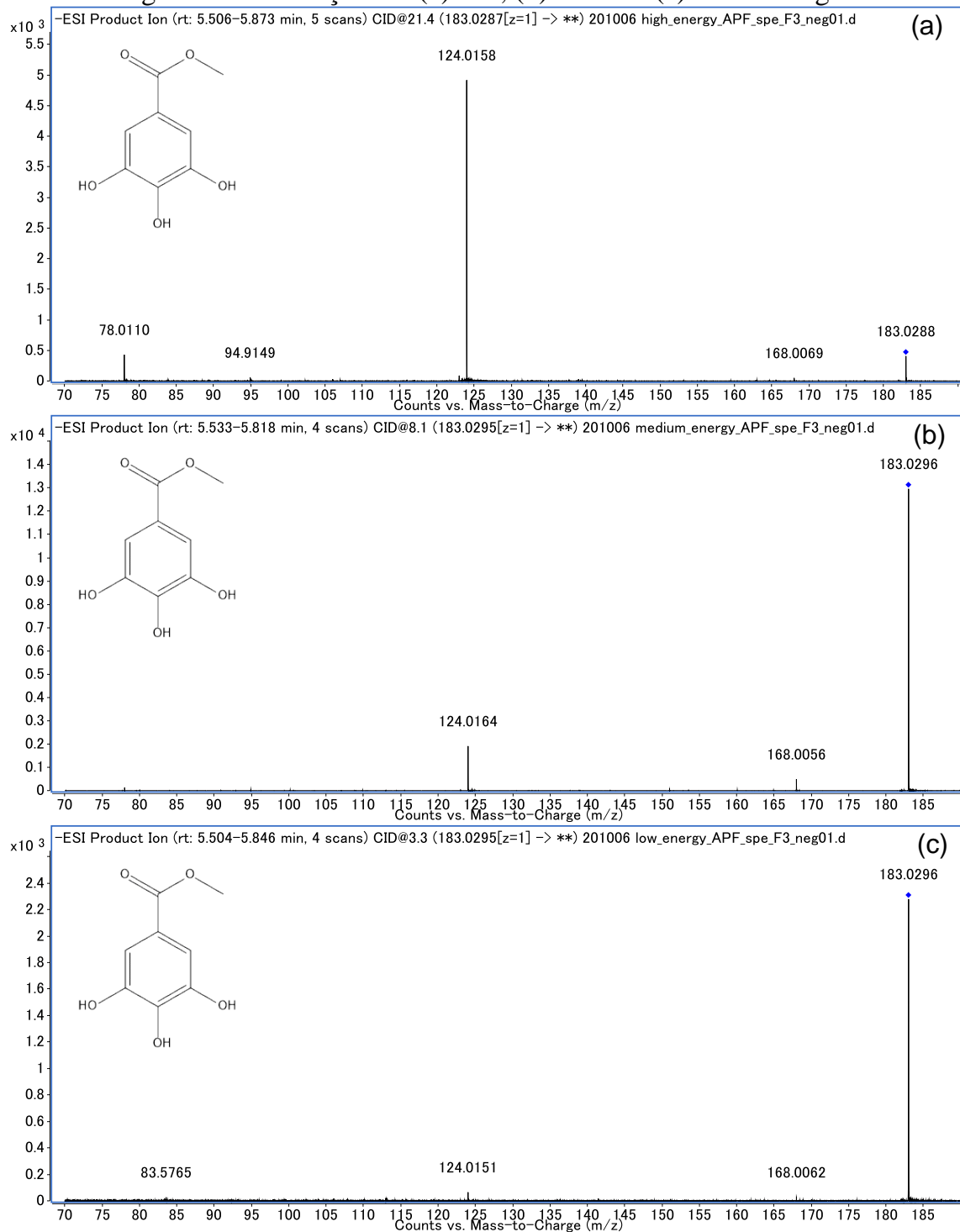


FIGURA A67 - Espectro de MS² do composto de m/z 183,0293 e tr 6,22 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

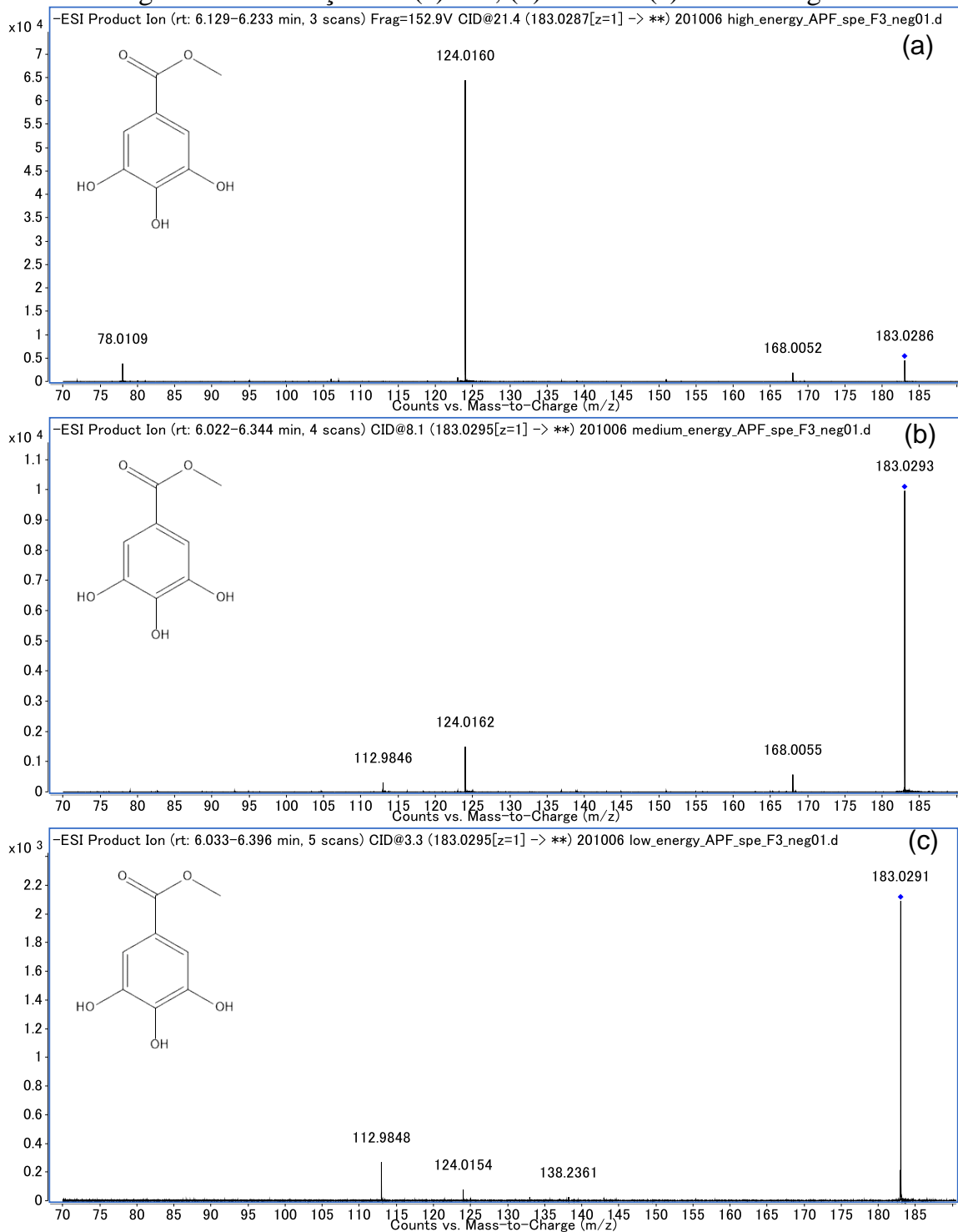


FIGURA A68 - Espectro de MS² do composto de m/z 197,0451 e tr 5,55 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

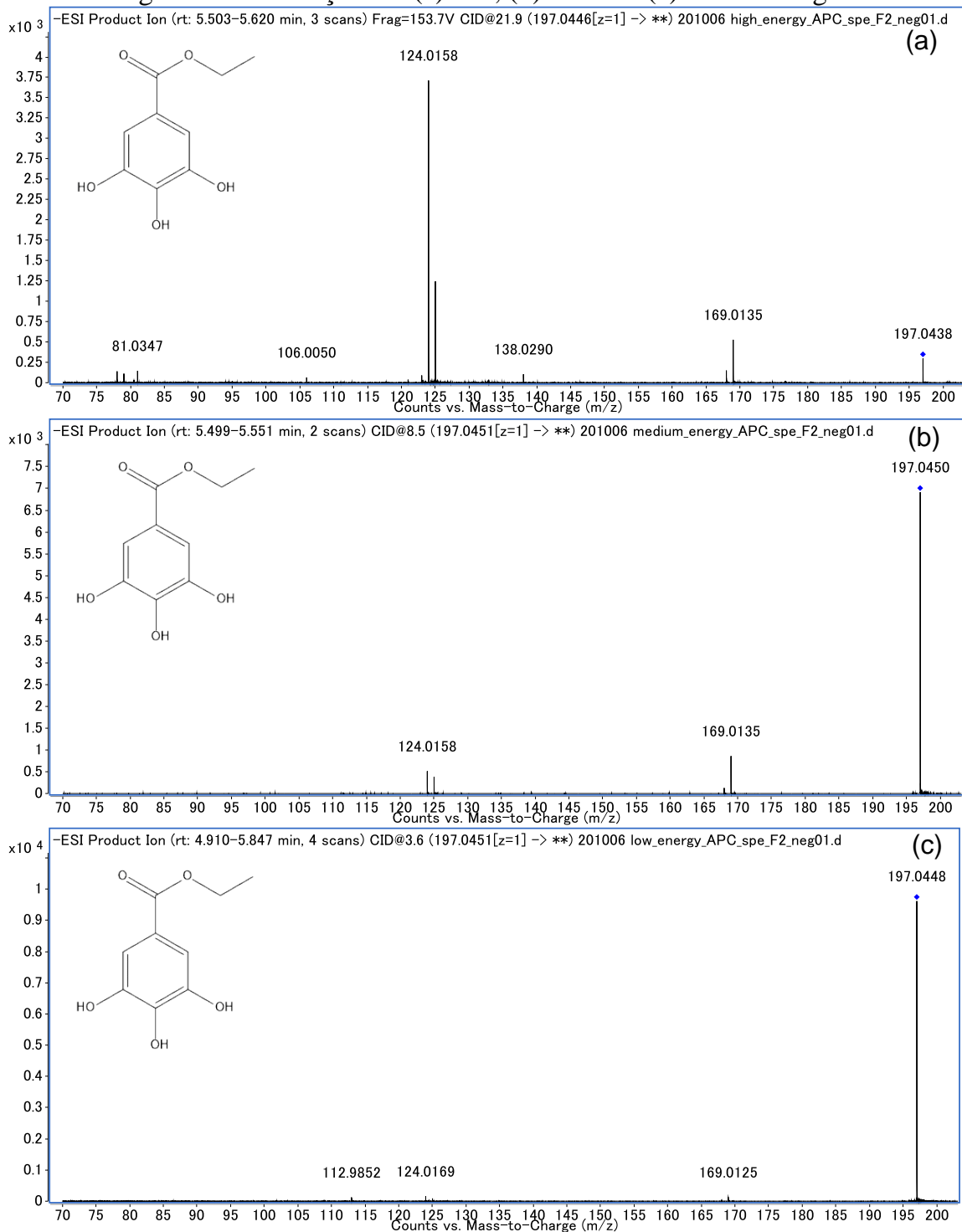


FIGURA A69 - Espectro de MS² do composto de m/z 335,0403 e tr 5,55 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

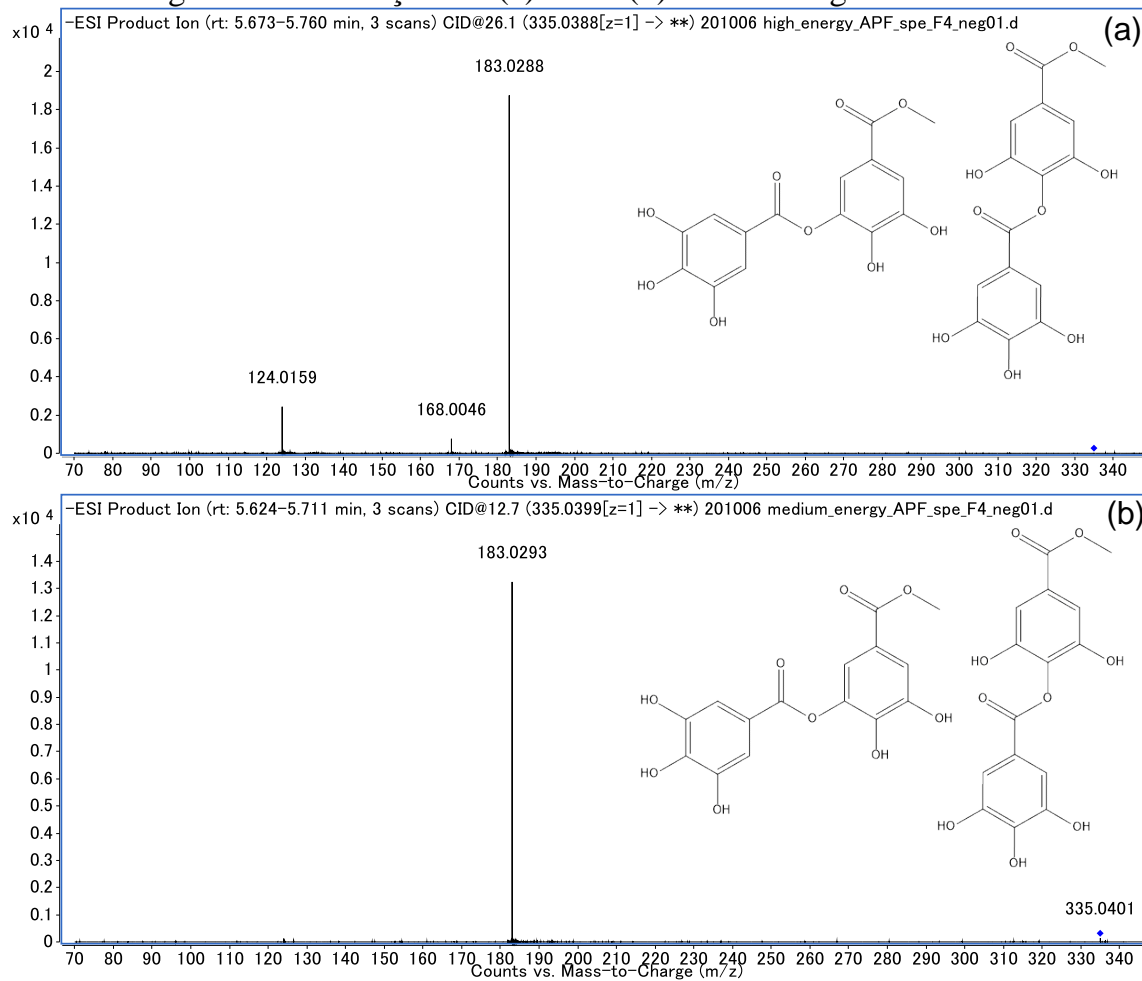


FIGURA A70 - Espectro de MS² do composto de m/z 335,0403 e tr 6,22 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

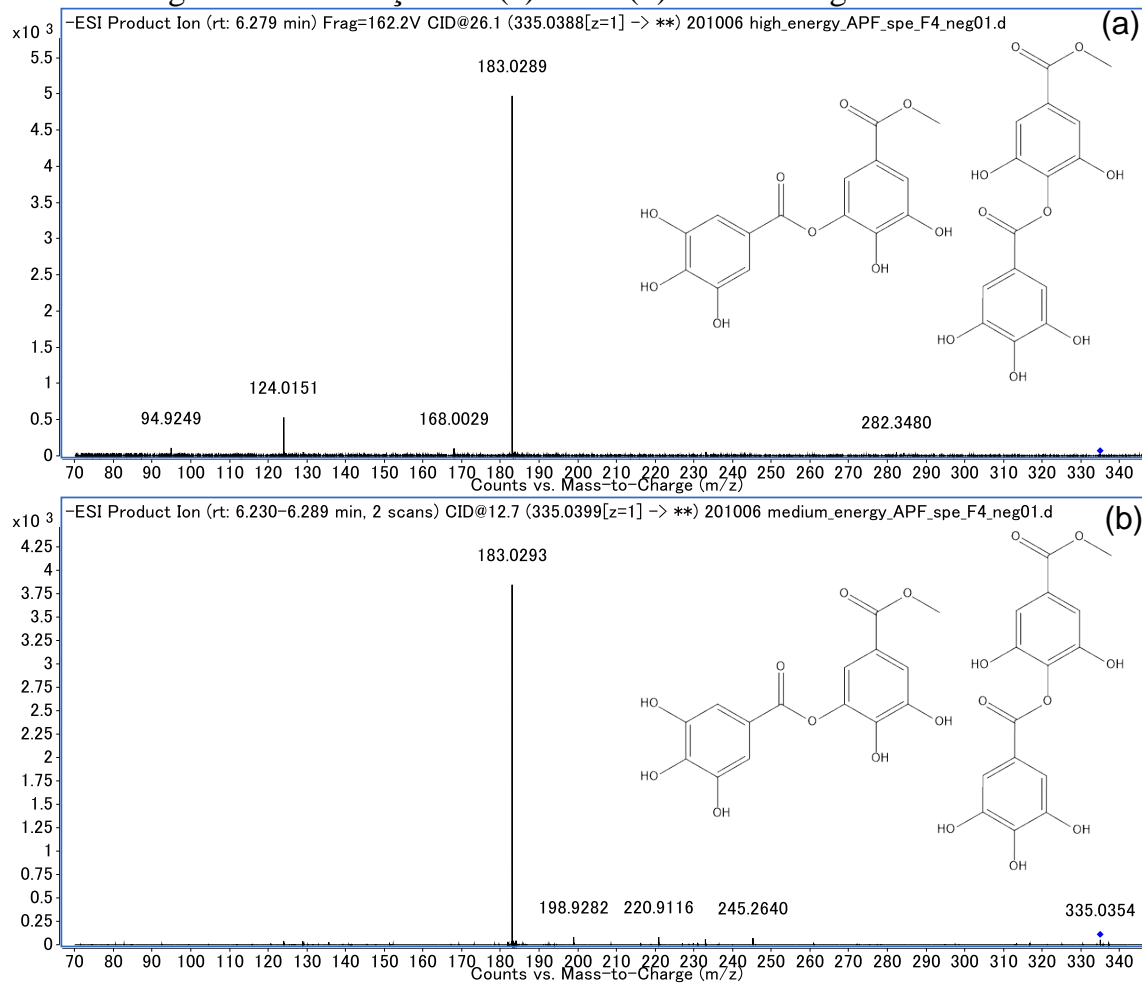


FIGURA A71 - Espectro de MS² do composto de m/z 335,0403 e tr 6,95 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

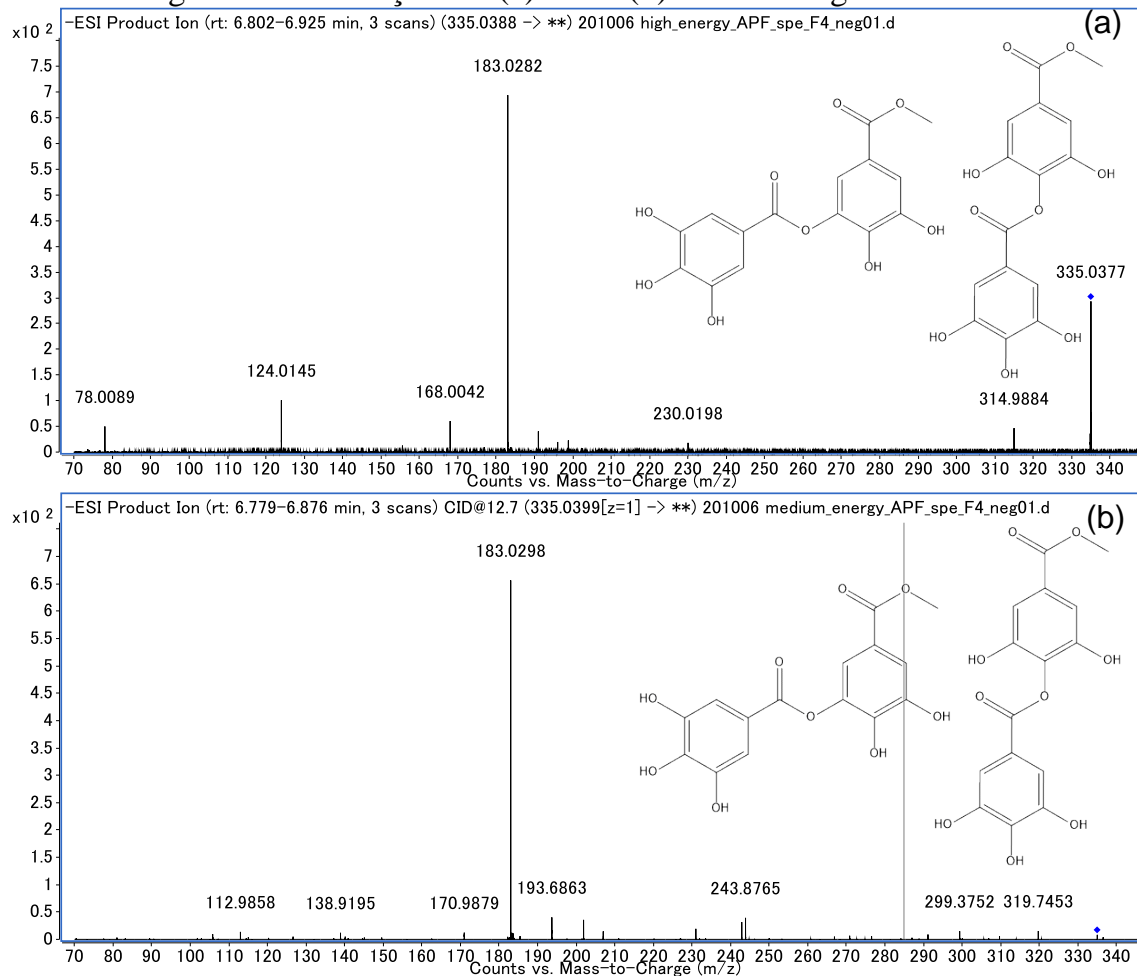


FIGURA A72 - Espectro de MS² composto de m/z 321,0244 e tr 4,31 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

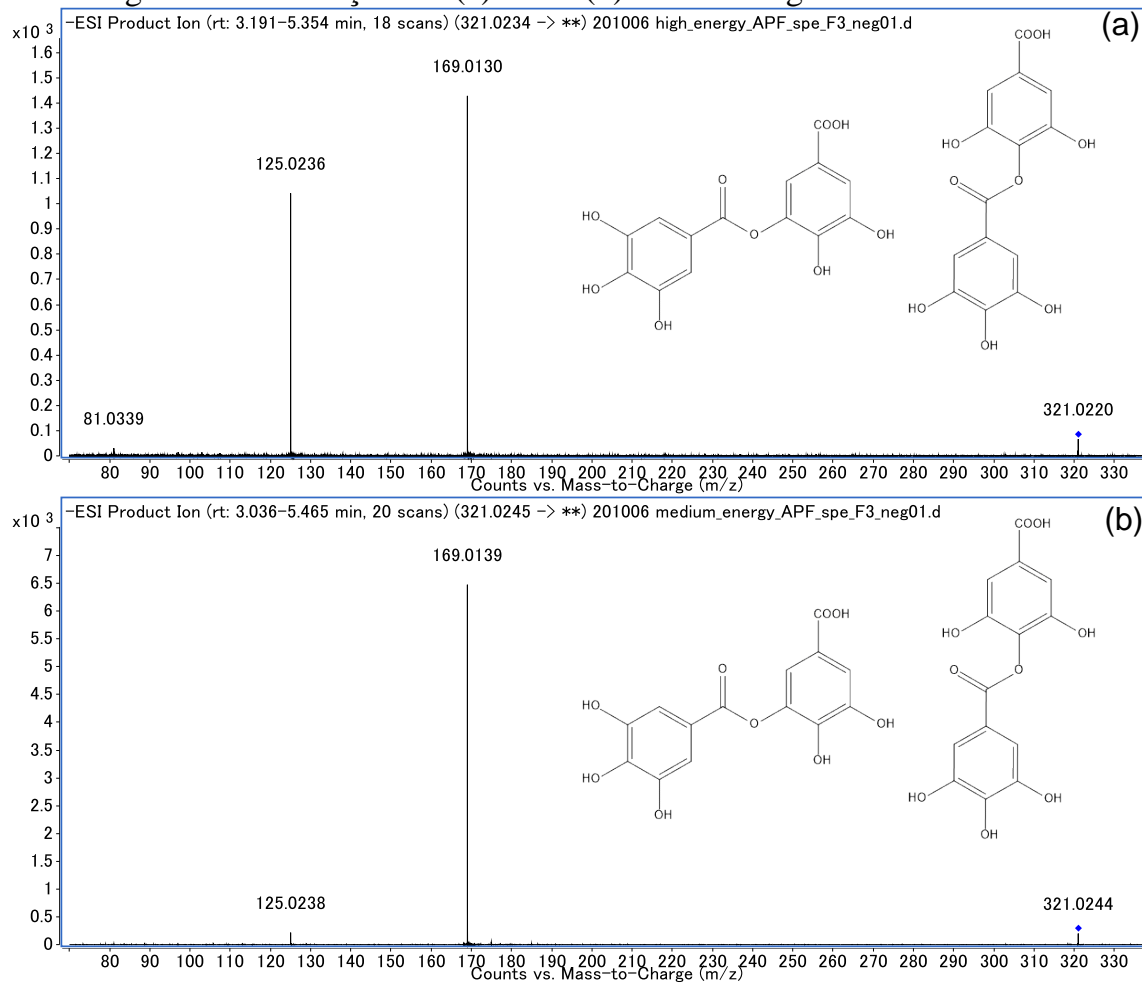


FIGURA A73 - Espectro de MS² do composto de m/z 487,0509 e tr 6,95 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

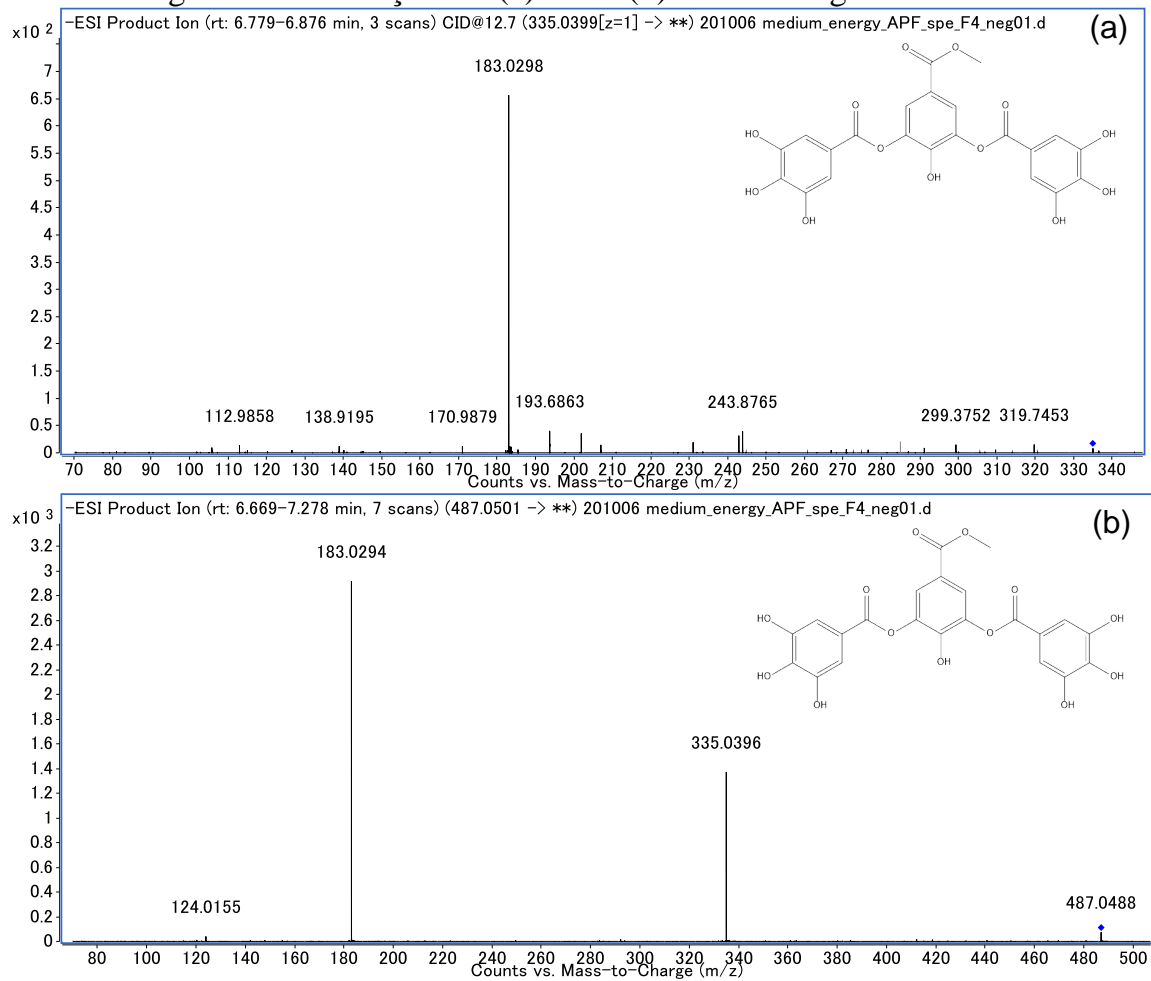


FIGURA A74 - Espectro de MS² do composto de m/z 473,0349 e tr 5, 39 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

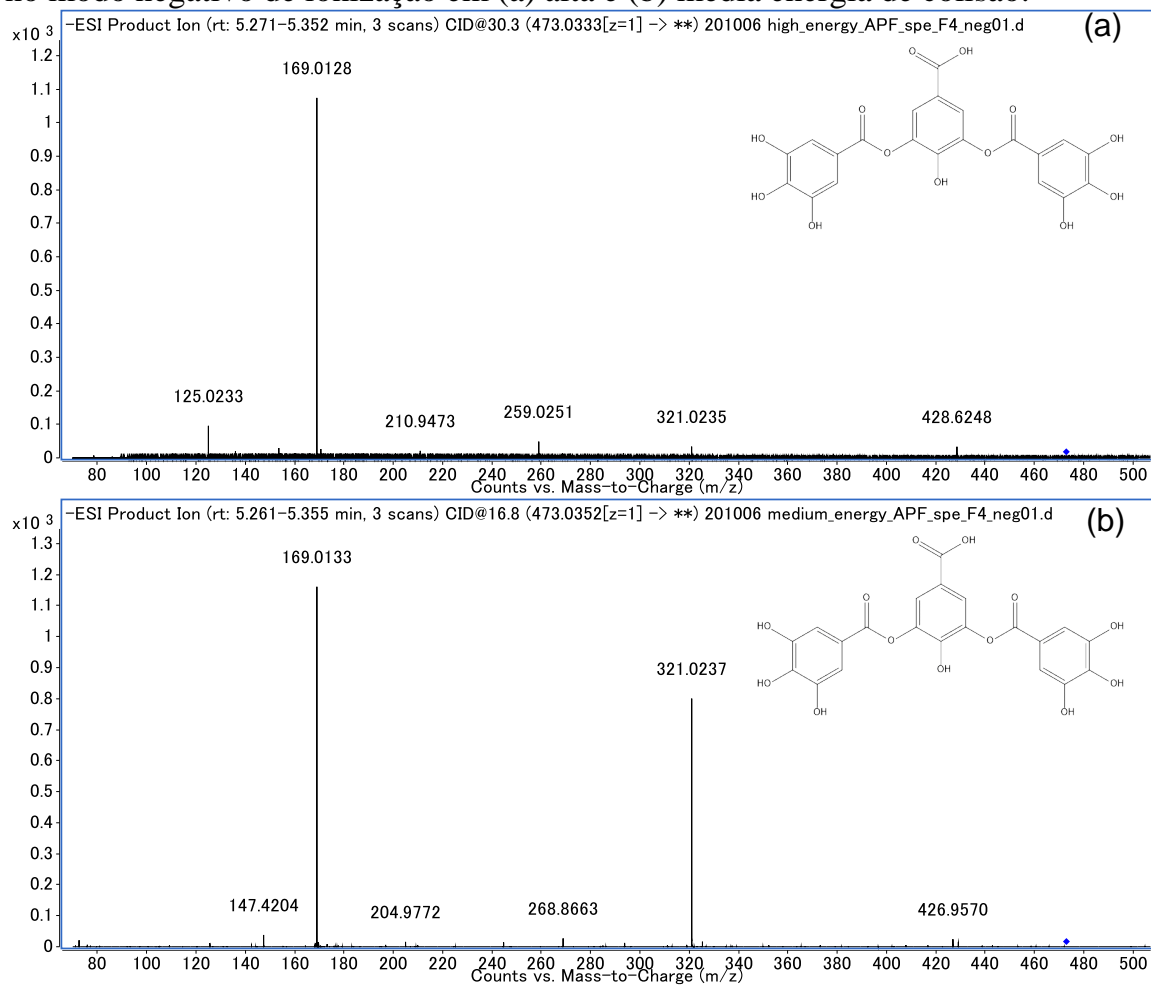


FIGURA A75 - Espectro de MS² do composto de m/z 169,0138 e tr 0,87 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

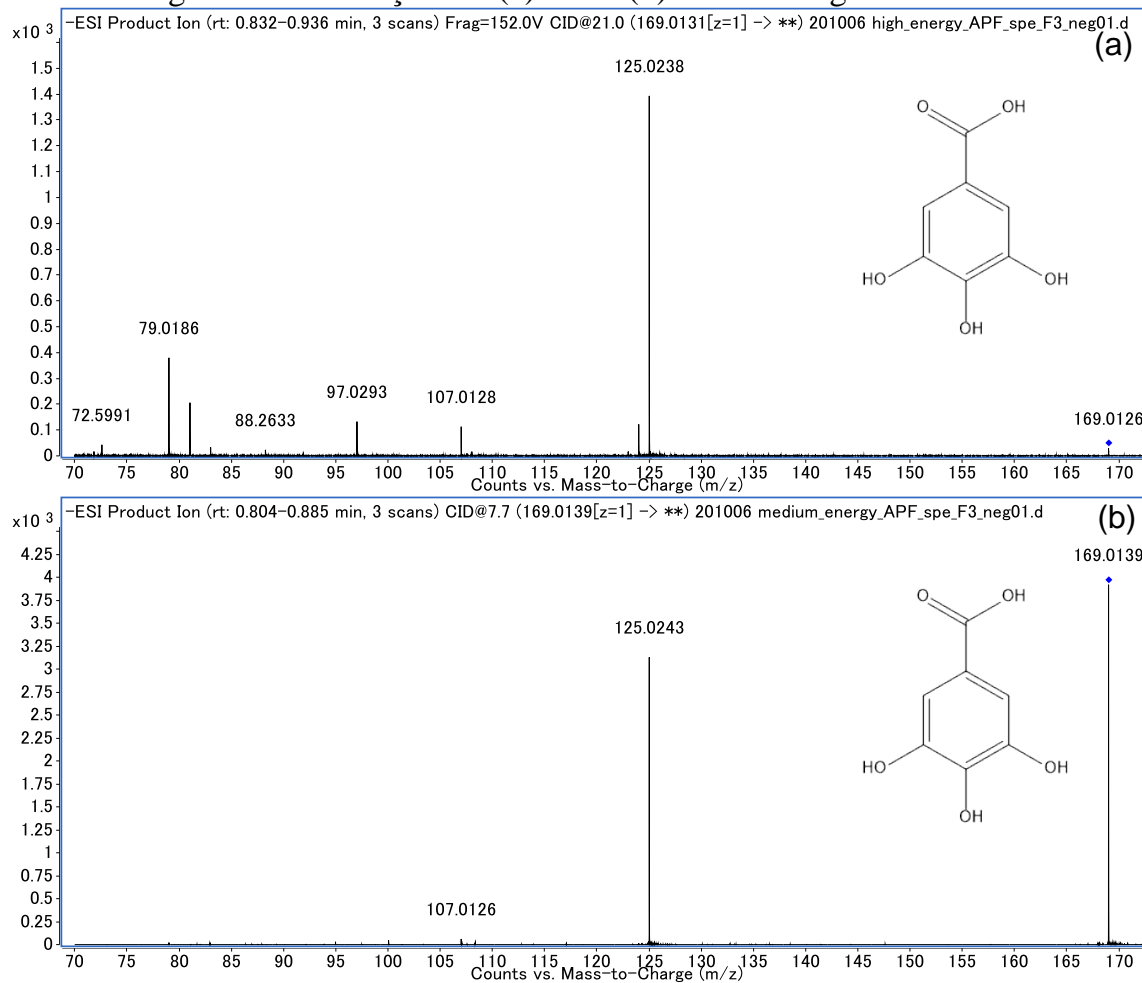


FIGURA A76 - Espectro de MS² do composto de m/z 169,0138 e tr 1,68 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

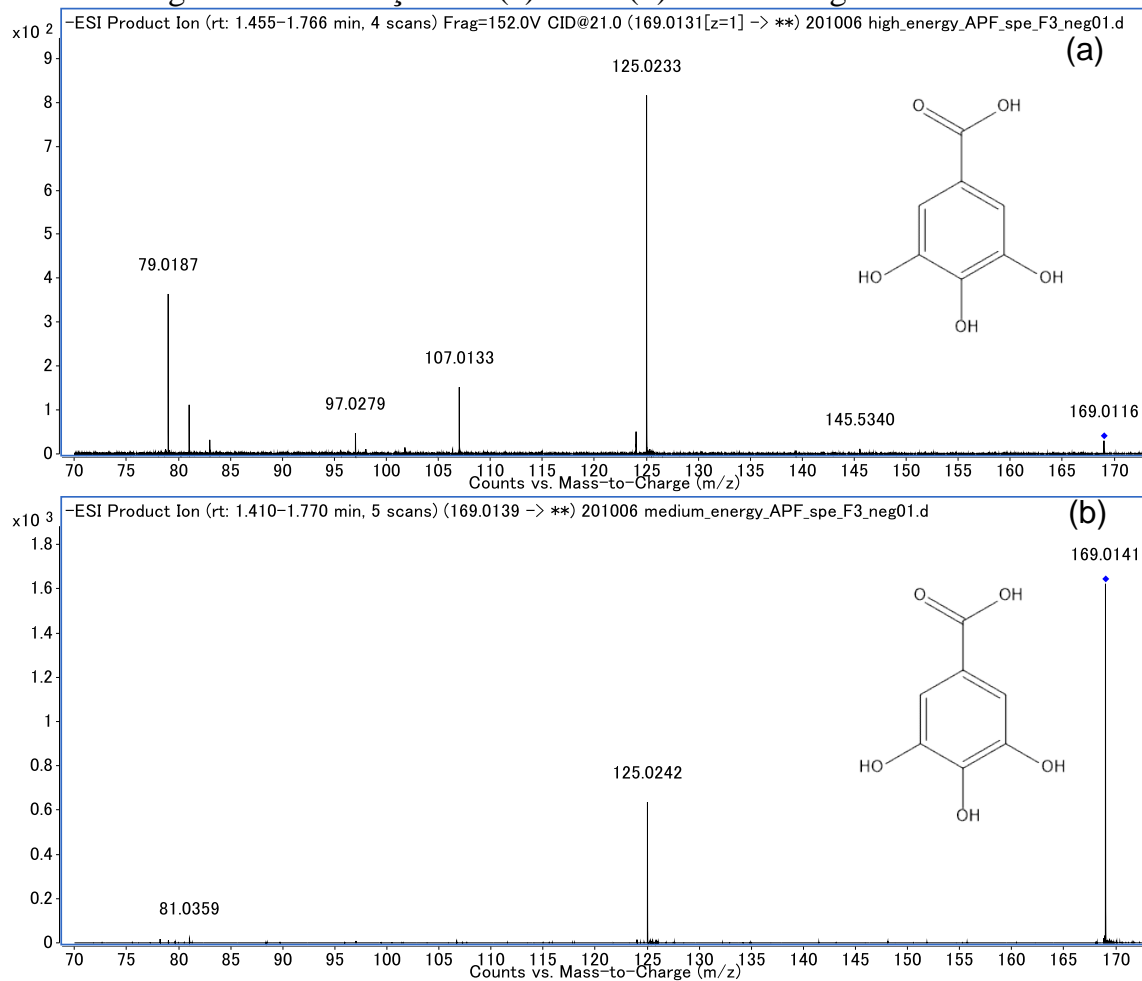


FIGURA A77 - Espectro de MS² do composto de m/z 169,0138 e tr 4,30 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta e (b) média energia de colisão.

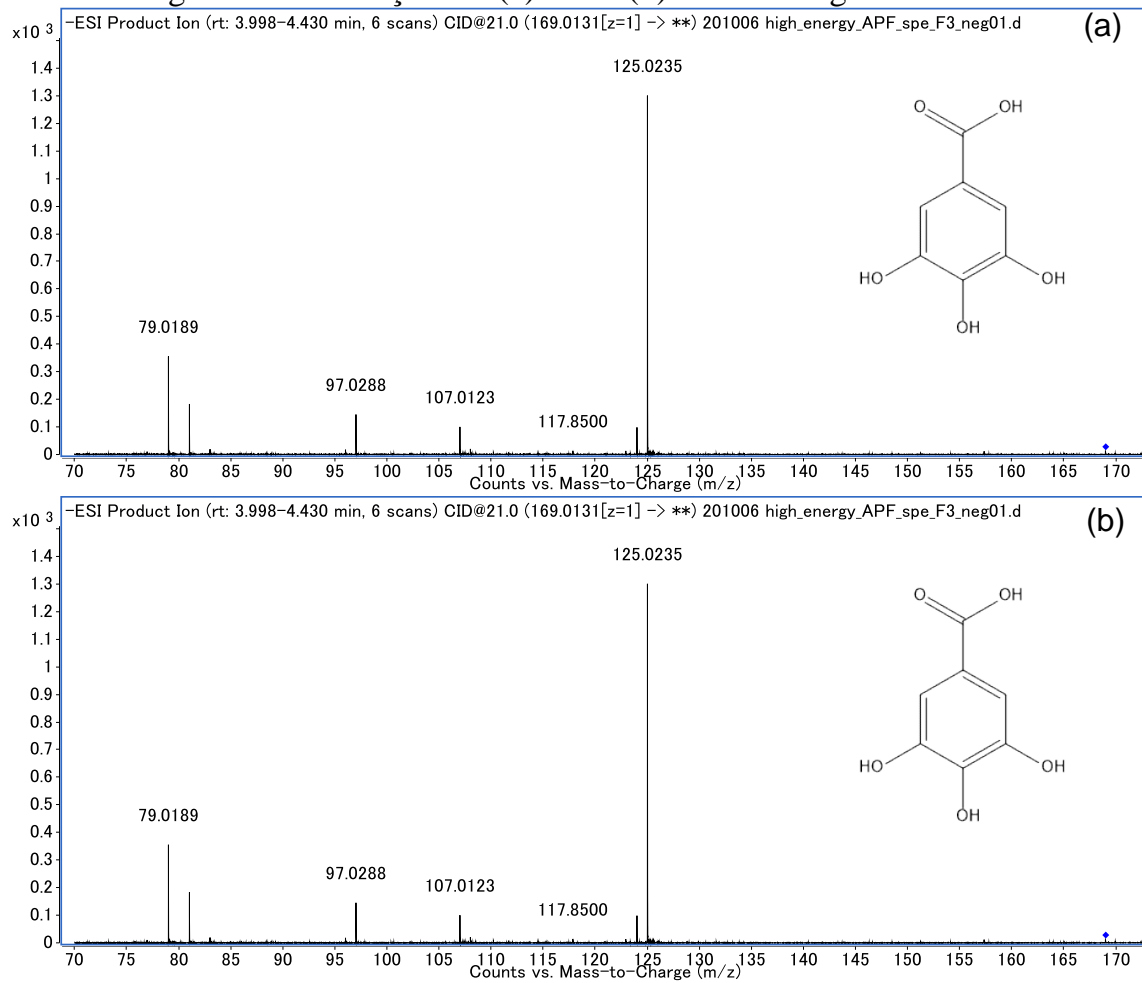


FIGURA A78 - *Mirror match* do íon de m/z 169,01 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido gálico (CI8). Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

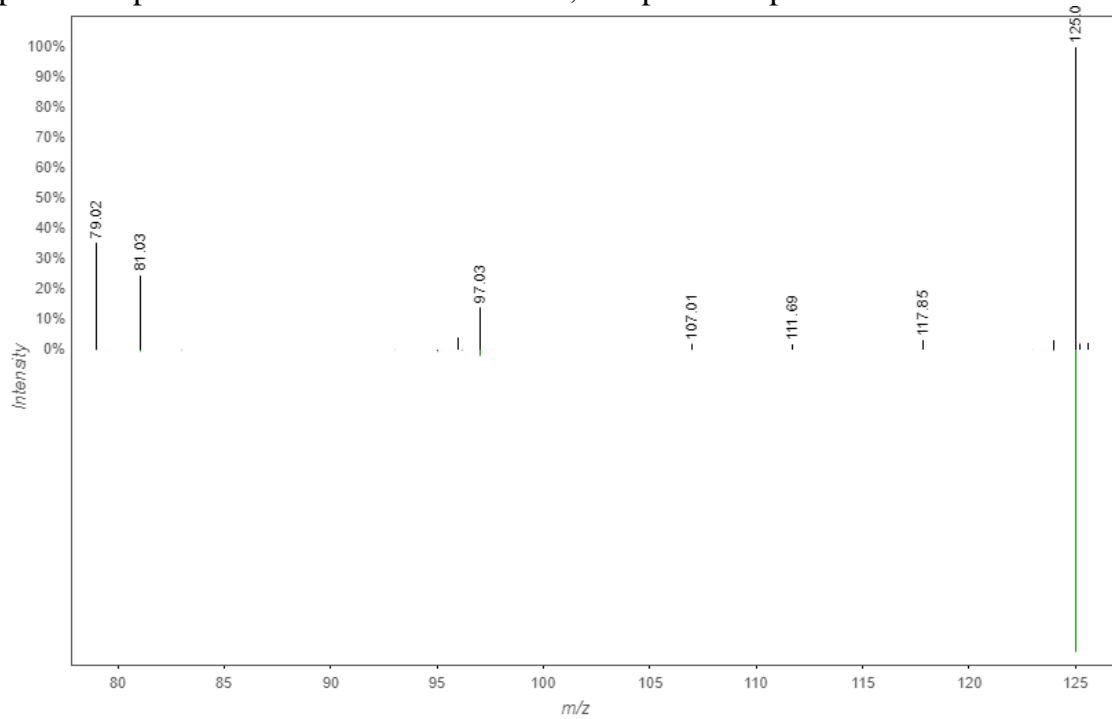


FIGURA A79 - *Mirror match* do íon de m/z 169,01 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido gálico (CI9). Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

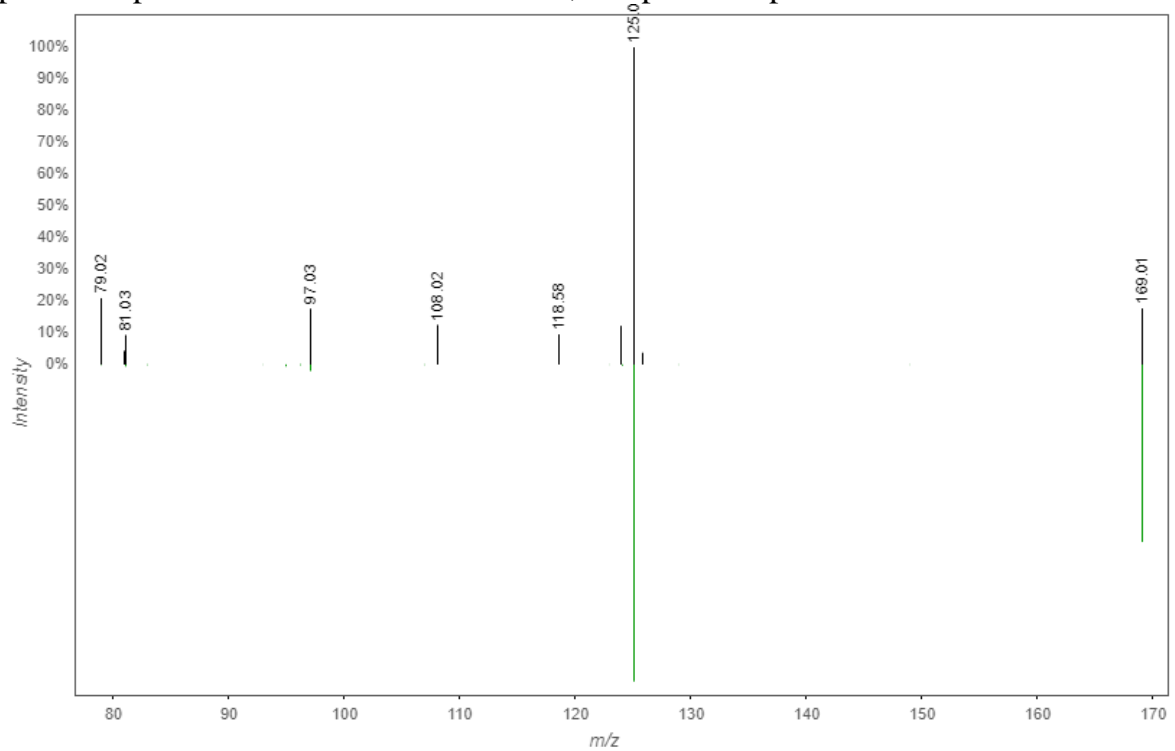


FIGURA A80 - *Mirror match* do íon de m/z 169,01 obtido no modo negativo de ionização e que foi anotado pela plataforma do GNPS como ácido gálico (CI10). Em preto o espectro da referência e em verde, o espectro experimental.

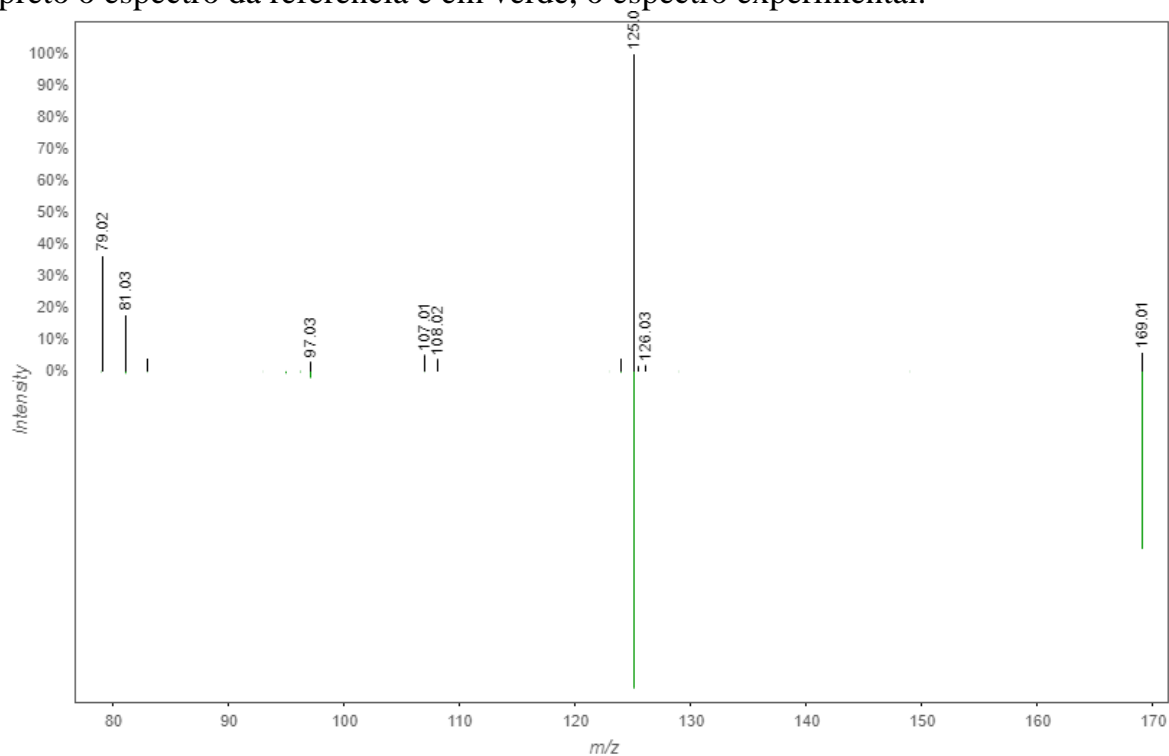


FIGURA A81 - Espectro de MS² do composto de m/z 345,2434 e tr 19,09 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

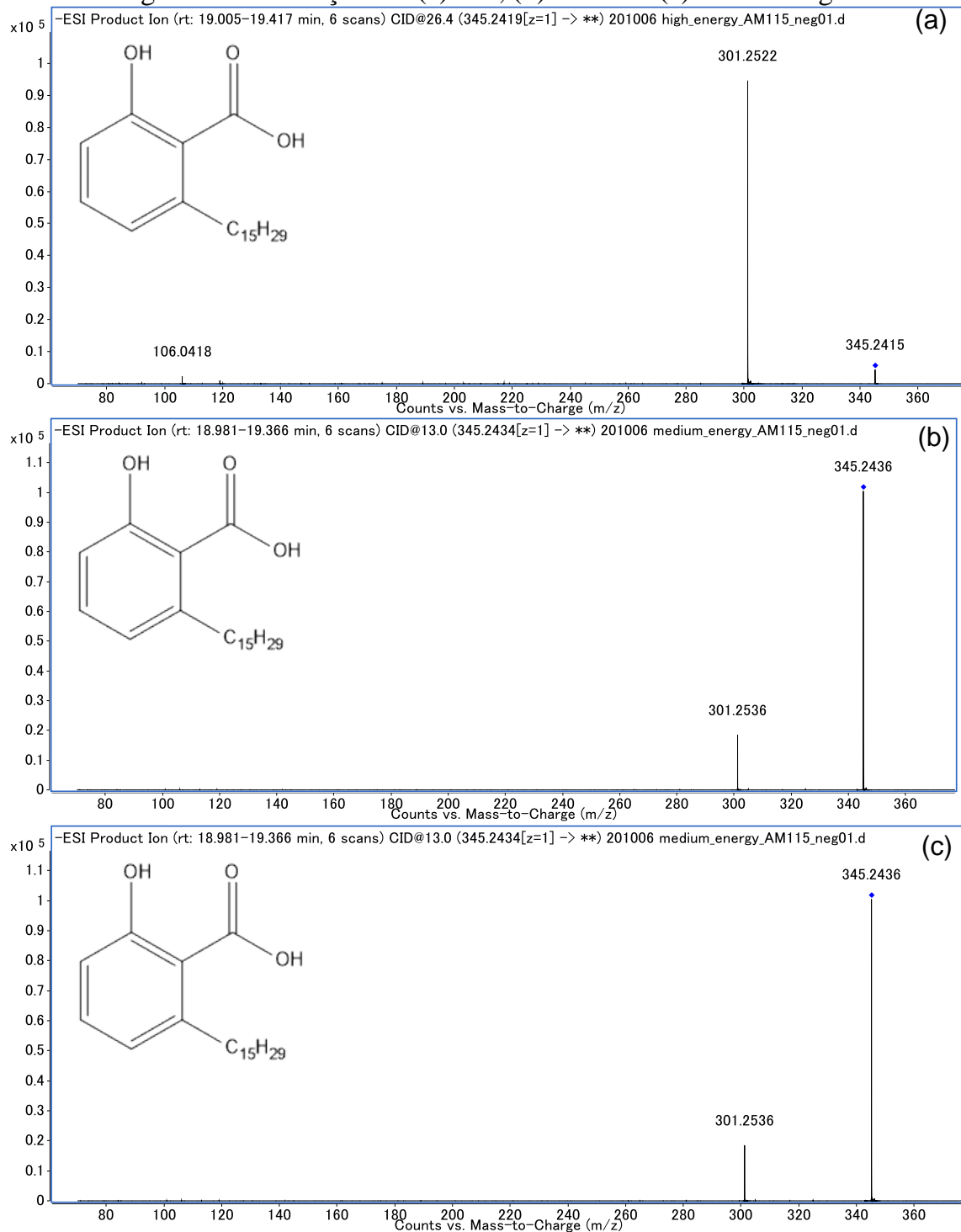


FIGURA A82 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 343,2275 e tr 18,23 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

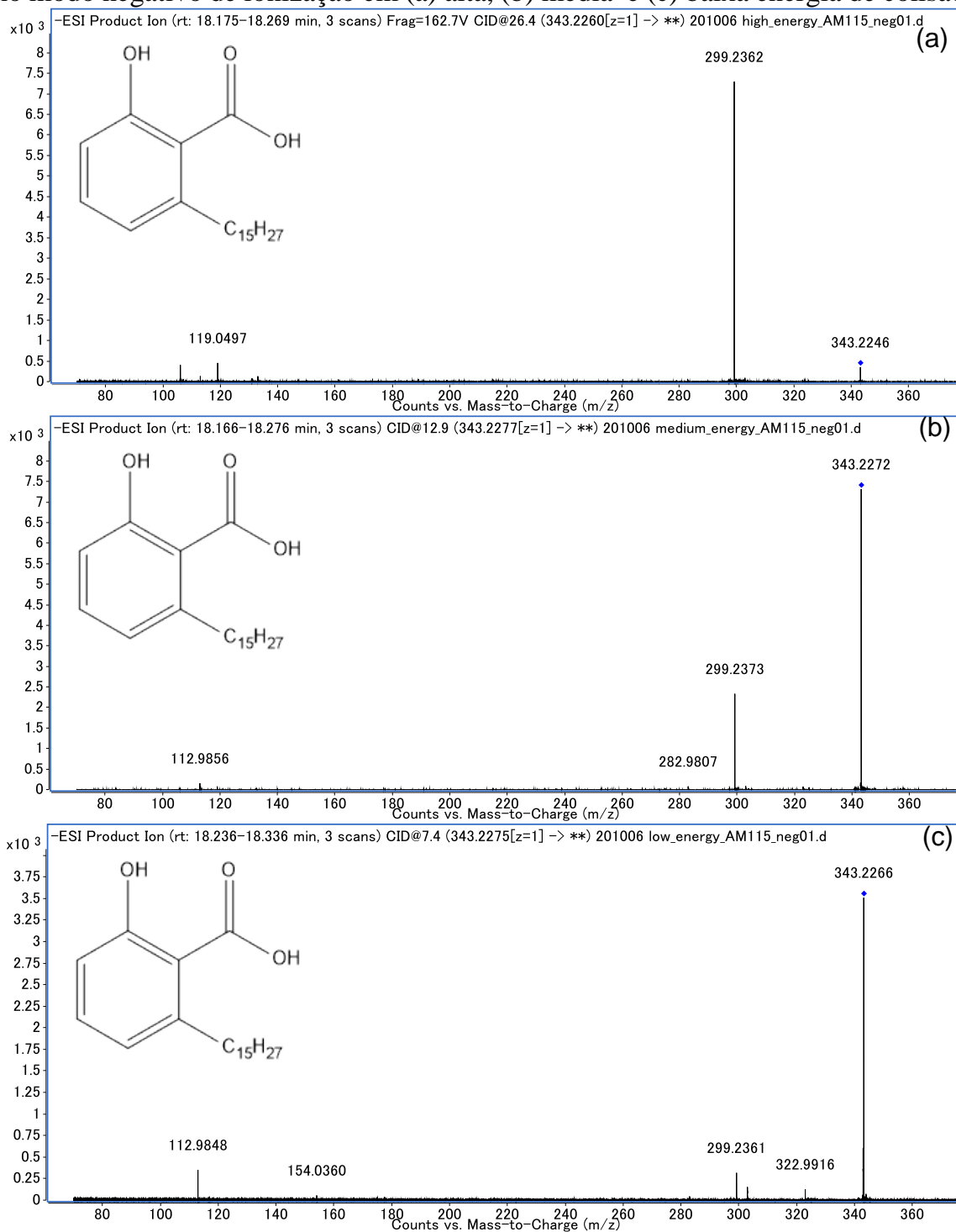


FIGURA A83 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 317,2116 e tr 17,84 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

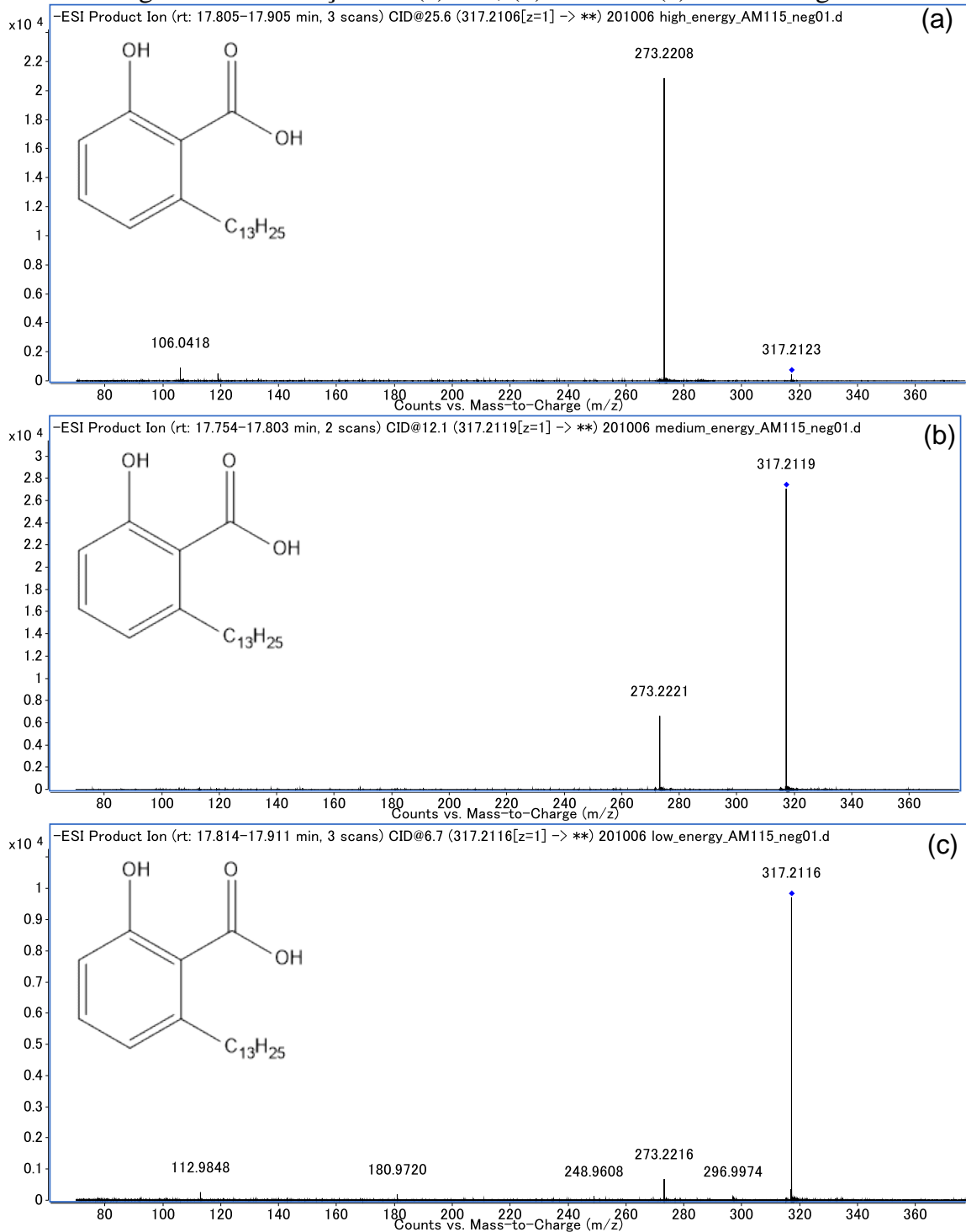


FIGURA A84 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 369,2429 e tr 18,52 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

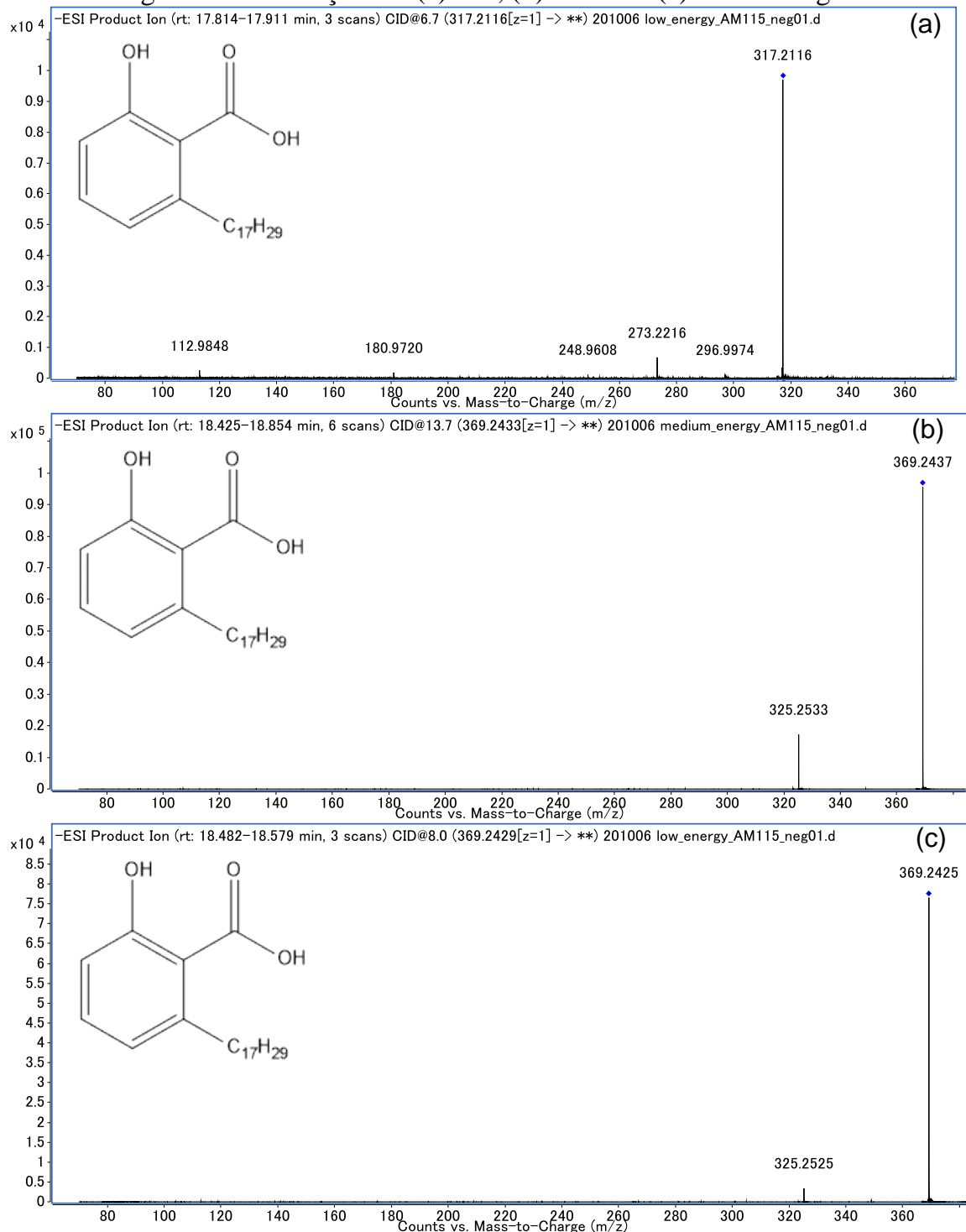


FIGURA A85 - Espectro de MS² do composto de m/z 373,2740 e tr 20,45 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

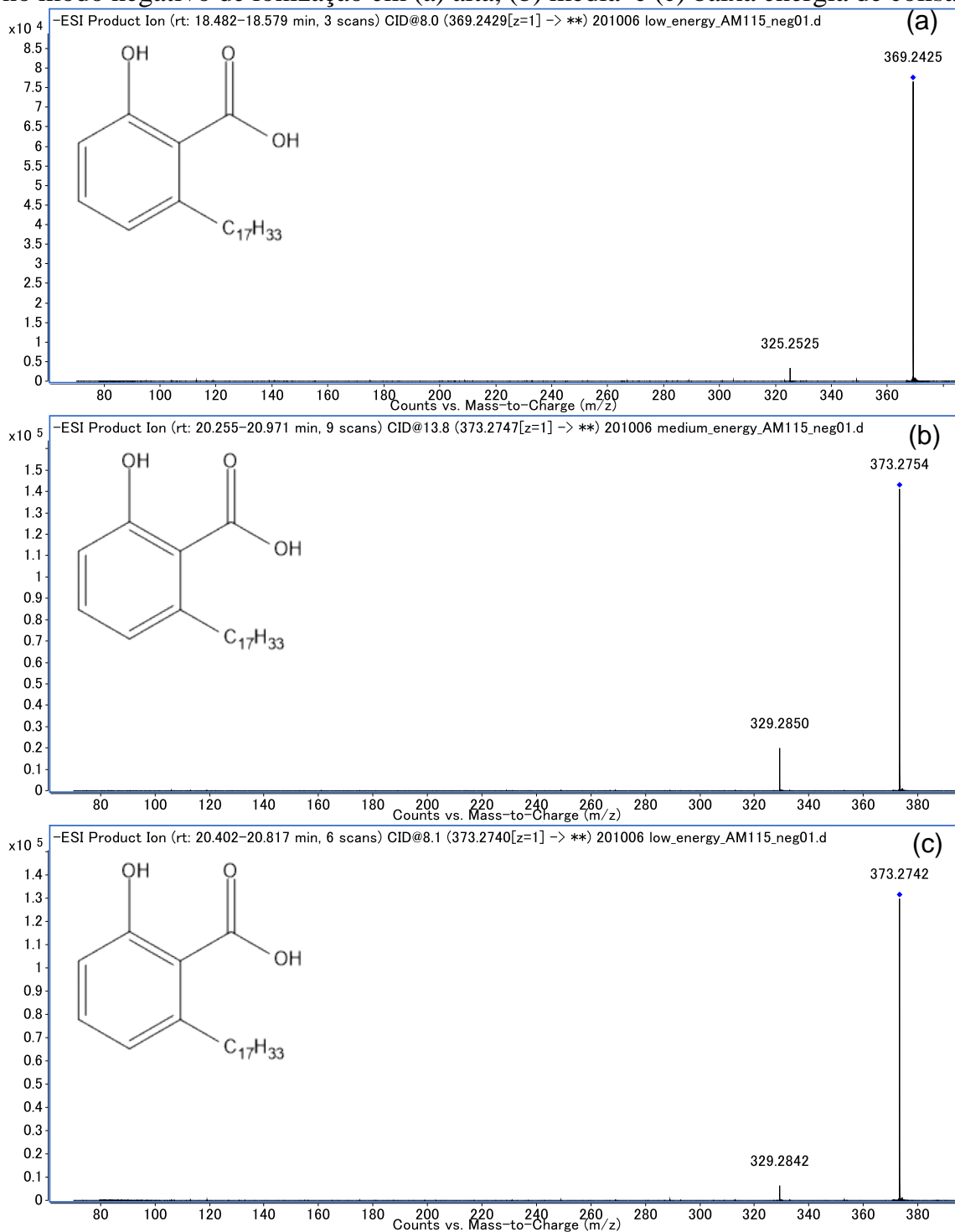


FIGURA A86 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 371,2585 e tr 19,31 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

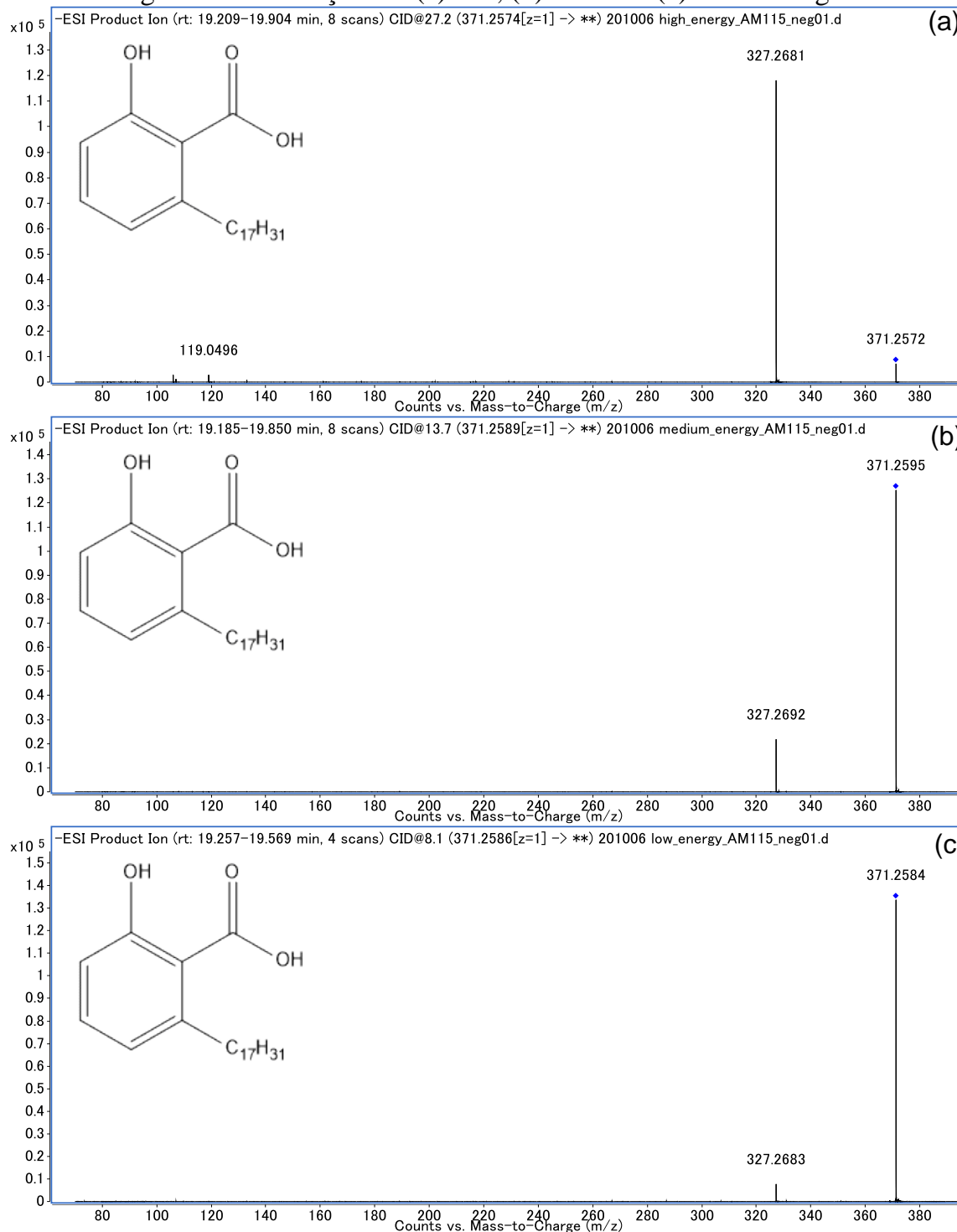


FIGURA A87 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 347,2589 e tr 20,33 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

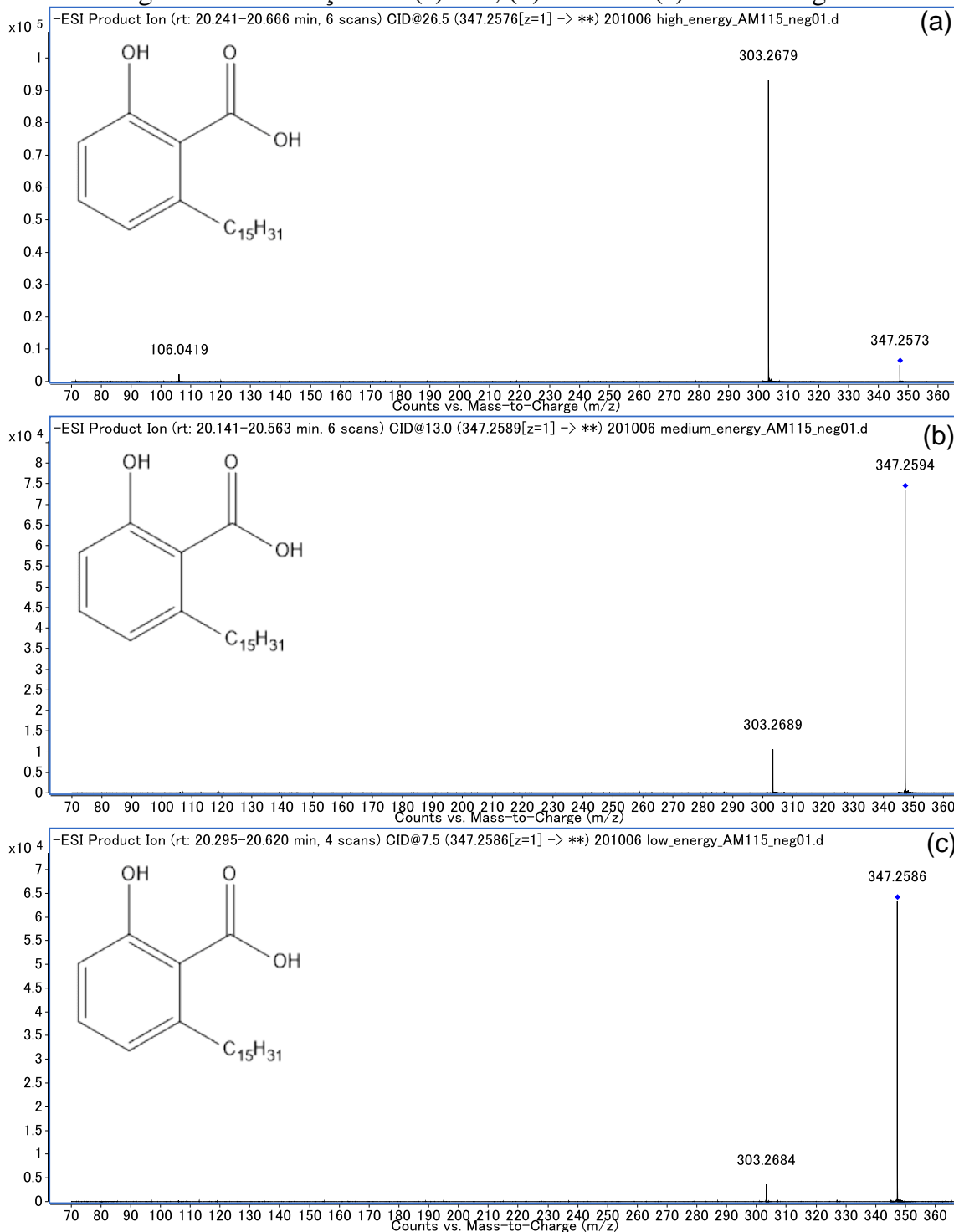


FIGURA A88 - Espectro de MS² do composto de *m/z* 319,2274 e tr 18,93 min obtidos no modo negativo de ionização em (a) alta, (b) média e (c) baixa energia de colisão.

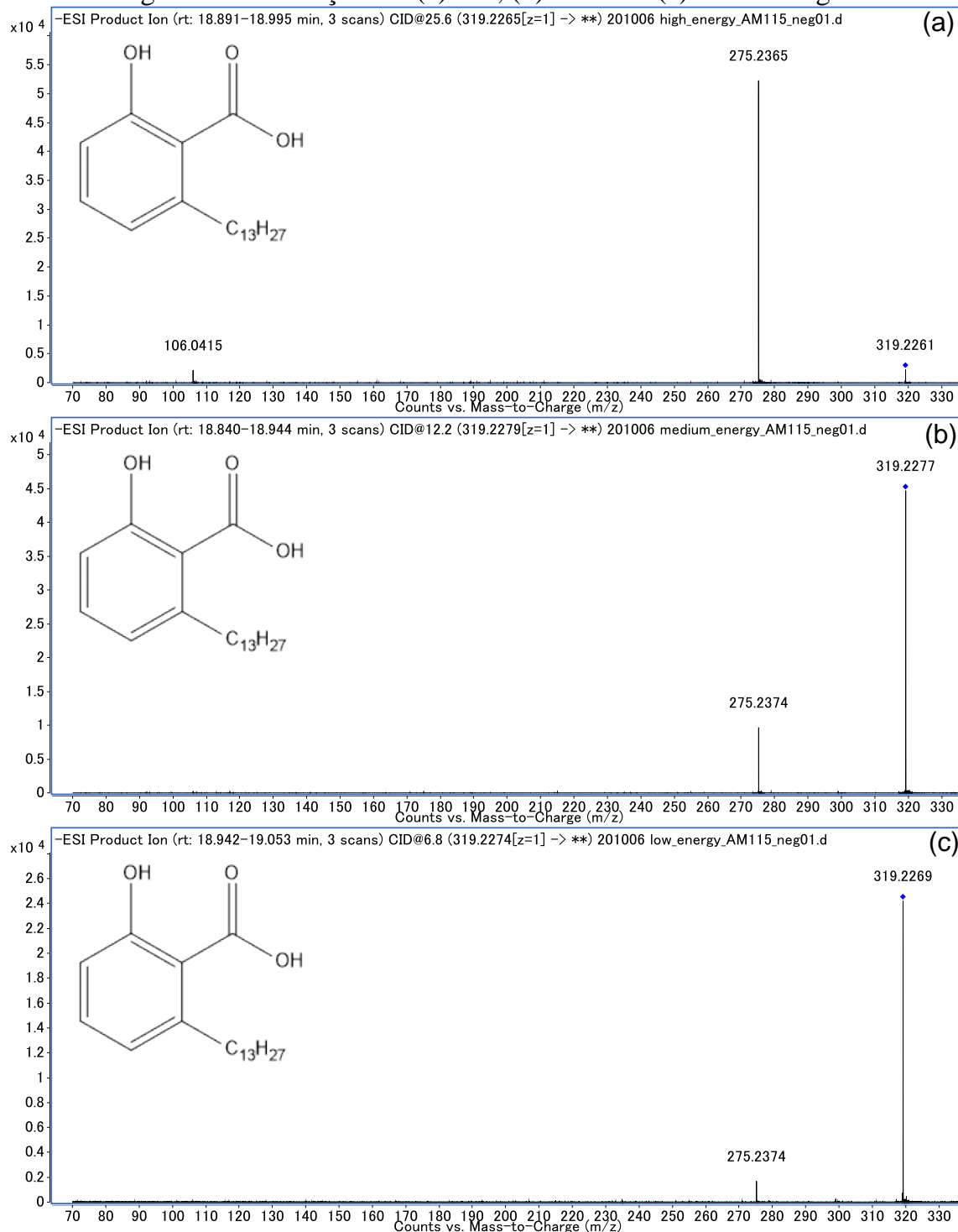


FIGURA A89 - Distribuição do pentagaloiol hexosídeo pelos tecidos da planta.

UnknownRT[min]=5.8 m/z=939.1064

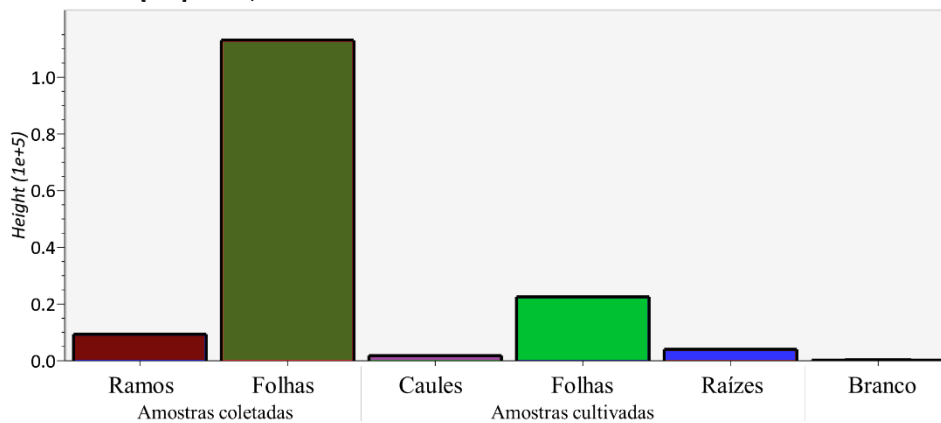


FIGURA A90 - Distribuição do hexagaloiol hexosídeo pelos tecidos da planta.

UnknownRT[min]=6.22 m/z=1091.1168

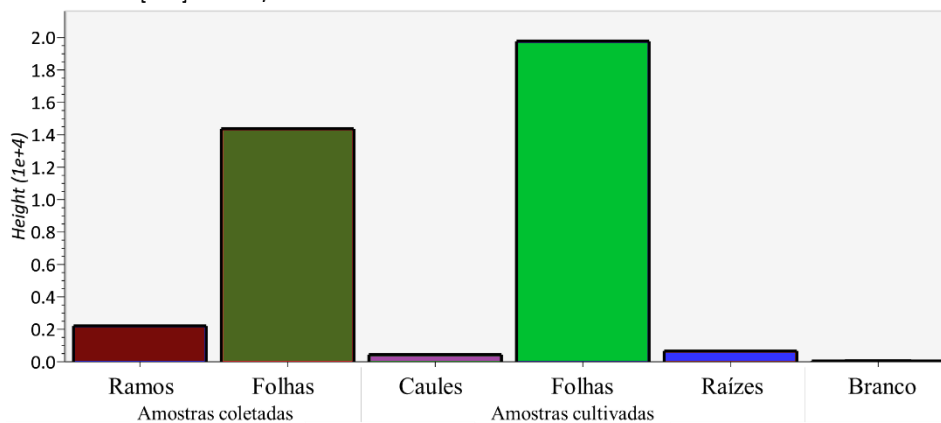


FIGURA A91 - Distribuição da apigenina-6-C-glucosídeo pelos tecidos da planta.

UnknownRT[min]=5.54 m/z=431.0966

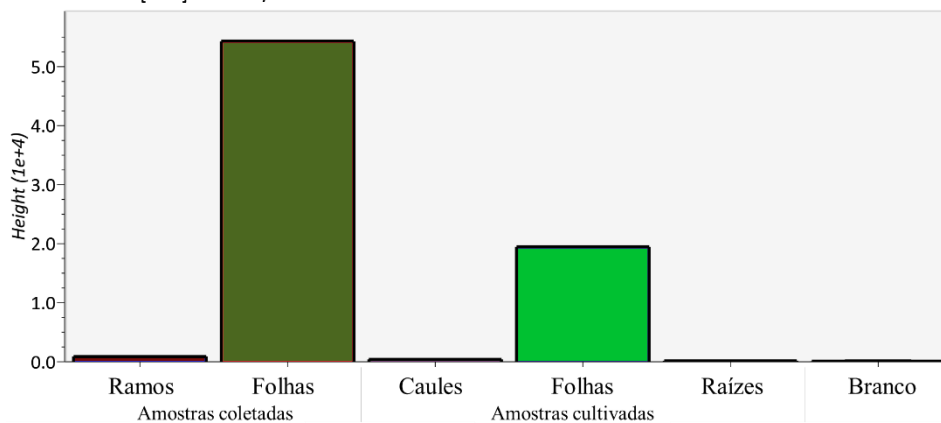


FIGURA A92 - Distribuição da quercetina-3-*O*-arabinosídeo pelos tecidos da planta.

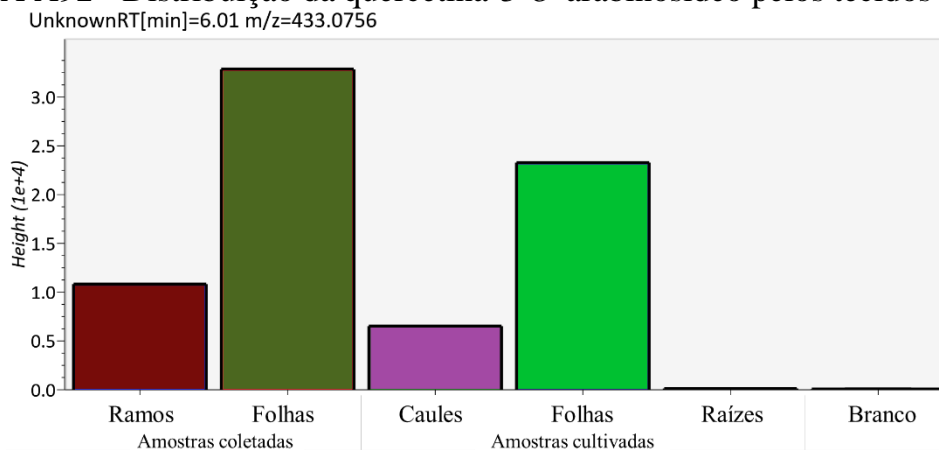


FIGURA A93 - Distribuição da quercetina-3-*O*-ramnosídeo pelos tecidos da planta.

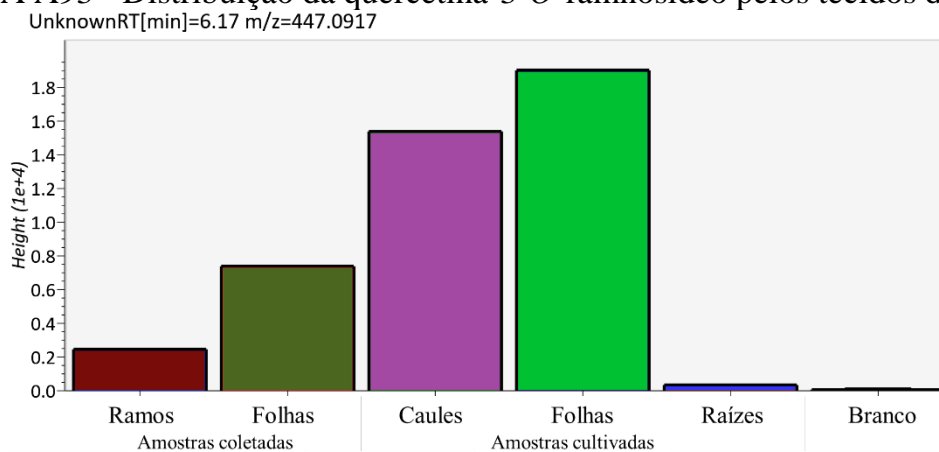


FIGURA A94 - Distribuição do ácido 3-*O*-metilelágico ramnosídeo pelos tecidos da planta.

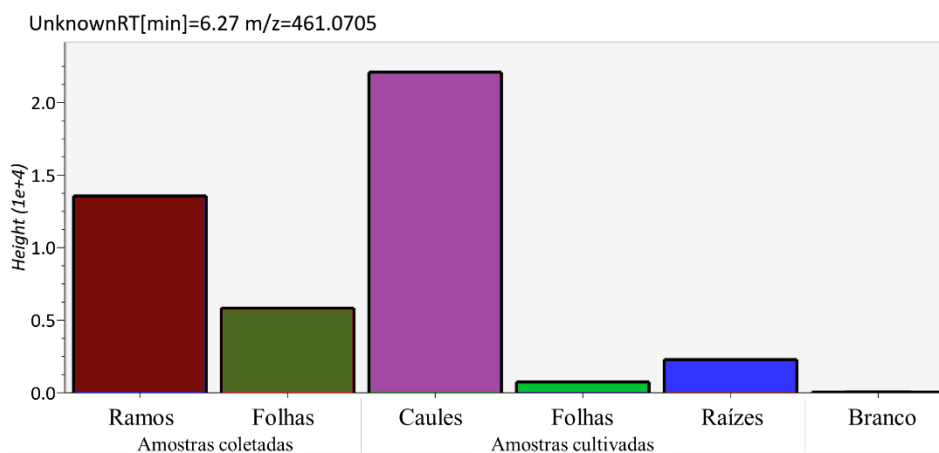


FIGURA A95 - Distribuição da quercetina-3-*O*-glucosídeo pelos tecidos da planta.

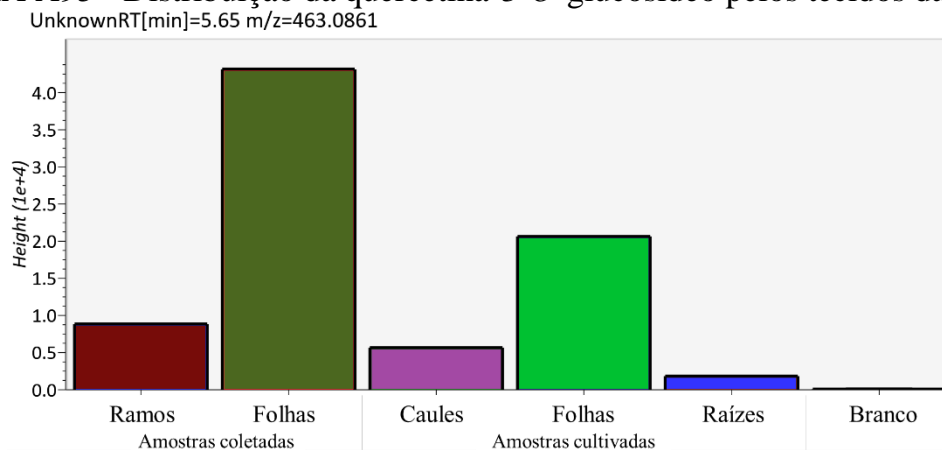


FIGURA A96 - Distribuição da miricetina-3-*O*-glucosídeo pelos tecidos da planta.

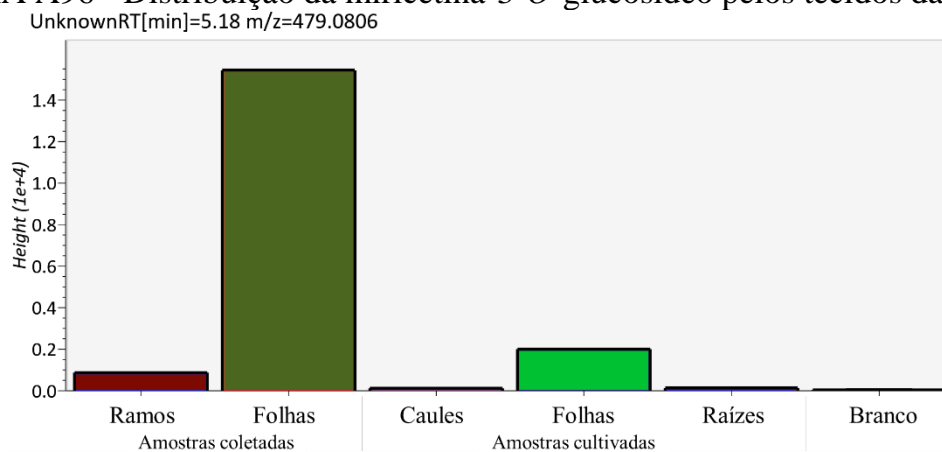


FIGURA A97 - Distribuição da (*epi*)catequina pelos tecidos da planta.

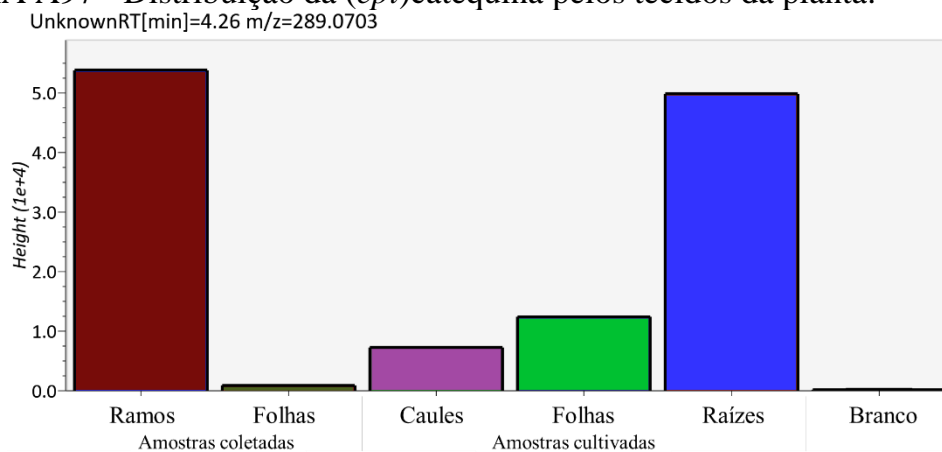


FIGURA A98 - Distribuição dos isômeros (*epi*)catequina pelos tecidos da planta.

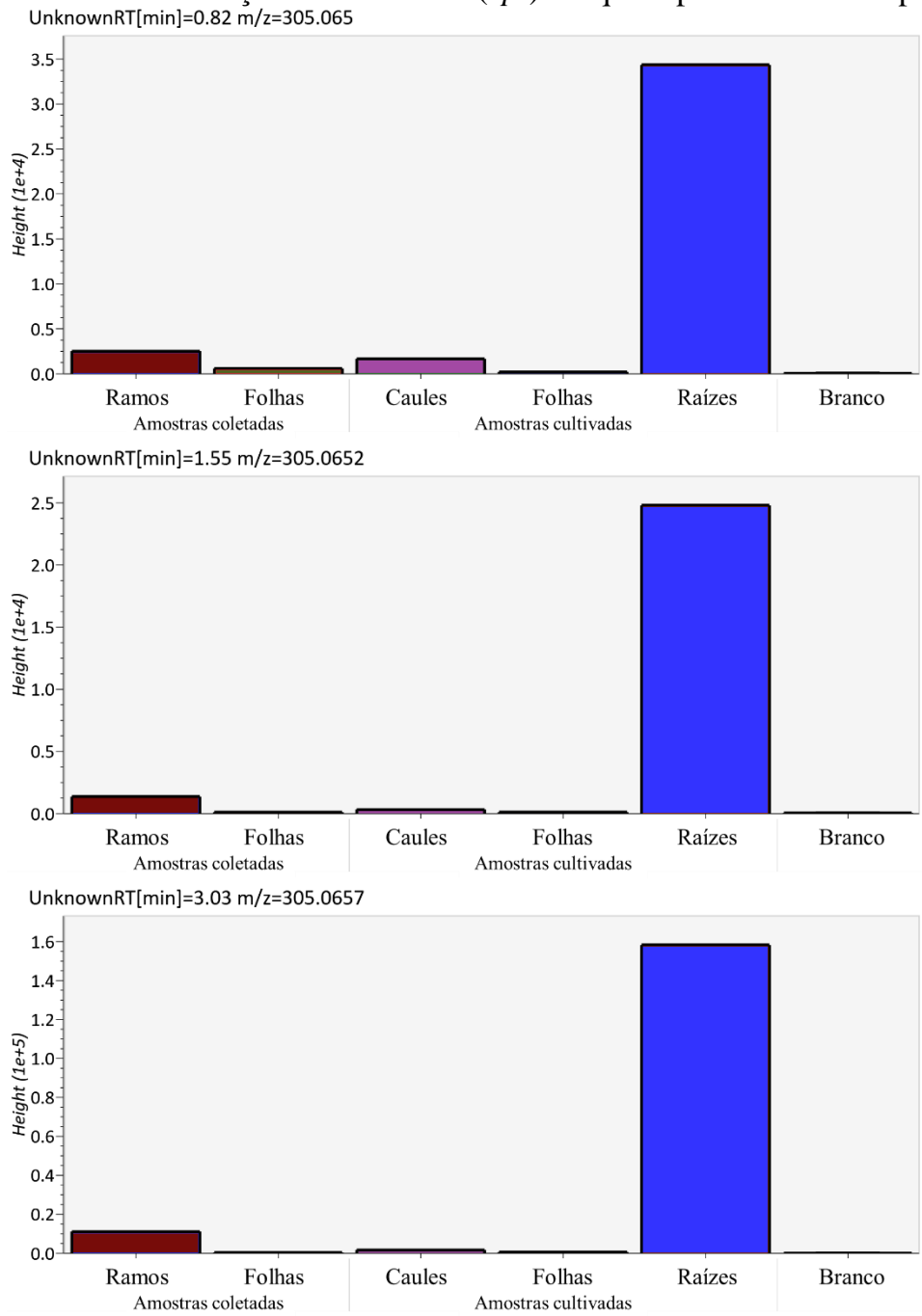


FIGURA A99 - Distribuição da taxifolina pelos tecidos da planta.

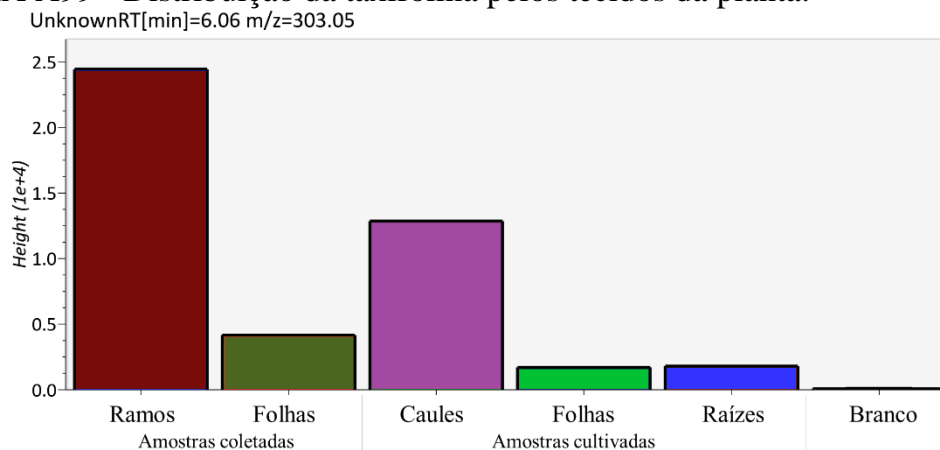


FIGURA A100 - Distribuição da diidromiricetina pelos tecidos da planta.

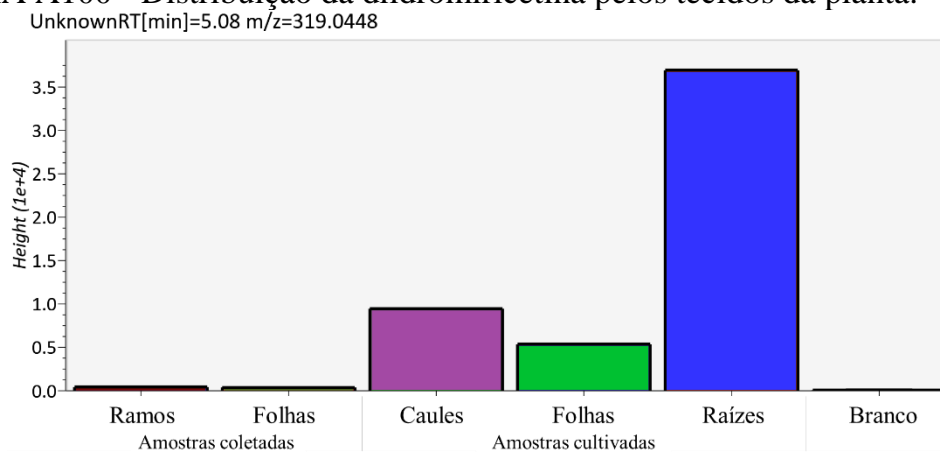


FIGURA A101 - Distribuição do derivado do ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico com formação de dupla ligação pelos tecidos da planta.

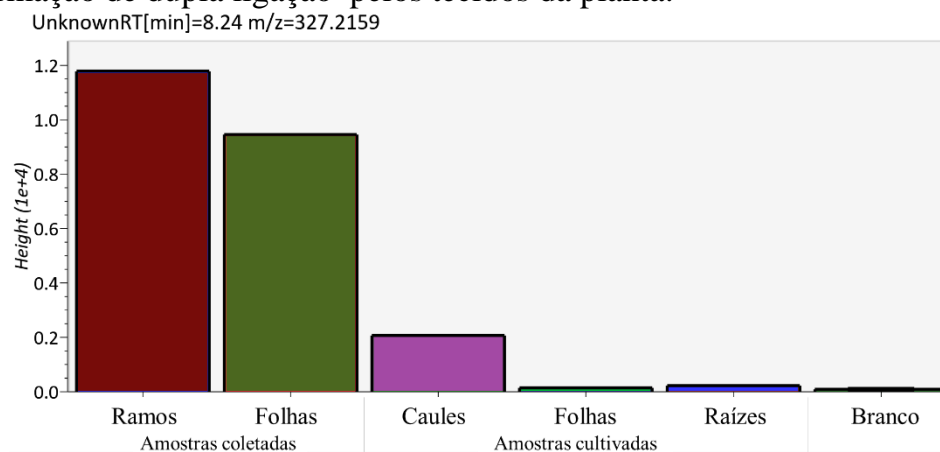


FIGURA A102 - Distribuição do ácido 9,12,13-triidroxiocetadecaenoico pelos tecidos da planta.

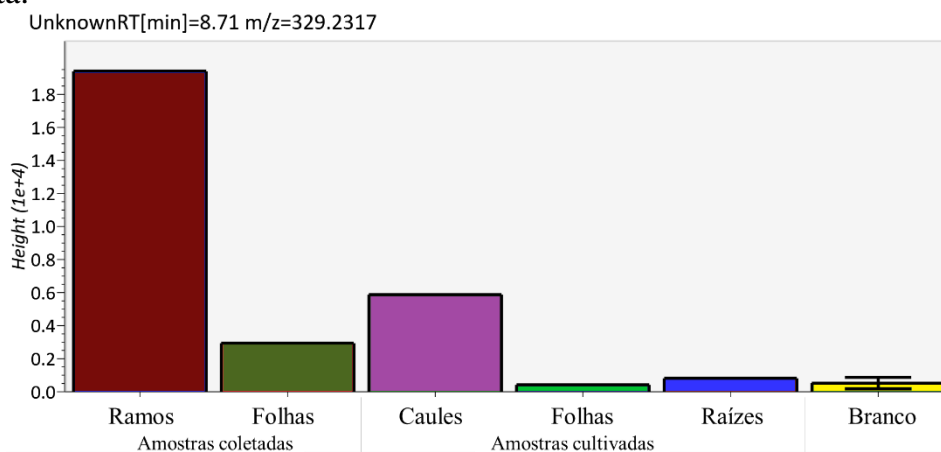


FIGURA A103 - Distribuição da chalcona eridictiol pelos tecidos da planta.

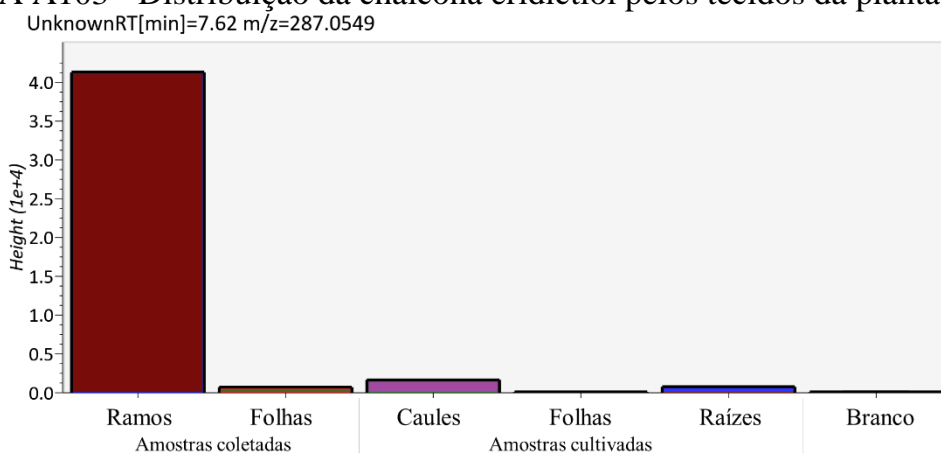


FIGURA A104 - Distribuição da urundevina I pelos tecidos da planta.

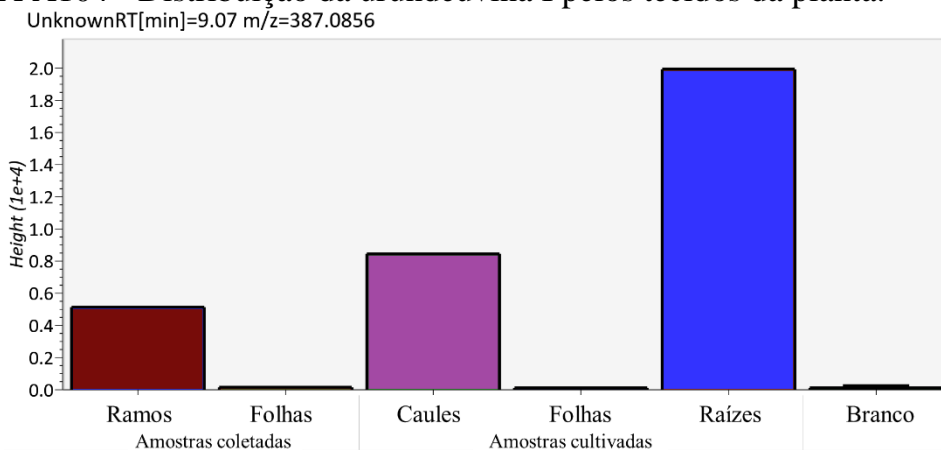


FIGURA A105 - Distribuição dos isômeros da urundevina B, D ou F pelos tecidos da planta.

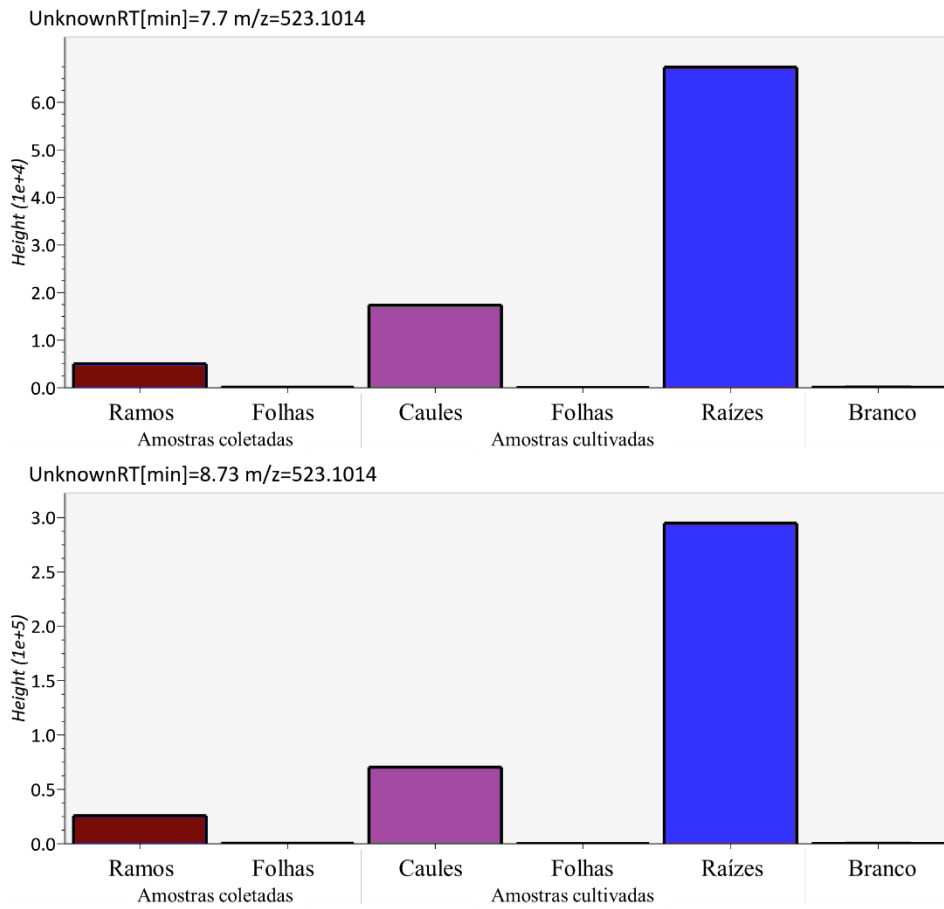


FIGURA A106 - Distribuição da urundevina E ou H pelos tecidos da planta.

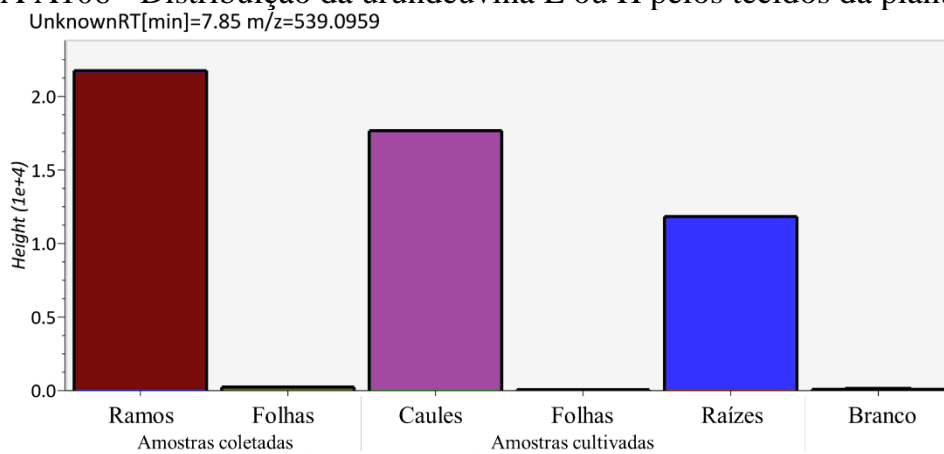


FIGURA A107 - Distribuição dos isômeros urundevina A, J ou matosina pelos tecidos da planta.

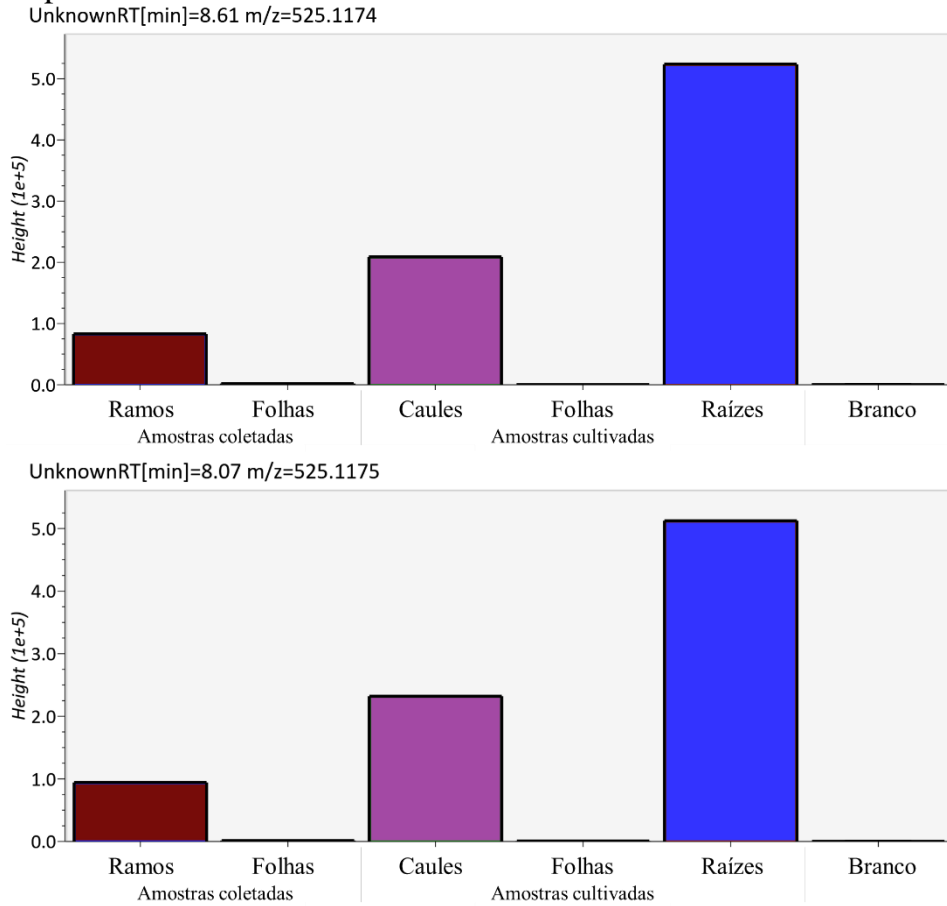


FIGURA A108 - Distribuição da urundevina C ou G pelos tecidos da planta.

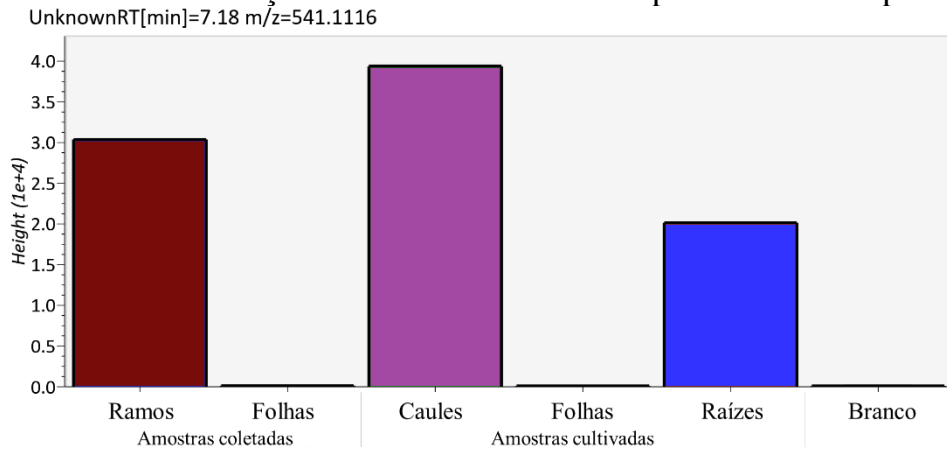


FIGURA A109 - Distribuição da urundevina A, J ou matosina hexosídeo pelos tecidos da planta.

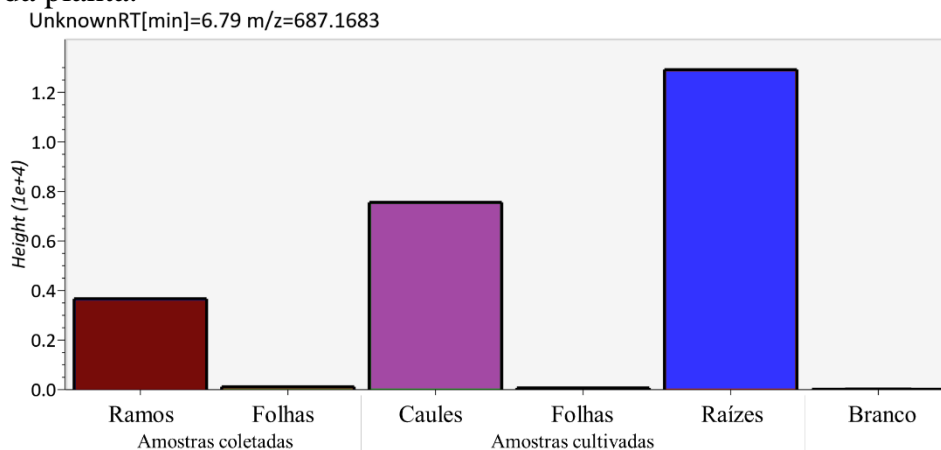


FIGURA A110 - Distribuição do ácido $\Delta^{13:1}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

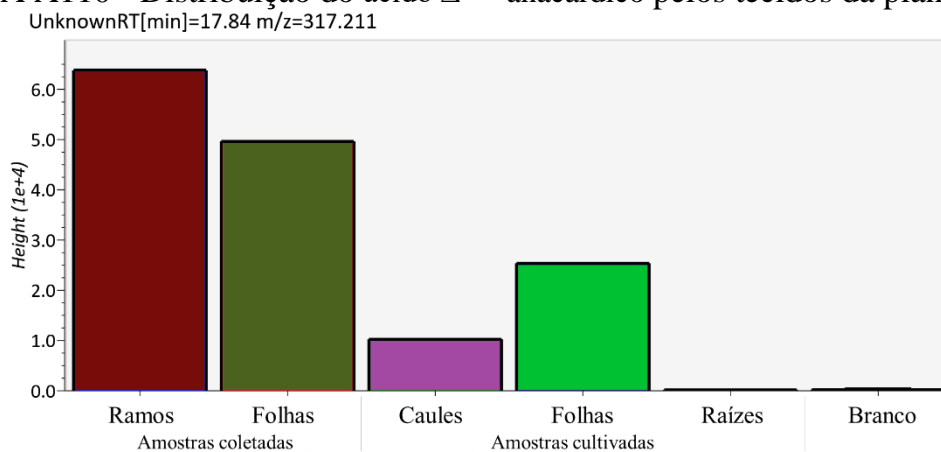


FIGURA A111 - Distribuição do ácido $\Delta^{13:0}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

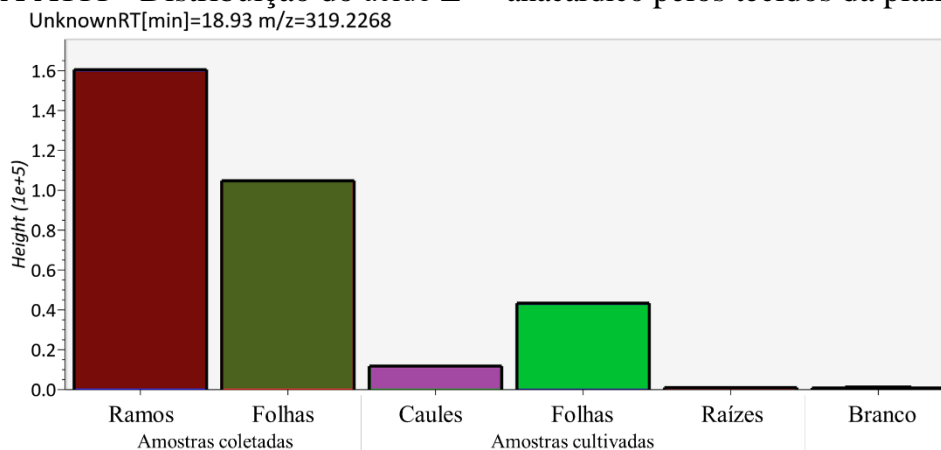


FIGURA A112 - Distribuição do ácido $\Delta^{15:2}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

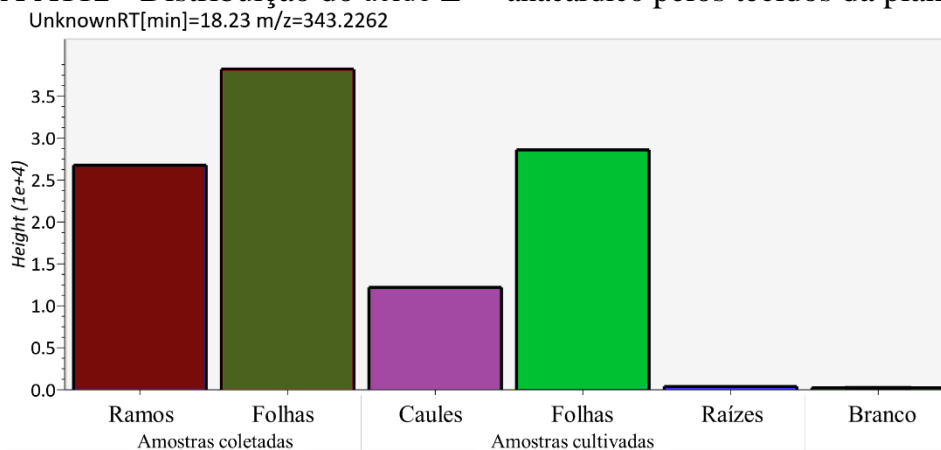


FIGURA A113 - Distribuição do ácido $\Delta^{15:1}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

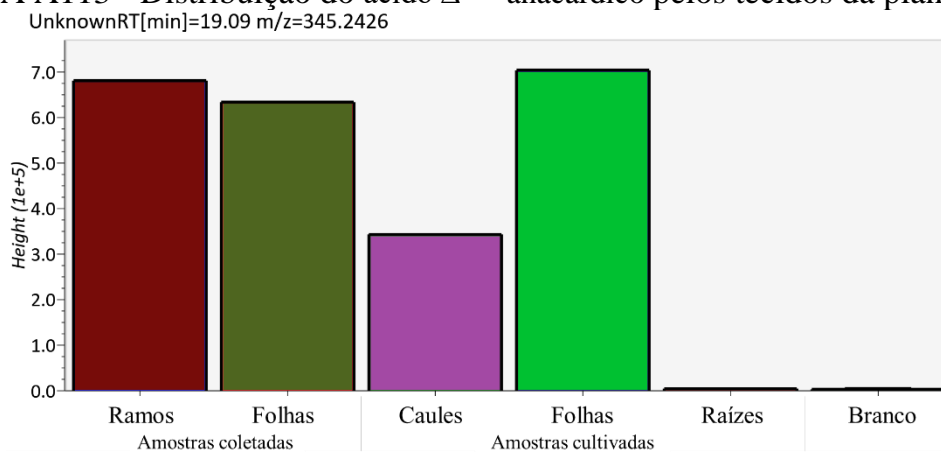


FIGURA A114 - Distribuição do ácido $\Delta^{15:0}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

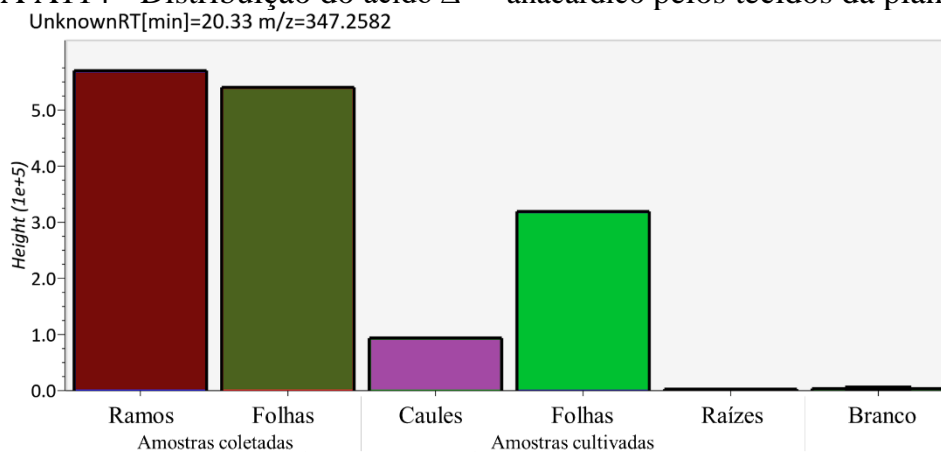


FIGURA A115 - Distribuição do ácido $\Delta^{17:3}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

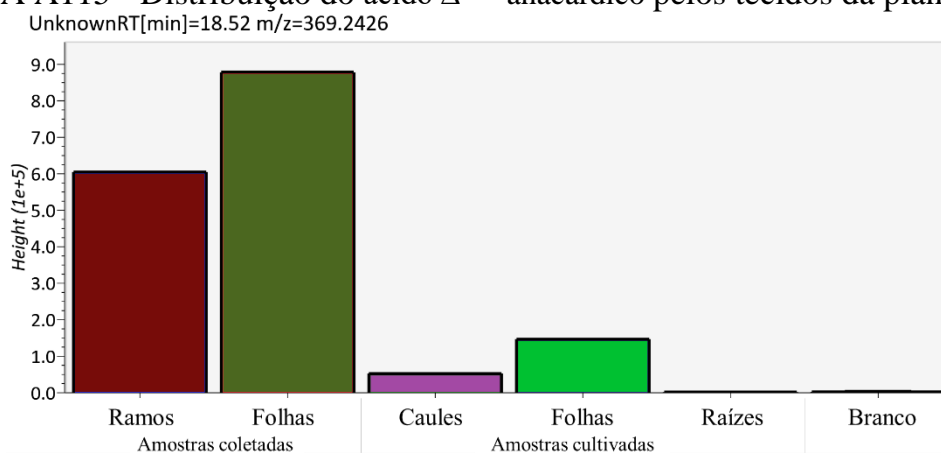


FIGURA A116 - Distribuição do ácido $\Delta^{17:2}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

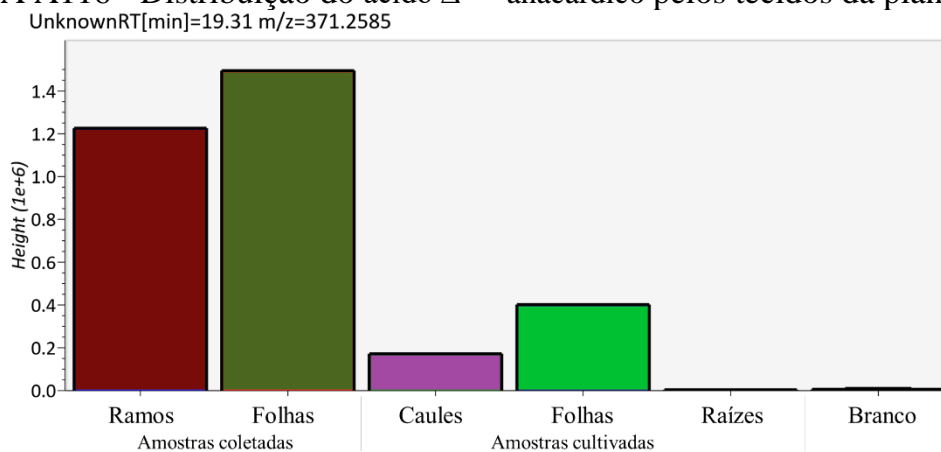


FIGURA A117 - Distribuição do ácido $\Delta^{17:1}$ anacárdico pelos tecidos da planta.

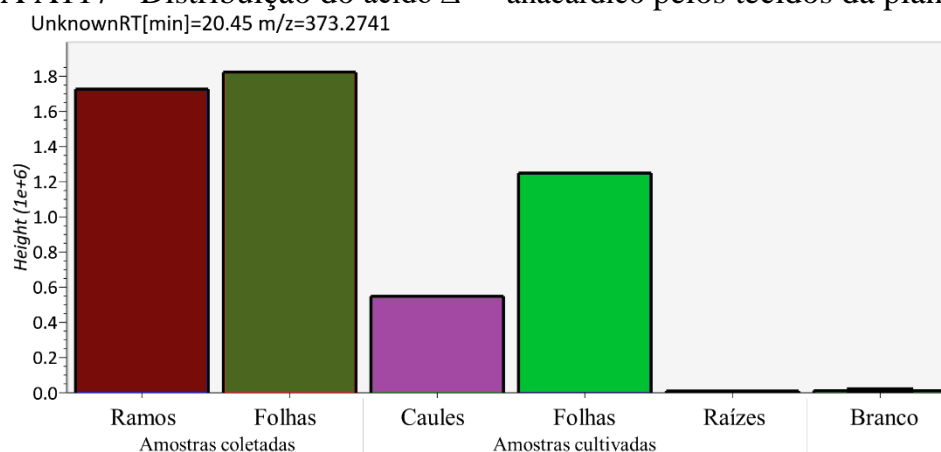


FIGURA A118 - Distribuição dos derivados da catequina pelas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.

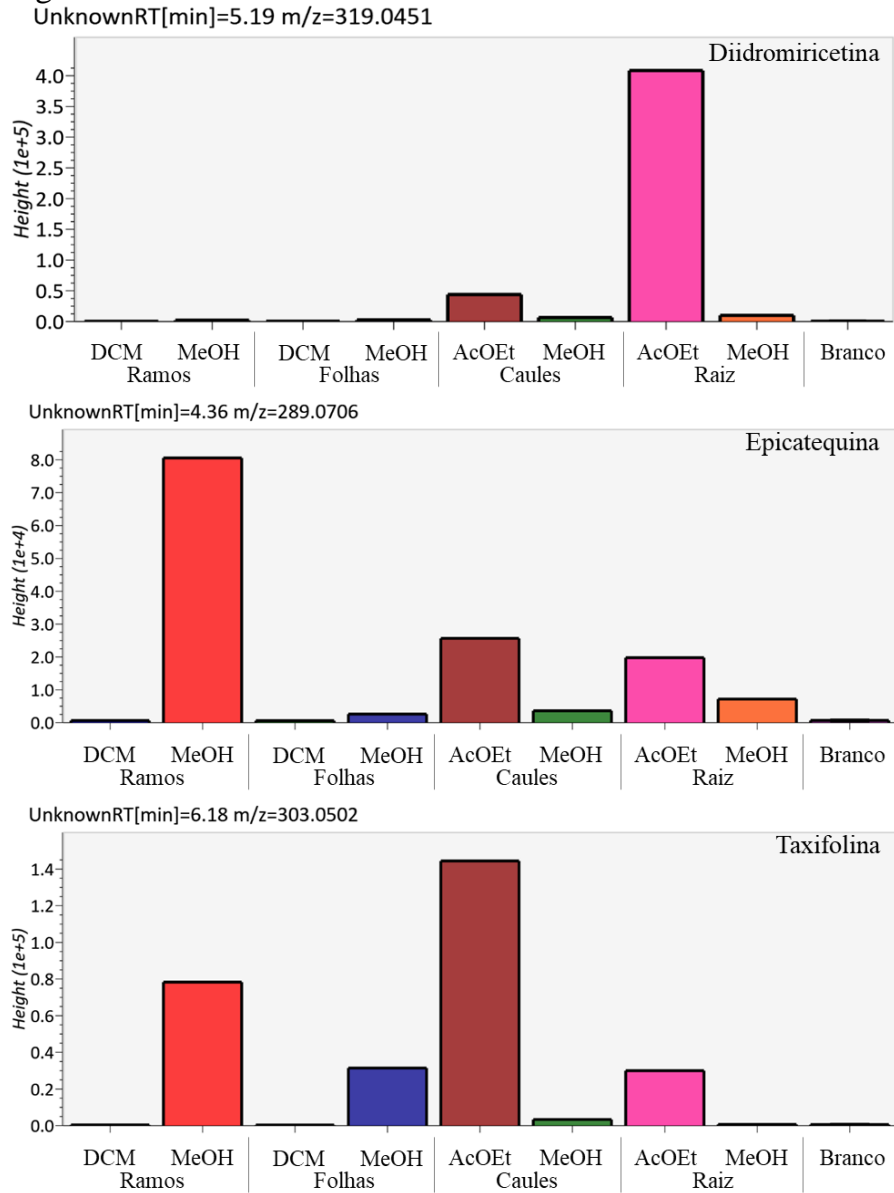


FIGURA A119 - Distribuição dos ácidos graxos pelas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.

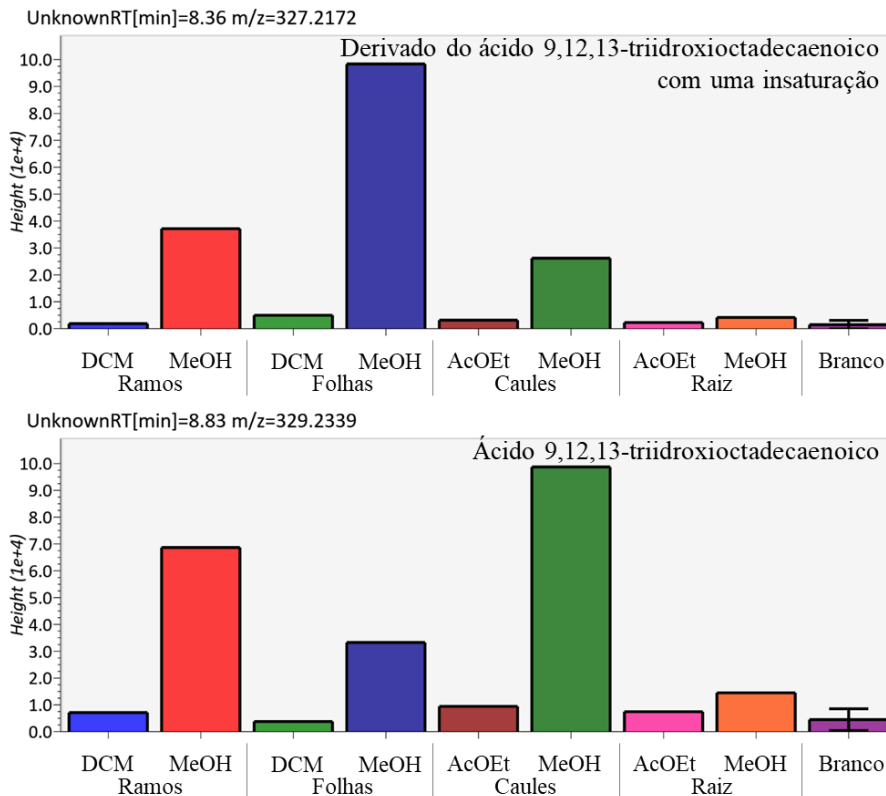


FIGURA A120 - Distribuição dos derivados do ácido gálico pelas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.

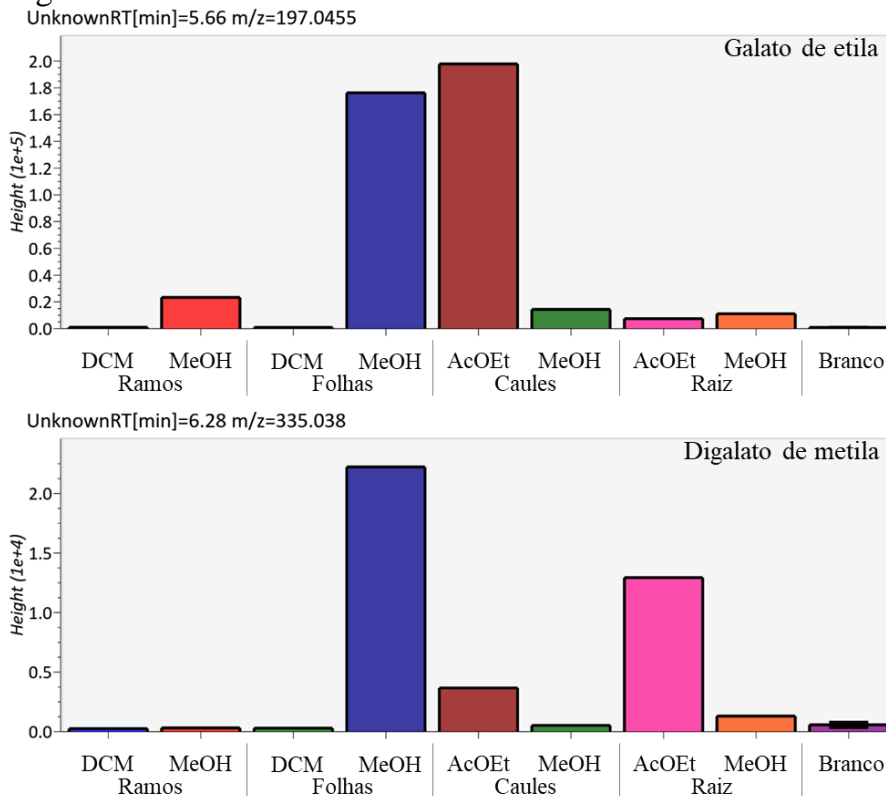
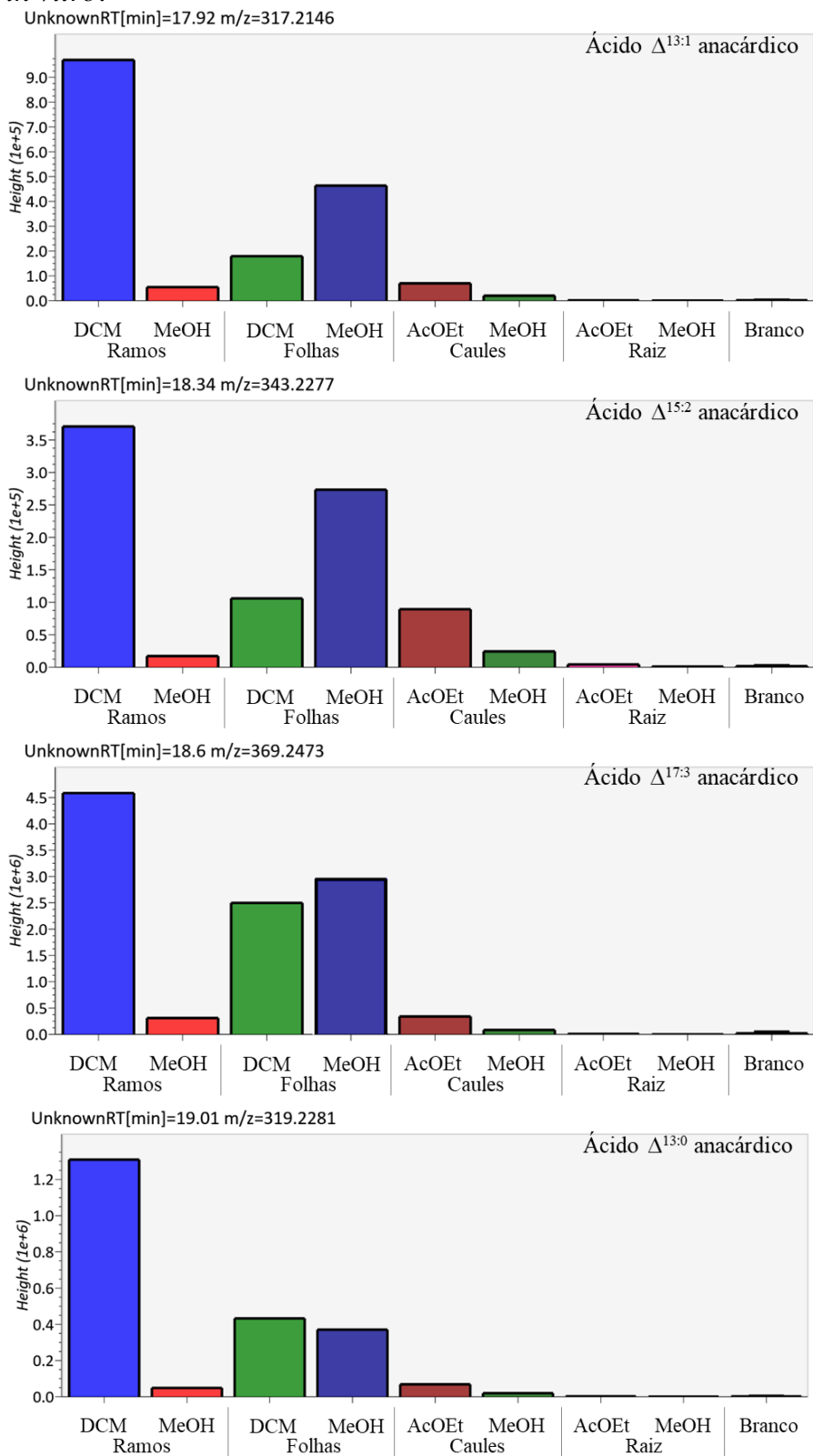


FIGURA A121 - Distribuição dos ácidos anacárdicos pelas frações ativas no ensaio biológico *in vitro*.



(continua)

FIGURA A121 - Distribuição dos ácidos anacárdicos pelas frações ativas no ensaio biológico in vitro.

(continuação)

