
CAPÍTULO 4

IDENTIFICAÇÃO POR FIA-ESI-MS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIO-HERBICIDA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *CRATAEGUS* *PINNATIFIDA* BUNGE (ESPINHEIRO-BRANCO)

Daniëlle Santos-Lima¹

Lee Jirh Yun²

Marcelo Marucci Pereira Tangerina³

Danilo Miralha Franco⁴

Luiz Fernando Rolim de Almeida⁵

Wagner Vilegas⁶

Miriam Sannomiya⁷

¹ Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia e Laboratório de Química de Produtos Naturais, Escola de Artes Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo (USP), Campus Leste. Contato: santosdanielle42@gmail.com.

² Licenciada em Ciências Naturais, Laboratório de Química de Produtos Naturais, Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH-USP), Campus Leste. Contato: michelilee91@gmail.com.

³ Pós-Doutorando, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP). Contato: marcelomptang@hotmail.com.

⁴ Pós-Doutorando, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Botucatu. Contato: francodm@uol.com.br.

⁵ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Botucatu. Contato: luiz.rolim@unesp.br.

⁶ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Litoral Paulista. Contato: vilegasw@gmail.com.

⁷ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, Campus Leste. Contato: miriamsan@usp.br.

RESUMO

O aumento da longevidade da população e a explosão demográfica têm exigido o melhoramento de técnicas agrícolas para suprir a produção de alimentos. A competição de plantas cultivadas com plantas invasoras é um fator prejudicial para a produtividade e a qualidade na agricultura. Assim, métodos alternativos, como utilização de extratos vegetais, têm sido uma tentativa racional e sustentável em detrimento de insumos sintéticos para o controle biológico de plantas e insetos indesejados. *Crataegus pinnatifida* Bunge, popularmente conhecida como “espinheiro-branco”, é uma espécie vegetal empregada principalmente por países asiáticos para fins alimentícios e medicinais, no tratamento dos sistemas cardiovascular, digestivo e endócrino, também como indicativo de metabólitos ativos. No entanto, até o momento não existem relatos de avaliação da atividade alelopática na literatura. Por isso, foram realizadas análises do extrato hidroetanólico de uma amostra comercial de frutos de *Crataegus pinnatifida* por meio de espectrometria de massas acoplada a ion-trap com interface de ionização por electrospray e inserção direta da amostra (FIA-ESI-MS). Essas análises permitiram confirmar a presença de (epi)-catequina, quercitrina, kaempferol-3-*O*-hexose e dos ácidos maleico, cafeico, ferúlico e clorogênico. Essas substâncias foram então testadas em ensaios para avaliar o potencial alelopático. Os ensaios da atividade alelopática foram realizados frente às sementes de *Sorghum bicolor* L. (sorgo), sendo que os parâmetros estudados foram porcentagem final de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento de raiz e número de raízes laterais. Os ensaios mostraram que o extrato hidroetanólico dos frutos e dos padrões comerciais dos ácidos clorogênico, cafeico, (+)-catequina e (-)-epicatequina frente às sementes de sorgo apresentaram atividade inibitória aos índices observados. O extrato demonstrou um expressivo efeito inibitório na dose de 50 mg l⁻¹, restringindo o crescimento do comprimento da raiz, bem como a presença de raízes laterais. No entanto, na dose de 100 mg l⁻¹ foi observada a diminuição desse efeito. Padrões de (-)-epicatequina e ácidos clorogênico e cafeico inibiram totalmente o crescimento das raízes e da produção de raízes laterais. O padrão de (+)-catequina apresentou ação fitotóxica em relação a esses mesmos parâmetros, mas com menor potencial quando comparada às demais substâncias testadas. Esses resultados permitem indicar a aplicação do extrato hidroetanólico dos frutos de espinheiro-santo e seus compostos avaliados como possíveis bio-herbicidas.

Palavras-chave: alelopatia, *Crataegus*, magnoliopsida, ácidos fenólicos

IDENTIFICATION BY FIA-ESI-MS AND EVALUATION OF THE BIOHERBICIDE POTENTIAL OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT AND PHENOLIC COMPOUNDS OF CRATAEGUS PINNATIFIDA BUNGE (“ESPINHEIRO-BRANCO”)

Abstract

Increased population longevity as well as demographic explosion have required an improvement in agricultural techniques for increased food production. Competition between cultivated and invasive plants is a harmful factor for productivity and quality in agriculture. Therefore, alternative methods (e. g. use of plant extracts) have been a rational and sustainable attempt detrimentally to synthetic agricultural inputs as control of unwanted plants and insects. *Crataegus pinnatifida* Bunge, popularly known as “Chinese Hawthorn”, is a plant species widely used mainly by Asian countries for food and medicinal purposes in the treatment of cardiovascular, digestive and endocrine systems, indicating the presence of active metabolites. However, there are no studies regarding its allelopathic activity. Thus, FIA-ESI-MS analyses of the hydroethanolic extract of a commercial *C. pinnatifida* fruits sample were performed. These analyses allowed the identification of (epi)-catechin, quercitrin, kaempferol-3-O-hexose and maleic, caffeic, ferulic and chlorogenic acids. Identified compounds were then tested to detect their allelopathic activity. Tests were carried out against *Sorghum bicolor* L. (sorghum) seeds, evaluating the final percentage of germination, germination speed index, root growth and number of lateral roots. The hydroethanolic extract of the fruits and the commercial standards of chlorogenic acid, caffeic acid, (+)-catechin and (-)-epicatechin showed inhibitory activity regarding the observed indexes. The extract showed a potent allelopathic effect at a concentration of 50 mg L⁻¹, inhibiting root length growth and lateral roots production. However, it is observed a decrease in activity at a dose of 100 mg L⁻¹. The compounds (-)-epicatechin, chlorogenic acid and caffeic acid totally inhibited root growth and lateral root production. The (+)-catechin showed phytotoxic action regarding these same parameters, but with a lower potential when compared to the other compounds tested. These results indicate the potential application of the hydroethanolic extract of “Chinese Hawthorn” fruits and their evaluated compounds as possible bioherbicides.

Keywords: Allelopathy, *Crataegus*, Magnoliopsida, Phenolic Acids

4.1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de herbicidas e inseticidas pode causar ao meio ambiente alterações – muitas vezes, alterações drásticas, como é o caso da mortalidade de inimigos naturais de pragas, alteração do equilíbrio do solo e contaminação das águas, além de afetar toda a cadeia alimentar. Outro aspecto relevante é o desenvolvimento da resistência desenvolvida por determinadas plantas aos herbicidas sintéticos, o que automaticamente implica na busca por novas alternativas efetivas nesse controle ou no aumento considerável da quantidade de herbicidas sintéticos empregados (GALON et al., 2016). Nesse sentido, há alguns anos tem se buscado formas racionais e sustentáveis para o aumento da produtividade dos alimentos por meio de bioinseticidas e bio-herbicidas. Estes podem ser empregados no manejo de plantas e apresentam algumas vantagens em relação aos sintéticos: são biodegradáveis, possuem baixo custo e menos toxicidade aos mamíferos, promovendo menos danos ambientais e à saúde pública. A literatura relata vários trabalhos descrevendo a ação alelopática de inúmeros extratos vegetais, com grande contribuição de compostos fenólicos para atividade inibitória.

De acordo com Chou e Waller (1980), teobromina, teofilina, paraxantina, escopoletina e os ácidos clorogênico, ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóico e vanílico apresentaram ação fitotóxica no crescimento de alface na concentração de 100 ppm. A presença de ácido benzoico inibiu o crescimento das raízes de mostarda (KAUR et al., 2005). Reigoza e Pazos-Malvido (2007) avaliaram o efeito alelopático de 21 metabólitos secundários frente à *Arabidopsis thaliana*. Foram testados os ácidos sinápico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico, clorogênico, gálico, gentísico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico e *trans*-cinâmico e outros compostos, como eucaliptol, quercetina, vanilina, siringaldeído, rutina, 2-benzoxazolinona, proto-catecualdeído, tirosol, juglona e *L*-mimosina. Dentre esses compostos, 11 mostraram ação inibitória no efeito da germinação, enquanto 17 foram capazes de inibir o crescimento. O ácido 3-*O*-[α -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopiranosil]-3 β ,24-dihidroiolean-12-eno-22-oxo-29-óico, o qual foi isolado das partes aéreas de *Trifolium argutum* Sol., apresentou inibição do crescimento das raízes de *L. sativa* em torno de 60% maior do que o Logran, um potente herbicida comercial (PEREZ et al., 2015). Pan e colaboradores (2015) estudaram o efeito da estrutura-atividade de umbeliferona, 7-hidróxi-4-metilcumarina e cumarina, que apresentaram forte efeito de inibição em alface. Esses experimentos mostraram a necessidade do grupo hidroxílico em C-7 para potencializar a atividade e que a presença de um metil na posição C-4 contribuiu para a atividade.

O gênero *Crataegus* é classificado como pertencente à classe Magnoliopsida. Existem mais de mil espécies de *Crataegus*, distribuídos principalmente na Ásia, na Europa e na América do Norte (GUO, JIAO, 1995). Espécies de *Crataegus* são popularmente conhecidas como “espinheiro-alvar”, e “espinheiro-branco”, cujos frutos, sementes e folhas são empregadas na Ásia e na Europa como alimento e medicamento. De acordo com os estudos químicos de Wu e colaboradores (2014) e Jurikova e colaboradores (2012), os extratos das folhas, flores, frutos e sementes de *C. pinnatifida* são ricos em flavonoides, triterpenoides, esteroides, monoterpênos, sesquiterpênos, lignanas, ácido hidroxicinâmico, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados, entre outros.

Os componentes dos extratos de *C. pinnatifida* têm grandes efeitos farmacológicos para os sistemas cardiovascular, digestivo e endócrino e apresentam baixa toxicidade. O extrato dos frutos de *C. pinnatifida* junto com o de *Salvia miltiorrhizae* apresentaram compostos com efeito antiaterosclerótico, conforme descrito por Zhang e colaboradores (2013). De acordo com Chang e colaboradores (2013) o extrato metanólico dos frutos de *C. pinnatifida* tem ação antioxidante e neuroprotetiva, porém ensaios *in vivo* devem ser realizados para a confirmação e compreensão dessas atividades. A inibição dos extratos dos frutos e dos flavonoides presentes em *C. pinnatifida* no crescimento de células tumorais Hep-2 indicam que seus efeitos estão relacionados com o sinal da transdução e na síntese do DNA das células tumorais (ZHANG et al., 2004).

Apesar do intenso consumo na medicina chinesa popular e de diversas atividades biológicas já comprovadas, não existem relatos na literatura da avaliação da sua atividade alelopática. Dessa forma, o presente trabalho visa estudar o extrato hidroetanólico dos frutos de *C. pinnatifida* por espectrometria de massas e avaliar o seu potencial bio-herbicida.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e obtenção do extrato

A amostra comercial de frutos secos de *C. pinnatifida* Bunge usados neste trabalho tem origem chinesa. Os frutos (459 g) foram inicialmente moídos e submetidos ao processo de maceração, tendo sido empregada como solvente extrator uma mistura de etanol/água na proporção 7:3 (v/v). A mistura foi mantida em repouso por 7 dias, e em seguida foi realizada a filtração. Esse processo de extração foi repetido por duas vezes. O solvente foi eliminado utilizando um rotaevaporador em pressão reduzida. O rendimento do extrato seco obtido foi de 59,2%.

4.2.1.1 Análise por espectrometria de massas

Para análise por espectrometria de massas (FIA-ESI-MS), utilizou-se 25 mg do extrato seco da amostra de *C. pinnatifida*, que foi submetido a um pré-tratamento em cartucho C18 usando as seguintes fases móveis: água, metanol/água 9:1 (v/v) e metanol 100%, consecutivamente. A fração metanol/água 9:1 foi analisada por injeção direta em um espectrômetro de massas Thermo Scientific®, modelo LTQ XL, equipado com fonte de ionização *electrospray* e analisador ion-trap linear. Foram monitorados íons específicos já descritos na literatura para o gênero *Crataegus*, os quais foram fragmentados para confirmação das estruturas das substâncias detectadas (CHANG et al., 2013).

As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 e MS^n) foram realizadas em um analisador *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS^n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, *sheath gas* (N_2) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LTQ XL.

O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados, com energia de colisão entre 25% e 30% da energia total do instrumento.

Os programas LTQ Tune (Thermo Scientific®) e *Xcalibur* (Thermo Scientific®) foram utilizados durante a aquisição e o processamento dos dados, respectivamente.

4.2.2 Ensaios de alelopatia

Bioensaios foram realizados utilizando o extrato hidroetanólico dos frutos de *C. pinnatifida* e de padrões comerciais (Sigma) de (+)-catequina, (-)-epicatequina e dos ácidos clorogênico e cafeico. Foram preparadas soluções estoque para o extrato e fração avaliada e diluídas para aplicação nos testes nas seguintes concentrações: 30, 50 e 100 mg l⁻¹. Os padrões comerciais foram diluídos na concentração de 100 µM. As soluções foram aplicadas em sementes de sorgo e levadas para germinação em câmara de germinação de sementes (Eletrolab, modelo EL202/2) com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h/12h (claro/

escuro). As sementes foram previamente tratadas contra contaminação em solução de 2% hipoclorito de sódio por dois minutos e, posteriormente, lavadas em água destilada. Os tratamentos foram realizados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com 10 sementes de sorgo e 10 ml de solução, e um controle foi realizado utilizando apenas água deionizada. Os tratamentos foram realizados em triplicatas, sendo cada placa de Petri uma repetição. O número de sementes germinadas foi contabilizado no período de 24, 48, 72, 96 e 120 horas após aplicação dos tratamentos. Ao término das 120 horas, os seguintes parâmetros foram analisados: porcentagem final de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento de raiz e número de raízes laterais. O IVG foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IVG = \left(\frac{G1}{N1} \right) + \left(\frac{G2}{N2} \right) + \left(\frac{G3}{N3} \right) + \dots + \left(\frac{Gn}{Nn} \right)$$

Onde G1, G2, G3, ..., Gn = número de sementes computadas no primeiro, segundo, terceiro dias de contagem até o ultimo dia de contagem; N1, N2, N3, ..., Nn = número de dias da semeadura até a primeira, segunda, terceira e última contagens.

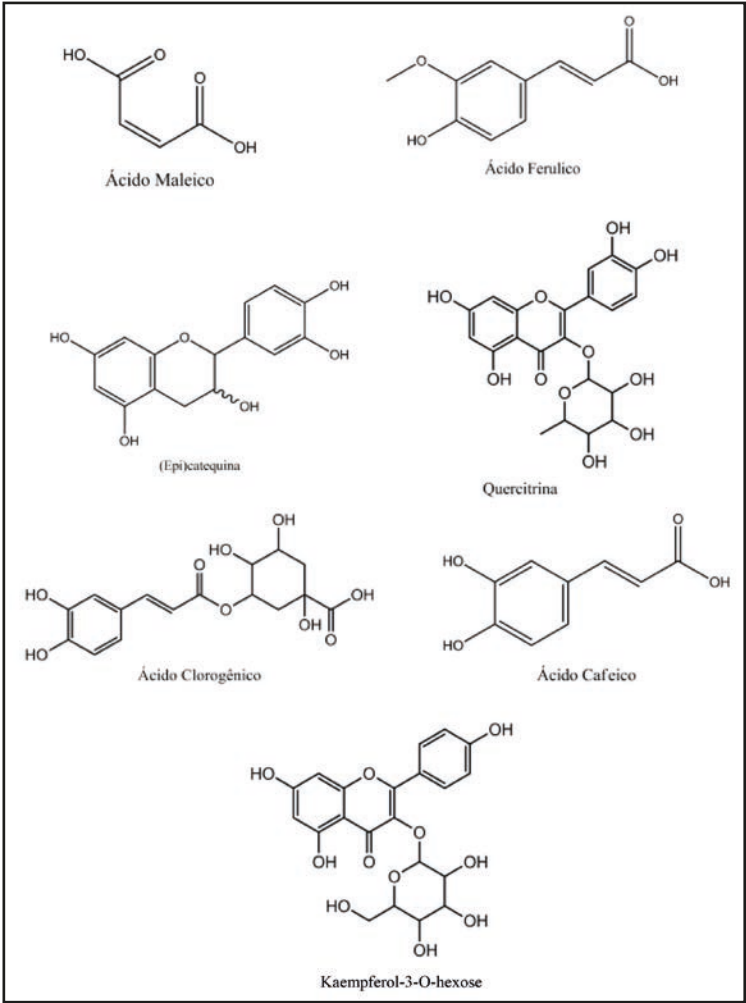
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a literatura relata inúmeros estudos químicos envolvendo os diferentes órgãos vegetais de *C. pinnatifida*, optou-se por selecionar os possíveis metabólitos secundários que pudessem atuar como biomarcadores nos frutos dessa espécie. De acordo com Lou et al. (2014), os frutos de *C. pinnatifida* contêm em sua constituição triterpenos, flavanonas e ácidos orgânicos. Shao et al. (2017) identificaram por UPLC-MS no extrato dos frutos dessa planta 6 ácidos fenólicos, 9 flavonoides e 4 ácidos orgânicos. Ainda nos frutos foram identificadas pectinas constituídas de ramnose, glicose, galactose e ácido glucurônico (WANG et al., 2007). Assim, por meio de um criterioso levantamento bibliográfico, utilizando a base de dados *SciFinder*, foram selecionados os compostos cujos padrões comerciais estavam disponíveis em nosso laboratório. Dessa forma, foram selecionados os ácidos gálico, cafeico, ferúlico, clorogênico e maleico, além de galato de metila, rutina, quercetina, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercitrina. A análise por FIA-ESI-MS do extrato de *C. pinnatifida* revelou a presença de 7 substâncias identificadas (Tabela 4.1 e Figura 4.1).

Tabela 4.1 – Metabólitos secundários identificados por FIA-ESI-MS nos frutos de *C. pinnatifida*

Nº	<i>m/z</i>	MS ²	Substâncias
1	115	97; 71	Ácido maleico
2	179	151; 135	Ácido cafeico
3	193	149; 136	Ácido ferúlico
4	353	191	Ácido clorogênico
5	289	245; 205; 137	(epi)-catequina
6	447	285	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexose
7	447	301	Quercitrina

Figura 4.1 – Substâncias identificadas por FIA-ESI-MS presentes nos extratos dos frutos de *Crataegus pinnatifida*.



Os íons referentes a cada um dos padrões mencionados foram selecionados para fragmentação MS², de modo a identificar a presença ou ausência destes nos extratos estudados. A fragmentação do íon [M-H]⁻ de m/z 115 forneceu os íons-produto de m/z 97 e m/z 71, indicando a presença de ácido maleico (CARTWRIGHT et al., 2005).

A detecção do ácido cafeico se deu por meio da fragmentação do íon [M-H]⁻ m/z 179 e da presença dos íons-produto de m/z 151, m/z 135 e m/z 107 (FANG et al., 2002).

Por outro lado, a presença do íon [M-H]⁻ de m/z 193 no espectro de massas e sua fragmentação gerando os íons-produto de m/z 165 e m/z 149 indicaram a presença do ácido ferúlico (FANG et al., 2002).

A confirmação da presença de (epi)catequina se deu por meio da fragmentação do íon [M-H]⁻ de m/z 289 e dos íons-produto gerados de m/z 245, m/z 205 e m/z 147. Não é possível diferenciar os isômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina por espectrometria de massas (SLIMEN et al., 2017).

O ácido clorogênico pôde ser detectado por meio da fragmentação do íon [M-H]⁻ de m/z 353, o qual forneceu o íon-produto de m/z 191 (BOUHAFSOUN et al., 2018).

A fragmentação do íon [M-H]⁻ de m/z 447 forneceu os íons-produto de m/z 301 e m/z 285, os quais indicam a presença dos isômeros quercitrina e kaempferol-3-*O*-hexose (LIU et al., 2014; KARIOTI et al., 2011). A comparação do padrão de fragmentação dos padrões comerciais junto com as fragmentações de alguns picos presentes no espectro de massas dos frutos de *C. pinnatifida* permitiu confirmar por comparação a presença de 7 compostos, os quais já haviam sido descritos anteriormente por Wu et al. (2014) e Jurikova et al. (2012).

4.3.1 Avaliação da atividade alelopática

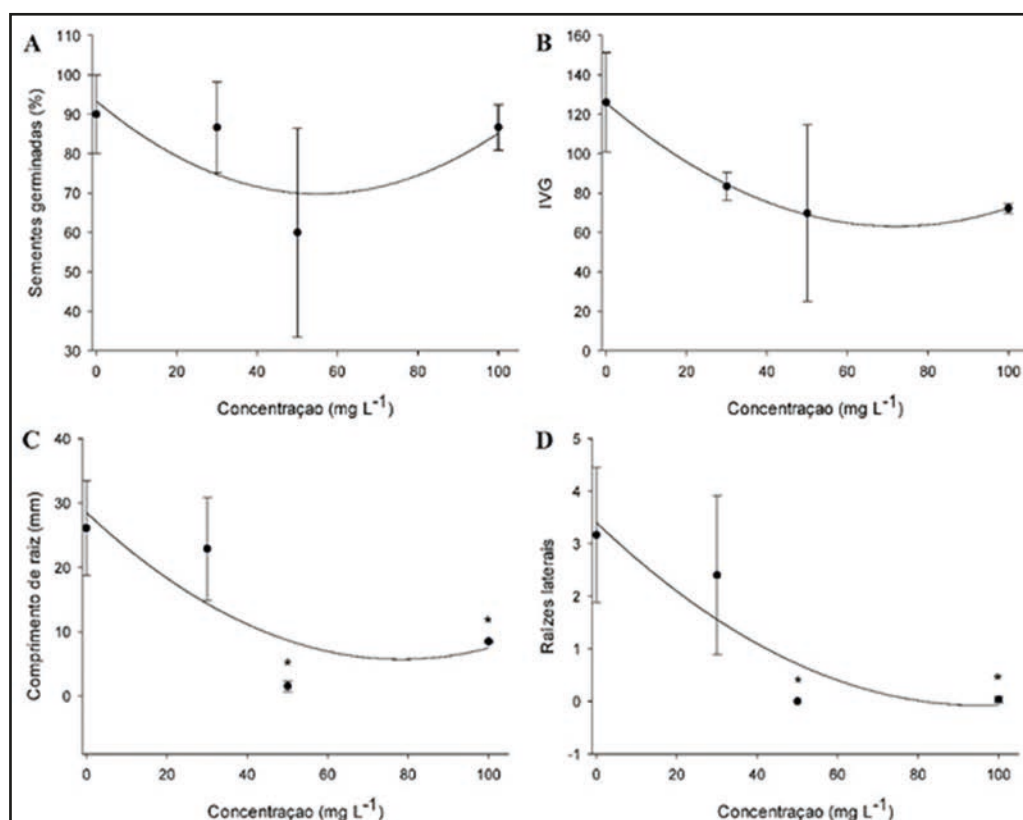
Apesar do uso popular intensamente difundido do chá dos frutos de *C. pinnatifida* e das diversas atividades biológicas atribuídas aos flavonoides e ácidos fenólicos presentes nos extratos dessa planta, não há estudos envolvendo a avaliação da ação fitotóxica destes. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis, como *Cucumis sativus* L. (pepino), *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Sorghum bicolor* L. (sorgo), cujas espécies são consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática (ALMEIDA et al., 2008; FRANCO et al., 2015).

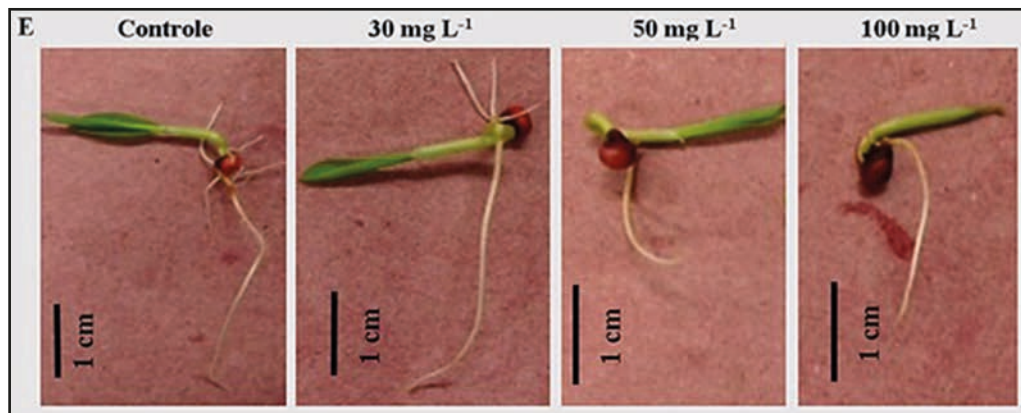
Considerando-se os estudos aqui realizados, que indicaram a presença de metabólitos secundários nos extratos de *C. pinnatifida*, com potencial para inúmeras atividades biológicas e seu uso popular e comercial na China, empregaram-se o extrato de *C. pinnatifida* e padrões comerciais dos ácidos clorogênico, cafeico, (+)-catequina e (-)-epicatequina para a avaliação da atividade alelopática em sementes de sorgo.

Os resultados dos ensaios de alelopatia empregando o extrato de *C. pinnatifida* (Figura 4.2) mostraram que a porcentagem final de sementes germinadas não sofreu alterações significativas pela aplicação das soluções nas diferentes concentrações (A). Entretanto, em todas as doses testadas notou-se inibição no IVG (B). Na dose de 30 mg l⁻¹, o extrato não apresentou ação fitotóxica. Na dose de 50 mg l⁻¹, observou-se inibição do crescimento de raiz e do desenvolvimento de raízes laterais.

Figura 4.2 – Resultados dos ensaios de alelopatia para o extrato de *C. pinnatifida*.

A: germinação de sementes; B: índice de velocidade de germinação (IVG);
C: crescimento de raiz; D: raízes laterais; e E: fotos da avaliação do efeito do extrato no crescimento de raízes de *Sorghum bicolor* L.





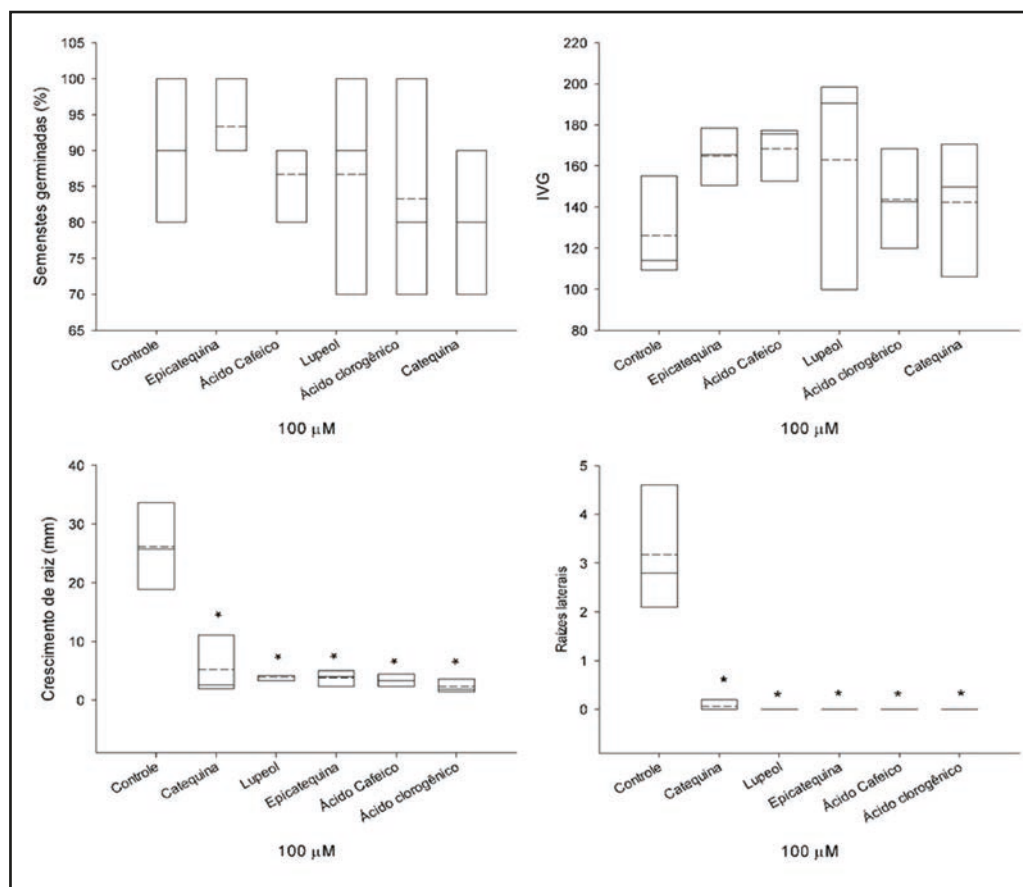
No caso da avaliação do efeito alelopático dos padrões comerciais de (-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido cafeico e ácido clorogênico frente às sementes de sorgo (Figura 4.3), observa-se que todos os metabólitos são ativos. Os ácidos clorogênico e cafeico e a (+)-catequina inibiram efetivamente a germinação das sementes do sorgo quando comparadas ao controle. A (-)-epicatequina e ácidos clorogênico e cafeico inibiram totalmente o crescimento das raízes e a produção de raízes laterais na concentração de 100 μM . Olsen et al. (1981) relataram que tomates (*Solanum lycopersicum*) com deficiência em ferro secretam ácido cafeico como aleloquímico para melhorar a liberação desse íon de fontes insolúveis. O ácido clorogênico inibiu a germinação de sementes de *Mimosa pudica* (37,1%) e de *Cassia tora* (36,4%), enquanto a atropina inibiu em cerca de 72% (SANTOS et al., 2007).

A (+)-catequina apresentou ação fitotóxica com relação a esses mesmos parâmetros, mas com um potencial inferior quando comparada aos demais padrões testados e ao controle (Figura 4.3). De acordo com a literatura, há um extensivo número de trabalhos que avaliam a estabilidade e a viabilidade da catequina como agente alelopático. Blair et al. (2005) mostraram a instabilidade desse composto em meio aquoso à temperatura ambiente. Estudos posteriores indicaram a presença do sistema catecólico da molécula (FURUBAYASHI et al., 2007). Nesse sentido, apesar de apresentar a atividade fitotóxica visualizada frente às sementes de sorgo, esse composto isolado não se apresenta como um agente alelopático viável. No entanto, os dados de fitotoxicidade apresentados por esses compostos frente às sementes de sorgo foram bastante significativos (Figura 4.3).

O crescimento de raiz e a presença de raízes laterais mostram-se mais sensíveis ao efeito dos aleloquímicos quando comparado com o processo de germinação

e o índice de velocidade de germinação. A ação alelopática do extrato de *C. pinnatifida* possivelmente está associada à presença de ácidos fenólicos, quercitrina e da (epi)-catequina. Essa inibição do desenvolvimento do sistema radicular leva à redução na pressão competitiva da planta, favorecendo as espécies vizinhas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; PRATES et al., 2000). Esses dados mostram a potencial aplicação desse extrato vegetal e desses compostos como bio-herbicidas.

Figura 4.3 – Resultados dos ensaios de alelopatia para os padrões comerciais de (-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido cafeico e ácido clorogênico frente às sementes de sorgo.



4.4 CONCLUSÕES

A análise do extrato de uma amostra comercial de frutos de *C. pinnatifida* permitiu identificar a presença de 7 compostos, dentre eles (epi)-catequina, quercitrina, kaempferol-3-*O*-hexose e os ácidos maleico, cafeico, ferúlico e clorogênico.

A avaliação da atividade alelopática do extrato e dos padrões comerciais dos ácidos clorogênico, cafeico, (+)-catequina e (-)-epicatequina frente às sementes de sorgo mostrou que todos foram ativos em relação ao controle nos 4 parâmetros avaliados. Foi observado um considerável efeito alelopático do extrato na dose de 50 mg l⁻¹ com inibição do crescimento do comprimento da raiz, bem como de raízes laterais. No entanto, na dose de 100 mg l⁻¹ a amostra passa a ser menos efetiva.

No caso dos padrões comerciais testados, todos foram ativos, principalmente no que diz respeito à inibição do crescimento da raiz e das raízes laterais. A (-)-epicatequina e os ácidos clorogênico e cafeico inibiram totalmente o crescimento das raízes e a produção de raízes laterais. A (+)-catequina apresentou ação fitotóxica com relação a esses mesmos parâmetros, mas com um potencial inferior quando comparada aos demais padrões testados e ao controle. Esses resultados indicam a potencial aplicação desse extrato vegetal dos frutos de *C. pinnatifida* e também desses compostos como bio-herbicidas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. F. R.; et al. *In vitro* allelopathic potential of *Leonurus sibiricus* L. leaves. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, p. 39-48, 2008.
- BLAIR, A. C. et al. New techniques and findings in the study of a candidate allelochemical implicated in invasion success. **Ecology Letters**, v. 8, p.1039-1047, 2005.
- BLANCO, H. G. A importância do controle das ervas daninhas na cultura do milho. **Agroquímica**, v.18, p.14-18, 1982.
- BOUHAFSOUN, A. et al. Simultaneous quantification of phenolic acids and flavonoids in *Chamaerops humilis* L. using LC-ESI-MS/MS. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 242-247, 2018.
- CARALT, S. et al. Sources of Secondary Metabolite Variation in (*Porifera*: Demospongiae): The Importance of Having Good Neighbors. **Marine Drugs**, v. 11, n. 2, p. 489-503, 2013.

CARTWRIGHT, A. J. et al. Derivatisation of carboxylic acid groups in pharmaceuticals for enhanced detection using liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19 n. 8, p. 1058-1062, 2005.

CHANG, C. L. et al. Phytochemical composition, antioxidant activity and neuro-protective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. *South African Journal of Botany*, v. 88, p. 432-437, 2013.

CHAVES, T. P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 847-853, 2013.

CHOU, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 609-636, 1999.

CHOU, C.-H.; WALLER, G. R. Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 3, p. 643-54, 1980.

CORREA, A. G. **Química Verde: fundamentos e aplicações**. v. 5. São Carlos: EdUFSCar, 2009. 172 p.

CUNHA A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. In: Cunha, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

EL AYEB-ZAKHAMA, A. et al. Chemical Composition and Phytotoxic Effects of Essential Oils Obtained from *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle Cultivated in Tunisia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 8, p. 1216-1227, 2014.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 50, n. 12, p. 3579-3585, 2002.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da eco-fisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FRANCO, D. M. et al. Flavonoids modify root growth and modulate expression of *SHORT-ROOT* and *HD-ZIP III*. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 89-95, 2015.

FURUBAYASHI, A.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Role of catechol structure in the adsorption and transformation reactions of L-Dopa in soils. **Journal Chemistry Ecology**, v. 33, p. 239-250, 2007.

GALON, L. et al. Biological weed management – A short review 1 *Manejo*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUO, T.; JIAO, P. Hawthorn (*Crataegus*) Resources in China. **Hortscience**, v. 30, n. 6, p. 1132-1134, 1995.

HATZIOS, K. K. Biotechnology applications in weed management: now and in the future. **Advances in Agronomy**, v. 41, n. 2, p. 325-375, 1987.

JURIKOVA, T. et al. Polyphenolic Profile and Biological Activity of Chinese Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) Fruits. **Molecule**, v. 17, n. 12, p. 14490-14509, 2012.

KARIOTI, A. et al. Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 4, p. 1715-1723. 2011.

KAUR, H.; INDERJIT; KAUSHIK, S. Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 77-81, 2005.

KIRAKOSYAN, A. et al. Quantification of major isoflavonoids and L-canavanine in several organs of kudzu vine (*Pueraria montana*) and in starch samples derived from kudzu roots. **Plant Science**, v. 164, p. 883-888, 2003.

LI, Z. H. et al. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LIU, P. **Composition of hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits and leaves and emblic leafflower (*Phyllanthus emblica*) fruits**. 2012. Tese (PhD) – Department of Biochemistry and Food Chemistry and ^[L]_[SEP]Functional Foods Forum, University of Turku, Turku, 2012.

LIU, Y. R. et al. ABTS+ scavenging potency of selected flavonols from *Hypericum perforatum* L. by HPLC-ESI/MS QQQ: Reaction observation, adduct characterization and scavenging activity determination, **Food Research International**, v. 58, p. 47-58, 2014.

LOU, L.; LUO, J.; GAO, Y. Overview of chemical composition and pharmacological action of *Crataegus pinnatifida* Bunge. **Zhongguo Yaoye**, v. 23, n. 3, p. 92-94, 2014.

OLSEN, R. A. et al. Chemical aspects of the Fe stress response mechanism in tomatoes. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 905-921, 1981.

PAN, L. et al. Phytotoxicity of umbelliferone and its analogs: Structure-activity relationships and action mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 272-277, 2015.

PÉREZ, A. J. et al. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Trifolium argutum* Sol. and their phytotoxic evaluation. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 165-170, 2015.

PRATES, H. T. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic Effects of 21 Plant Secondary Metabolites on *Arabidopsis thaliana* Germination and Root Growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 7, p. 1456-1466, 2007.

SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; REZENDE, M. O. O. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. **Eclética Química**, v. 32, n. 4, p. 13-18, 2007.

SARTOR, L. R. et al. Alelopatia de acículas de pínus na germinação e desenvolvimento de plântulas de milho, picão preto e alface. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 470-480, 2015.

SHAO, F. et al. Evaluation of Hypolipidemic and Antioxidant Effects in Phenolrich Fraction of *Crataegus pinnatifida* Fruit in Hyperlipidemia Rats and Identification of Chemical Composition by Ultra-performance Liquid Chromatography Coupled with Quadropole Time-of-flight Mass Spectrometry. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 52, p. 725-731, 2017.

SLIMEN, I. B. et al. LC-MS Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Betanin from Spineless *Opuntia ficus-indica* Fruits. **Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 17-28, 2017.

SONI, U.; BRAR, S.; GAUTTAM, K. V. Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 9, p. 3654-3662, 2015.

WANG, N. et al. Extraction and food chemical characterizations of haw pectins. **Shipin Gongye Keji**, v. 28, n. 11, p. 87-89, 2007.

WU, J. et al. *Crataegus pinnatifida*: Chemical Constituents, Pharmacology, and Potential Applications. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1685-1712, 2014.

ZHANG, J. Y. et al. Experimental study on anti-atherosclerotic effect of compatibility of active components of danshen and shanzha. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 38, n. 12, p. 1987-1991, 2013.

ZHANG, Y. et al. Isolation and purification of total flavonoids from *Crataegus pinnatifida* and its antitumor activity. *Zhongcaoyao*, v. 35, n. 7, p. 787-789, 2004.