



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Botânica

Potencial fitotóxico em tapetes de musgos da Antártica

Discente: Letícia di Carvalho Melo e Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sarah Christina Caldas Oliveira

Brasília, DF

2025



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Botânica

Potencial fitotóxico em tapetes de musgos da Antártica

Letícia di Carvalho Melo e Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sarah Christina Caldas Oliveira

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília, DF

2025

“Quem sonha de dia tem
consciência de muitas coisas que
escapam a quem sonha só de noite.”

Edgar Allan Poe

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À minha orientadora, **Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira**, pela confiança, paciência, compreensão e incentivo durante esta jornada exaustiva.

Aos professores que fizeram parte desta trajetória, dentro e fora do laboratório, e a todos que compartilharam conhecimentos, dúvidas e descobertas.

Aos colegas de laboratório que dividiram comigo o espaço de pesquisa.

À Universidade de Brasília pelo apoio financeiro concedido por meio do Edital DPG n° 0003/2024 – Auxílio Financeiro a Estudantes de Pós-Graduação Stricto Sensu, que contribuiu para a realização desta pesquisa.

Ao projeto BryoAntar, do Laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, e ao PROJETO BRIOTECH, da Universidade Católica de Brasília (UCB), pelo apoio logístico.

Ao CNPq pelo apoio ao PROANTAR, fundamental para a realização das coletas e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica pelo auxílio na identificação química dos compostos.

Aos meus pais, **Julie e Henrique**, pelo apoio, incentivo e por suportarem meus momentos de estresse. À minha irmã, **Larissa**, por compreender e servir de modelo na vida acadêmica.

Às minhas amigas que compreenderam minha ausência e me acompanharam durante os momentos de ansiedade e vitórias.

À Universidade de Brasília e todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de Eluição Utilizado na Cromatografia de Coluna do Extrato de Acetona da Amostra Antiga (AA).....	33
Tabela 2. Agrupamento das Frações Coletadas da Cromatografia de Coluna do Extrato de Acetona da Amostra AA Essa tabela não é muito usual. O que costumamos a dizer é que as frações foram realizada conforme similaridade em CCD.....	34
Tabela 3. Resultados dos Testes Fitoquímicos Preliminares para Extratos Brutos de Sanionia uncinata da Amostra AA e da Cultura.....	48
Tabela 4. Identificação dos compostos bioativos encontrados no extrato de acetona das amostras AA através de LC-MS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bioatividade (%) dos extratos brutos de musgos das amostras AA (amostras antigas) (em azul) e AN (amostra novas) (em laranja) da Antártica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo em diferentes concentrações. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle, de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade do extrato aquoso. (B) Bioatividade do extrato de acetato de etila. (C) Bioatividade do extrato de acetona..... 38

Figura 2. Bioatividade (%) dos extratos da cultura de Sanionia uncinata sobre o crescimento de coleóptilos de trigo em diferentes concentrações. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade do extrato aquoso da cultura de Sanionia uncinata. (B) Bioatividade do extrato com acetato de etila da cultura de Sanionia uncinata. (C) Bioatividade do extrato com acetona da cultura de Sanionia uncinata. 39

Figura 3. Bioatividade (%) do extrato de acetona da amostra antiga (AA) de musgos da Antártica sobre o crescimento da parte radicular e da parte aérea de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), agrião (*Nasturtium officinale*) e cebola (*Allium cepa*). As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste de Welch, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade em plântulas de Alface (*Lactuca sativa*). (B) Bioatividade em plântulas de Tomate (*Solanum lycopersicum*). (C) Bioatividade em plântulas de Agrião (*Nasturtium officinale*). (D) Bioatividade em plântulas de Cebola (*Allium cepa*). 41

Figura 4. Bioatividade (%) do extrato de acetato de etila da amostra antiga (AA) de musgos da Antártica sobre o crescimento da parte radicular e da parte aérea de plântulas de agrião (*Nasturtium officinale*) e cebola (*Allium cepa*). As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística altamente significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade em plântulas de Agrião (*Nasturtium officinale*). (B) Bioatividade em plântulas de Cebola (*Allium cepa*). 43

Figura 5. Cromatograma em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos da amostra antiga (AA) de musgo. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento. Pista 1: extrato de acetona da amostra AA. Pista 2: extrato de acetato de etila da amostra AA. 44

Figura 6. Cromatograma em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos da cultura de *Sanionia uncinata*. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento. Pista 1: extrato de acetona da cultura de *Sanionia uncinata*. Pista 2: extrato de acetato de etila da cultura de *Sanionia uncinata*. 45

Figura 7. Cromatograma em camada delgada (CCD) das frações agrupadas obtidas da cromatografia de coluna do extrato de acetona da amostra antiga (AA) de musgo. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento, conforme descrito na seção 5.6. As pistas representam frações agrupadas de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos observados em CCD, além do extrato bruto utilizado como referência. 46

Figura 8. Bioatividade (%) das frações agrupadas do extrato de acetona (amostra AA) sobre o crescimento de coleótilos de trigo na concentração de 332 ppm. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$.

- 47
- Figura 9. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de fenóis em extratos do tapete de musgo da amostra antiga (A) e da cultura de *Sanionia uncinata* (B). As placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram desenvolvidas utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel. A revelação foi realizada pela aplicação de solução de cloreto de ferro III (FeCl₃) a 1%. A presença de fenóis seria indicada pelo surgimento de coloração preta ou azul-escura. 49**
- Figura 10. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de terpenos em extratos do tapete de musgo da amostra antiga (A) e da cultura de *Sanionia uncinata* (B). As placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram desenvolvidas utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel. A revelação foi realizada pela aplicação de uma solução de anisaldeído-ácido sulfúrico (preparada com 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico), seguida de aquecimento direto. A coloração rosada a avermelhada/roxa nas manchas indica a presença de terpenos..... 49**
- Figura 11. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de alcaloides em extratos do tapete de musgo da amostra antiga e da cultura de *Sanionia uncinata*. As amostras foram submetidas ao teste de alcaloides utilizando o reagente de Dragendorff, conforme metodologia descrita na seção 5.9.3. A presença de alcaloides é indicada pela formação de um precipitado colorido nos tubos. Tubo A: Extrato com acetato de etila da amostra AA. Tubo B: Extrato com acetona da amostra AA. Tubo C: Extrato com acetato de etila da amostra da cultura de *Sanionia uncinata*. Tubo D: Extrato com acetona da amostra da cultura de *Sanionia uncinata*. 50**

Resumo

A Antártica é um continente no qual a pegada humana tem aumentado com a presença de partes vegetais. Embora o estabelecimento de plantas na Antártica é limitado por fatores abióticos, como a temperatura baixa, o aquecimento acelerado observado nas últimas décadas representa uma ameaça ao ecossistema antártico ao reduzir a barreira térmica natural, podendo favorecer invasões biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial fitotóxico de metabólitos secundários de tapetes de musgos com predominância de *Sanionia uncinata* e iniciar a identificação de seus compostos bioativos. Extratos aquosos, de acetona e acetato de etila de amostras de campo (Amostras Antigas - AA e Amostras Novas - AN) e de cultura de *S. uncinata* foram testados em bioensaios de coleóptilos de trigo e em bioensaios de fitotoxicidade com sementes de alface, tomate, agrião e cebola. Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), testes fitoquímicos preliminares e fracionamento cromatográfico foram realizadas para caracterizar os metabólitos e localizar os compostos bioativos. Os extratos orgânicos AA demonstraram bioatividade inibitória em coleóptilos e em todas as plantas-alvo testadas, com inibições que alcançaram até 88% em plântulas, sem uma relação dose-resposta linear, sugerindo saturação de dose. A bioatividade desses extratos foi influenciada pelas condições de armazenamento das amostras. Na cultura de *S. uncinata*, apenas o extrato aquoso apresentou atividade significativa. Testes fitoquímicos revelaram a presença de terpenos em todas as amostras, enquanto fenóis e alcaloides não foram detectados. O fracionamento do extrato de acetona AA concentrou a bioatividade em frações específicas (F1, F2, F3 e F6), com a fração F3 exibindo a maior inibição (51%) em coleóptilos. A identificação dos compostos bioativos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) e a elucidação estrutural dos compostos indicaram a presença de bases de cadeia longa (LCBs) do tipo esfingolípido (SL) enquanto os terpenos ainda estão em análise. Os resultados confirmam o potencial fitotóxico dos tapetes de musgos antárticos e a riqueza de seus metabólitos secundários, sugerindo um papel crucial na defesa química contra a invasão biológica na Antártica. Este trabalho oferece uma base para futuras investigações sobre a ecologia química polar e a conservação da biodiversidade antártica.

Palavras-chave: Alelopatia; *Sanionia uncinata*; Musgos; Antártica; Espécies Invasoras; Metabólitos Secundários.

Abstract

Antarctica is a continent where the human footprint has increased, including the introduction of plant propagules. Although plant establishment in Antarctica is limited by abiotic factors such as low temperatures, the accelerated warming observed in recent decades represents a threat to the Antarctic ecosystem by reducing this natural thermal barrier, potentially facilitating biological invasions. The aim of this study was to evaluate the phytotoxic potential of secondary metabolites from moss carpets dominated by *Sanionia uncinata* and to initiate the identification of their bioactive compounds. Aqueous, acetone, and ethyl acetate extracts from field samples (Old Samples – AA and New Samples – AN) and from *S. uncinata* cultures were tested in wheat coleoptile bioassays and phytotoxicity bioassays using lettuce, tomato, watercress, and onion seeds. Thin-Layer Chromatography (TLC), preliminary phytochemical tests, and chromatographic fractionation were performed to characterize the metabolites and locate the bioactive compounds. The AA organic extracts exhibited inhibitory bioactivity in coleoptiles and in all tested target plants, with inhibition levels reaching up to 88% in seedlings, without a clear dose–response relationship, suggesting dose saturation. The bioactivity of these extracts was influenced by the storage conditions of the samples. In the *S. uncinata* culture, only the aqueous extract showed significant activity. Phytochemical tests revealed the presence of terpenes in all samples, while phenols and alkaloids were not detected. Fractionation of the AA acetone extract concentrated bioactivity into specific fractions (F1, F2, F3, and F6), with fraction F3 exhibiting the strongest inhibition (51%) in coleoptiles. The identification of bioactive compounds by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS) and structural elucidation indicated the presence of long-chain bases (LCBs) of the sphingolipid (SL) type, while terpene characterization is still underway. The results confirm the phytotoxic potential of Antarctic moss carpets and the richness of their secondary metabolites, suggesting a crucial role in chemical defense against biological invasion in Antarctica. This work provides a foundation for future investigations into polar chemical ecology and the conservation of Antarctic biodiversity.

Keywords: Allelopathy; *Sanionia uncinata*; Mosses; Antarctica; Invasive Species; Secondary Metabolites.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. Hipóteses	19
4. Revisão de Literatura.....	19
4.1 Classificação e características gerais das briófitas <i>sensu lato</i>	19
4.1.1 Divisão Bryophyta.....	20
4.1.2 Divisão Marchantiophyta	20
4.1.3 Divisão Anthocerotophyta	20
4.2 Metabólitos secundários em briófitas	21
4.2.1 Tipos de compostos	21
4.2.1.1 Terpenos.....	21
4.2.1.2 Compostos fenólicos.....	22
4.2.1.3 Compostos nitrogenados.....	22
4.2.2 Função ecológica dos metabólitos secundários	22
4.2.3 Musgos antárticos e produção de metabólitos secundários	23
4.3 Alelopatia.....	25
4.3.1 Definição e história de alelopatia	25
4.3.2 Alelopatia em briófitas.....	26
4.4 Potencial alelopático das briófitas antárticas	27
5. Material e métodos	28
5.1 Coleta do material vegetal	28
5.2 Cultura de <i>Sanionia uncinata</i>	29
5.3 Extração do material.....	29
5.4 Bioensaio de coleótilos de trigo.....	30

	12
5.5 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes.....	31
5.6 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	32
5.7 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA	33
5.8 Testes fitoquímicos preliminares	34
5.8.1 Fenol.....	35
5.8.2 Terpeno	35
5.8.3 Alcaloide.....	35
5.9 Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)	35
5.10 Identificação dos compostos bioativos	36
6. Resultados.....	36
6.1 Bioensaio de coleóptilos.....	36
6.2 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes.....	40
6.3 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	44
6.4 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA	46
6.5 Testes fitoquímicos preliminares	48
6.5.1 Fenol.....	48
6.5.2 Terpeno	49
6.5.3 Alcaloide.....	50
6.6 Identificação dos compostos bioativos	51
7. Discussão	52
7.1 Bioensaio de coleóptilos.....	52
7.1.1 Bioatividade de extratos de musgos antárticos das amostras AA e AN em coleóptilos de trigo	52
7.1.2 Bioatividade de extratos de cultura de <i>Sanionia uncinata</i> em coleóptilos de trigo.....	53
7.2 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes.....	54
7.3 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	56
7.4 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA	57

7.5 Testes fitoquímicos preliminares	58
7.5.1 Fenol	58
7.5.2 Terpeno	58
7.5.3 Alcaloide.....	59
7.6 Compostos bioativos.....	59
Fitoesfingosina C18.....	60
Fitoesfingosina C16.....	61
Hexadecaesfinganina	61
Terpenos.....	63
8. Conclusão	63
9. Referências	64

1. INTRODUÇÃO

A Antártica é considerada o continente mais frio da Terra com temperatura média do ar na superfície que pode chegar a -23°C , sendo variável de acordo com a localização e época do ano (Perera-Castro *et al.*, 2020). Cerca de 98% do continente é coberta por gelo, enquanto as regiões livres de gelo, chamadas de Vales Secos, possuem clima desértico com temperaturas médias anuais ainda mais extremas entre -17 a -25°C (Cassaro *et al.*, 2021). Por outro lado, algumas regiões costeiras da Antártida Oriental e da Península Antártica apresentaram uma variação de temperatura média anual entre $-2,1^{\circ}\text{C}$ e $-11,3^{\circ}\text{C}$ ao longo dos anos, como registrado no período de 1981 a 2010 (Turner *et al.*, 2020). Além disso, o continente também tem como características a alta radiação ultravioleta, o congelamento e a seca (Liu *et al.*, 2022).

Apesar dessas características adversas, durante a temporada 2019-20, 74.401 turistas visitaram o continente (Horozhankina *et al.*, 2023). A alta temporada de turismo na Antártica ocorre entre os meses de novembro a março que pode corresponder a época reprodutiva de diversos animais (Tejedo *et al.*, 2022; Horozhankina *et al.*, 2023). Ademais, regiões com vida selvagem recebem aproximadamente 20.000 visitantes (Hughes *et al.*, 2020), aumentando a probabilidade de impactos negativos sobre a fauna e a flora antárticas.

A pegada humana, que é a extensão espacial das atividades humanas e seus impactos associados, tem aumentado na Antártica, e isso é amplamente atribuído a fatores como o aumento das espécies não nativas, as mudanças climáticas, incluindo o aquecimento global, contaminantes, a intensificação do turismo e a construção e operação de estações de pesquisa (Brooks *et al.*, 2019). Tudo isso contribui para que materiais vegetais ou partes vegetais – partes da planta que podem germinar e se desenvolver – de indivíduos que não são nativos do local em que estão inseridos aumentem.

Essas partes vegetais podem chegar a Antártica por navio, por avião e, até mesmo, através da importação de alimentos frescos. As espécies invasivas foram encontradas em locais próximos de estações de pesquisa e de turismo (Hughes *et al.*, 2020). Já os materiais vegetais chegam ao continente antártico pelas roupas, equipamentos pessoais de turistas, de pesquisadores e da tripulação de navios e aviões (Huiskes *et al.*, 2014). Durante a temporada de 2007-2008, sementes foram encontradas em 20% das amostras de turistas e 45% das amostras de pesquisadores, totalizando 74.148 sementes transportadas para o

continente antártico. Além disso, fragmentos de briófitas e líquens representaram 11% das amostras em turistas e 20% das amostras de pesquisadores, estimando-se um total de 17.468 fragmentos (Huiskes *et al.*, 2014).

Vários fatores influenciam a não germinação e/ou o não estabelecimento de partes vegetais que chegam à Antártica. Um desses é a temperatura que afeta o desenvolvimento da planta. Embora o estresse abiótico causado pelo frio possa ser classificado em estresse por resfriamento (0° a 15°C) ou estresse por congelamento (< 0°C) e ocasione o extravasamento celular de diferentes lipídeos, íons e proteínas, além de causar necrose e inibir o crescimento (Bhat *et al.*, 2022), o aquecimento gradual pode favorecer plantas vasculares invasoras de crescimento mais rápido, que competem com as espécies nativas.

Desde a década de 1950, as regiões da Península Antártica e do Arco de Scotia registraram as maiores taxas de aquecimento do Hemisfério Sul (Turner *et al.*, 2014, 2016; Convey, 2019). Apesar de apresentar flutuações, como um intervalo de resfriamento (Turner *et al.*, 2016) seguido pela retomada do aquecimento no verão (Cannone *et al.*, 2022), esse evento acarretou em impactos significativos como o greening.

O esverdeamento (ou greening) é um fenômeno no qual ocorre a expansão das áreas vegetadas, sendo uma resposta da comunidade vegetal ao aquecimento climático, ocasionando em uma maior cobertura e abundância de plantas em áreas que estão livres de gelo (Simberloff, 2009; Amaral *et al.*, 2025). Assim, na Admiralty Bay, Ilha Rei George, uma região com predominância de briófitas como a *Sanionia uncinata*, houve um aumento de 6,581 vezes na área verde entre os anos de 1989 a 2022. Também foi evidenciado o aumento excessivo, de 4 a 5 vezes, nas taxas de crescimento de turfeiras de musgos ao longo de 50 anos (Amesbury *et al.*, 2017) e a proliferação e expansão das duas plantas vasculares nativas da Antártica, *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* (Parnikoza *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2011; Cannone *et al.*, 2022). Esse fenômeno parece estar relacionado à capacidade das comunidades vegetais preexistentes de colonizar com sucesso áreas expostas e leitos rochosos em resposta ao aquecimento (Amaral *et al.*, 2025). Em regiões alpinas da Noruega, também foi observado que o aquecimento ambiental gradual resultou em um aumento na abundância, riqueza e equitabilidade de briófitas ao longo de 18 anos. Contudo, o aquecimento experimental

abrupto pode suprimir essa expansão, pois possivelmente favorece plantas vasculares que apresentam crescimento mais rápido (van Zuijlen *et al.*, 2022).

Outro fator limitante é a disponibilidade de água líquida. A água é essencial para a fisiologia das plantas por apresentar um papel importante em todos os processos fisiológicos além de limitar a produtividade de diversos ecossistemas (Lambers & Oliveira, 2019). Assim, a água líquida disponível para os organismos depende de diversas variáveis como a precipitação anual e as perdas por evaporação, sublimação e congelamento. Desse modo, na Antártica, a precipitação acontece como chuva em regiões mais quentes e como neve no resto do continente (Convey *et al.*, 2014). Além disso, a presença de crostas biológicas do solo (BSCs), formadas por líquens, fungos, cianobactérias, algas e musgos e encontradas em ecossistemas com baixa produtividade como a Antártica, está relacionada a um aumento na retenção de água no solo, deixando, assim, a água mais disponível para os organismos (Barrera *et al.*, 2022).

Além do mais, outro elemento importante é a ocorrência ou não da fotoinibição, principalmente para a realização da fotossíntese. Em baixas temperaturas, os processos fotossintéticos são os primeiros a serem inibidos na maioria das plantas. O fotossistema II (PSII) é danificado quando o resfriamento acontece junto da exposição a altas intensidades luminosas, ocasionando a fotoinibição. Ademais, a fotoinibição ainda ocorre mesmo se a planta não for submetida a grandes intensidades de luz e estiver em um local com baixa temperatura (Dubey, 2016).

Os tapetes de musgos são comuns na Antártica, sendo a *Sanionia uncinata* a espécie predominante em muitos deles. Esses tapetes abrigam uma grande diversidade de organismos microbianos, como algas e fungos, além de microinvertebrados, como nematoides e tardígrados, e microartrópodes, como ácaros e colêmbolos (Câmara *et al.*, 2021). Os tapetes também são importantes para o crescimento de *Deschampsia antarctica* – uma planta vascular nativa do continente antártico – visto que, em locais sem a presença de musgos, a *D. antarctica* não cresceu tão significativamente quando comparada a regiões com os musgos (Casanova-Katny & Cavieres, 2012). Ademais, os musgos antárticos mantêm a temperatura da superfície do seu dossel acima da temperatura do ar ambiente, podendo ultrapassar de 15°C ao meio-dia, dependendo do conteúdo de água do turfe, contornando, assim, a adversidade causada pelo frio (Perera-Castro *et al.*, 2020).

Diante desses fatores, outra possibilidade que pode atuar na germinação de materiais vegetais que chegam na Antártica é a presença de substâncias químicas liberadas no meio ambiente. As briófitas produzem diferentes compostos naturais com potencial biotecnológico, tais como terpenoides, flavonoides, (bis)bibenzilos e lipídios, que exibem bioatividades antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas, antibacterianas e antivirais (Horn *et al.*, 2021). Apesar desses produtos serem reconhecidos por suas propriedades benéficas em outros contextos, com estudos demonstrando a inibição da germinabilidade de esporos entre briófitas antárticas (Bu *et al.*, 2017), ainda há uma lacuna na literatura sobre a ação direta dessas substâncias na inibição da germinação ou estabelecimento de plantas vasculares exóticas na Antártida.

Esse tipo de interação, na qual um organismo doador libera substâncias químicas no ambiente que influenciam, positiva ou negativamente, o crescimento, desenvolvimento e reprodução de outros organismos, chamados receptores, é conhecido como alelopatia.

Embora bioensaios em laboratórios possam indicar possíveis potenciais alelopáticos, eles não conseguem provar conclusivamente que a alelopatia ocorre de fato em ambientes naturais, sendo necessário estudos de campos para validar as descobertas de experimentos laboratoriais (Inderjit & Weston, 2000). Portanto, será utilizado o termo “fitoquímicos” para se referir aos compostos extraídos de tecido vegetal por procedimento químico ou físico-químico, como o uso de solventes orgânicos, ou por técnicas que visam potencializar a solubilidade de compostos químicos, maximizando a liberação de substâncias bioativas da planta (Reigosa *et al.*, 2013).

O termo briófitas *sensu lato* inclui plantas de três grupos diferentes: musgos da Divisão Bryophyta, hepáticas da Divisão Marchantiophyta e antóceros da Divisão Anthocerotophyta. São plantas terrestres avasculares com o gametófito como geração dominante. Além disso, representam o segundo maior grupo de plantas do mundo com mais 24.000 espécies, perdendo apenas para as angiospermas (Commisso *et al.*, 2021). De modo geral, as briófitas possuem morfologia bastante simplificada e tamanho diminuto, contudo apresentam alta complexidade química (Whitehead *et al.*, 2018).

Considerando o aumento da introdução de propágulos exóticos na Antártica e a necessidade de compreender os mecanismos de resistência de espécies nativas, este estudo investiga o potencial fitotóxico de *Sanionia uncinata*, um musgo dominante em

tapetes vegetais antárticos. A identificação e caracterização de compostos bioativos associados à sua ação alelopática contribuem para ampliar o entendimento da ecologia química polar e oferecer subsídios para estratégias de conservação frente ao avanço das mudanças climáticas e da pressão antrópica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial alelopático de metabólitos secundários de tapete de musgo tendo *Sanionia uncinata* como espécie dominante provenientes da antártica e identificar os compostos bioativos responsáveis por essa atividade.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade fitotóxica de extratos brutos de *Sanionia uncinata*, extraído com diferentes solventes, em bioensaios de coleóptilos de trigo.
2. Determinar a presença dos principais grupos fitoquímicos por meio de testes preliminares nos extratos orgânicos de *Sanionia uncinata*.
3. Comparar o perfil fitoquímico entre os extratos obtidos de tapetes de musgos coletados em momentos distintos (amostras “nova” e “antiga”).
4. Investigar os efeitos dos extratos orgânicos do tapete de musgos no crescimento de plantas-alvo sensíveis em bioensaios de fitotoxicidade em sementes.
5. Fracionar o extrato de acetona de *Sanionia uncinata* por cromatografia em coluna aberta para purificação de compostos.
6. Caracterizar o perfil de compostos presentes nos extratos brutos e nas frações purificadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS).
7. Identificar os compostos químicos bioativos presentes nas frações ativas de *Sanionia uncinata* utilizando dados de espectrometria de massas e ferramentas bioinformáticas.

3. HIPÓTESES

1. Tapetes de musgos antárticos contêm metabólitos secundários com propriedades fitotóxicas.
2. Esses compostos interferem no crescimento e desenvolvimento de plantas potenciais invasoras, podendo inibir a germinação e alongação radicular.
3. A presença dessas substâncias contribui para limitar o estabelecimento de espécies vegetais que chegam à Antártica por ação antrópica.
4. A idade do material vegetal (amostras antigas e amostras novas) influencia o perfil fitoquímico dos extratos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Classificação e características gerais das briófitas *sensu lato*

As briófitas, parentes vivos mais próximos dos ancestrais das primeiras plantas do ambiente terrestre, colonizaram a terra a cerca de 470 a 515 milhões de anos (Morris *et al.*, 2018). Atualmente, são divididas em três grupos distintos: musgos da Divisão Bryophyta, hepáticas da Divisão Marchantiophyta e antóceros da Divisão Anthocerotophyta. Elas também englobam mais de 24.000 espécies descritas, tornando-as o segundo grupo de plantas mais diversificado (Commisso *et al.*, 2021).

Os gametófitos dos antóceros e das hepáticas são organizados em talos enquanto os musgos apresentam estruturas ramificadas semelhantes a caules e folhas – chamados, respectivamente, de caulídeos e folídeos. Apesar da ausência de raízes verdadeiras, as briófitas são capazes de se fixar ao substrato com estruturas conhecidas como rizoides, que possuem funções análogas às raízes (Budke *et al.*, 2018). Assim como as demais plantas terrestres, seu ciclo de vida apresenta alternância de gerações entre gametófito haploide e esporófito diploide, porém o gametófito é a geração dominante (Horst & Reski, 2016).

4.1.1 Divisão Bryophyta

Há cerca de 12.000 espécies de musgos globalmente (Commisso *et al.*, 2021). Os musgos se diferem das demais briófitas por terem o protonema – a fase inicial do ciclo de vida – ramificado. Além disso, os musgos foram tapetes que auxiliam na retenção de água, que é essencial para a sua reprodução (Budke *et al.*, 2018; Barrera *et al.*, 2022).

A presença de musgos do solo contribui para os serviços ecossistêmicos porque, provavelmente, isso está relacionado à sua capacidade de influenciar microclimas de superfície como ao aumentar a temperatura na copa do tapete de musgos em ambientes de frio extremo (Perera-Castro *et al.*, 2020). Ademais, outros papéis essenciais nos serviços ecossistêmicos desempenhados pelos musgos são o aumento do sequestro de carbono, decomposição de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e controle de fitopatógenos (Eldridge *et al.*, 2023).

Apesar disso, os musgos apresentaram pouca relevância na biodiversidade do solo ao serem comparados com os reservatórios de carbono e nutrientes e também suportam menor biodiversidade de invertebrados em comparação a solos nus circundantes. Essas características se devem porque eles produzem metabólitos secundários como flavonoides, carotenoides e outros fenóis que apresentam bioatividade antimicrobiana, antifúngica e citotóxica (Eldridge *et al.*, 2023).

4.1.2 Divisão Marchantiophyta

Estima-se que existam entre 5.000 a 7.500 espécies de hepáticas pelo mundo (Söderström *et al.*, 2016). Morfologicamente, os gametófitos das hepáticas são diversos, com espécies talosas, subdivididas em simples e complexas, e folhosas, com características que lembram as dos musgos (Budke *et al.*, 2018). Na Antártica, há cerca de 27 hepáticas (Carvalho-Silva *et al.*, 2021).

4.1.3 Divisão Anthocerotophyta

No mundo, há aproximadamente 215 espécies de antóceros (Söderström *et al.*, 2016), sendo o menor grupo e menos diverso dentro as briófitas *sensu lato*. Eles não apresentam muita variação morfológica, tendo talos achatados (Budke *et al.*, 2018). Além disso, são geograficamente distribuídos principalmente em regiões tropicais (Villarreal *et*

al., 2010). O nome da divisão é derivado das palavras gregas: anthos (flor), ceras (chifre) e phyta (planta) devido ao formato parecido com um chifre no esporófito – fase diploide do ciclo de vida – do antóceros (Frangedakis *et al.*, 2021).

4.2 Metabólitos secundários em briófitas

As briófitas produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários que desempenham papéis cruciais em sua adaptação a ambientes extremos, defesa contra herbivoria e interações ecológicas (Whitehead *et al.*, 2018; Asakawa & Ludwiczuk, 2018; Dziwak *et al.*, 2022; Motti *et al.*, 2023). Esses compostos são classificados em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, cada um com características e funções distintas (Horn *et al.*, 2021).

4.2.1 Tipos de compostos

4.2.1.1 Terpenos

Os terpenos constituem o maior grupo de metabólitos secundários em briófitas, com mais de 1.600 compostos identificados em hepáticas (Asakawa & Ludwiczuk, 2018). Essa diversidade é atribuída à presença de corpos oleosos, estruturas exclusivas das hepáticas que atuam como locais de armazenamento desses compostos (Horn *et al.*, 2021).

Dentre as briófitas, as hepáticas são as maiores produtoras de terpenos que possuem uma ampla atividade biológica, tais como atividades antimicrobianas, antifúngicas e alelopáticas (Han *et al.*, 2021). Os sesquiterpenos são o grupo de terpenos mais diverso em hepáticas, com aproximadamente 900 sesquiterpenos identificados como eudesmano e aromadendrano (Ludwiczuk & Asakawa, 2019). Além disso, elas produzem sesquiterpenos específicos da espécie como o dumortano, encontrado pela primeira vez na espécie argentina *Dumortiera hirsuta* (Bardón *et al.*, 1999).

Em musgos, os terpenos mais comuns incluem β -citrocitral, α - e β -pineno e limoneno. Os sesquiterpenos representam o maior grupo, com aproximadamente 100 compostos identificados (Asakawa *et al.*, 2013). Por outro lado, os diterpenos, embora menos abundantes em musgos, são significativos em hepáticas, com cerca de 500 compostos descritos (Commisso *et al.*, 2021).

4.2.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são o segundo maior grupo de metabólitos secundários produzidos em briófitas. Apresentam como característica principal a presença de um grupo hidroxila (-OH) diretamente ligado a um anel aromático (Li *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos são produtos universais para as plantas e são usados como componentes estruturais da parede celular e formação de polímeros de cutícula (Kulshrestha *et al.*, 2022).

Os flavonoides – um grupo de compostos fenólicos – são encontrados em musgos, hepáticas e plantas vasculares, entretanto não foram identificados em antóceros. Em briófitas, as suas principais classes são flavonas, flavonóis, isoflavonas, auronas, antocianinas e auronidinas, que são exclusivas de hepáticas (Horn *et al.*, 2021). Monoflavonóides são comuns em hepáticas enquanto biflavonoides são mais encontrados em musgos (Asakawa *et al.*, 2013).

4.2.1.3 Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados são dificilmente encontrados em briófitas. Quando presentes, desempenham papéis importantes na defesa química da planta. Em hepáticas, foram identificados o alcaloide plagiocianina B de *Plagiochila duthiana* (Commisso *et al.*, 2021) e dois derivados de indol prenilados de espécies de *Riccardia* (Asakawa & Ludwiczuk, 2018). Enquanto em musgos, foi relatado o alcaloide harmol em *Fontinalis squamosa* que possui atividade antifúngica (Salm *et al.*, 1998). Em antóceros, foram encontrados compostos nitrogenados entre eles o alcaloide antocerodiazonina, que possui atividade antifúngica (Trennheuser *et al.*, 1994).

4.2.2 Função ecológica dos metabólitos secundários

Os metabólitos secundários desempenham papéis cruciais na ecologia das briófitas, atuando como mecanismos de defesa, proteção contra estresse abiótico e mediadores de interações ecológicas.

Terpenos e alcaloides produzidos por briófitas podem exibir propriedades tóxicas e repelentes, que auxiliam na inibição da herbivoria. No extrato feito com mistura de

metanol e água (80:20) do musgo *Dicranum scoparium*, foram identificados sete novos oxilipinas acéticas derivadas de dicranina, incluindo dicranenona A, monoacilglicerol 2 e oxilipinas acíclicas. Esses compostos atuam como mecanismos de defesa contra a herbivoria, principalmente de lesmas *Arion lusitanicus* (Rempt & Pohnert, 2010).

Por outro lado, os flavonoides têm diversas funções para as briófitas. A radiação ultravioleta-B (UV-B) induz a síntese de flavonoides, expressão de genes que estão associados à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reparo de DNA, conferindo proteção ao musgo antártico *Pohlia nutans* que, após 96 horas sob UV-B, apresentou um conteúdo total de flavonoides 1,65 vez maior em relação ao controle. A presença desses compostos evidencia que musgos antárticos possuem estratégias semelhantes a plantas vasculares (Li *et al.*, 2019). Além disso, no musgo *Physcomitrella patens*, usado como planta modelo, auxiliam no crescimento de hidroides e leptoides de musgos que possuem funções parecidas semelhantes às traqueídes e células crivadas em plantas vasculares (Horn *et al.*, 2021).

Ademais, os produtos naturais também influenciam nas interações ecológicas. O musgo *Hypnum plumaeforme* é conhecido por formar colônias exclusivas, inibindo outras plantas. As partes aéreas de *H. plumaeforme* extraídas com acetona e depois particionada com acetato de etila (EtOAc) mostrou a presença de momilactonas A e B, que foram identificadas por espectrometria de massa, até então somente encontradas em arroz (*Oryza sativa*). Os extratos de acetato e momilactona B foram testados em quatro espécies, sendo *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (angiospermas), *Jungermannia subulata* (hepática), *Physcomitrella patens* e *H. plumaeforme* (musgos), e sua atividade inibitória foi avaliada em microplacas. A única espécie que não apresentou inibição do crescimento quando expostas a esses extratos foi a *H. plumaeforme*, indicando mecanismos de autoproteção (Nozaki *et al.*, 2007).

4.2.3 Musgos antárticos e produção de metabólitos secundários

Os musgos antárticos também produzem compostos aleloquímicos. Em espécies como *Bryum pseudotriquetrum*, já foram isolados e identificados os principais compostos flavonoides presentes nesse musgo. No seu extrato metanólico, foram identificados quinze flavonoides, sendo quatro novos produtos naturais descobertos: kaempferol 3-O-galactoside-4'-O-glucosídeo, scutellarein 7-O-glucosídeo-6"-malonil éster, apigenin 7-O-

neohesperidosídeo-6"-malonil éster e luteolin 7-O-neohesperidosídeo-6"-malonil éster. Outros compostos identificados incluíram flavona-C-glicosídeos (estelarina 2, lucenina 2, vicenina 2) e outros flavona-O-glicosídeos. Entretanto, variações da composição de produtos naturais de *B. pseudotriquetrum* foram observadas em outros habitats, indicando que fatores ambientais podem influenciar a composição de flavonoides dependendo da localização geográfica (Stein & Zinsmister, 1990).

Os mecanismos químicos que permitem a sobrevivência do musgo *Ceratodon purpureus* tanto na Antártica quanto em desertos australianos também foram investigados. Por meio da extração intracelular com metanol e hidrólise alcalina para compostos ligados à parede celular, foram isolados nove compostos: cinco biflavonoides e quatro fenóis. Dois dos biflavonoides estavam ligados às paredes celulares do musgo antártico, sendo o primeiro isolamento do tipo em paredes celulares de musgo, bem como de uma briófitas antártica. No entanto, nas amostras australianas, esses compostos foram detectados apenas intracelulares. Os compostos fenólicos encontrados atuam como protetores contra a radiação ultravioleta, além de apresentarem atividade antioxidante (Waterman *et al.*, 2017).

O potencial alelopático e a atividade citostática do musgo antártico *Sanionia georgicouncinata*, amplamente distribuído nas Ilhas Argentinas (Arquipélago Wilhelm), foram investigados no contexto do aumento de temperaturas e risco de introdução de plantas invasoras na Antártica. Os extratos aquosos nas concentrações de 1:10, 1:50 e 1:100 (massa de planta:volume de água) foram usados em bioensaios com sementes de *Cucumis sativus* (pepino), *Raphanus sativus* (rabanete), *Triticum vulgare* (trigo) e *Amaranthus paniculatus*. Observou-se que apenas a raiz do rabanete apresentou inibição significativa com extrato 1:50. Em contraste, os extratos 1:50 e 1:100 estimularam o crescimento das raízes de amarantos. Além disso, os extratos 1:10 e 1:50 reduziram significativamente o número de raízes laterais em pepino. Desse modo, os efeitos alelopáticos observados de *S. georgicouncinata* foram baixos, mas apresenta atividade citostática significativa dos extratos analisados (Dziuba *et al.*, 2021).

A espécie *Sanionia uncinata* Hedw. (Amblystegiaceae) é um musgo que forma densos tapetes e é extremamente abundante na Antártica, sendo encontrado em diversos habitats (Samecka-Cymerman *et al.*, 2011). O extrato de *S. uncinata* apresenta vários compostos fenólicos como flavonoides, podendo ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais para reduzir os efeitos prejudiciais causados pelas espécies reativas

induzidas por UV. Os flavonoides têm aplicações terapêuticas e cosméticas já que são estruturalmente semelhantes aos filtros químicos (Bhattarai *et al.*, 2008; da Silva Fernandes *et al.*, 2019).

No entanto, grande parte do potencial alelopático dos metabólitos secundários de briófitas antárticas permanece pouco explorado já que a maioria desses compostos tem sido investigada principalmente por suas atividades para fins antrópicos como terapêuticos e cosméticos. Além disso, há uma escassez de dados sobre os aleloquímicos presentes nos musgos da Antártica.

4.3 Alelopatia

4.3.1 Definição e história de alelopatia

O termo alelopatia, do grego *allelo* (mútuo) e *pathos* (sofrimento), foi usado pela primeira vez pelo botânico Hans Molisch em 1937 (Hierro & Callaway, 2021). Entretanto, a observação dos efeitos alelopáticos remonta ao filósofo grego Teofrasto em 300 a.C. no qual percebeu que as plantas de grão de bico prejudicavam o solo e outras ervas daninhas ao redor. Já em 1 d.C., o estudioso romano Plínio notou que a noqueira inibia o crescimento de plantas próximas (Khamare *et al.*, 2022).

Ao longo da história, o conceito sofreu diversas alterações. Segundo Molisch, alelopatia é uma interação química entre as plantas que podem ter efeitos positivos, negativos ou neutros (Hierro & Callaway, 2021). Assim, alelopatia pode ser definida como uma interação química na qual uma planta doadora interfere direta ou indiretamente de forma positiva ou negativa no desenvolvimento de outra planta, chamada de planta receptora, por meio de substâncias químicas produzidas pela planta doadora que são lançadas para o meio ambiente (Rice, 2012). Também estão contemplados nessa definição as algas, os fungos, os microrganismos e os animais (Cheng & Cheng, 2015). Ou seja, a alelopatia não é uma interação exclusiva das plantas.

Os aleloquímicos são substâncias não necessárias para a nutrição e produzidas como metabólitos secundários de plantas (Cheng & Cheng, 2015). Possuem diferentes estruturas, sendo classificados como: (1) ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas; (2) lactonas insaturadas simples; (3) ácidos

graxos de cadeia longa e poliacetilenos; (4) quininas; (5) fenólicos; (6) ácido cinâmico e seus derivados; (7) cumarinas; (8) flavonoides; (9) taninos; (10) esteroides e terpenoides.

Normalmente, os aleloquímicos são encontrados em folhas, raízes, cascas, frutos, flores e exsudatos radiculares das plantas. Além disso, podem ser liberados para o meio ambiente por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e decomposição de resíduos vegetais (Weir *et al.*, 2004).

Ademais, os aleloquímicos têm uma variedade de modos de ação, eficácia e absorção (Weir *et al.*, 2004). A sorgoleona, por exemplo, é um produto natural exsudado pelas raízes do sorgo (*Sorghum bicolor*) capaz de inibir o transporte de elétrons do fotossistema II (PSII) em tilacoides de espinafre com eficácia parecida ao diuron, um herbicida sistêmico. As concentrações I_{50} foram de 0,10 mM para a sorgoleona e 0,12 mM para o diuron, indicando uma potência similar (Nimbal *et al.*, 1996). Apesar de vários aleloquímicos terem sido identificados ao longo dos anos, muitos ainda não têm o seu mecanismo de ação claro.

4.3.2 Alelopatia em briófitas

A alelopatia, mediada por metabólitos secundários, não é uma interação química exclusiva de plantas vasculares, estando também presente em briófitas. A vasta diversidade de metabólitos secundários produzidos por briófitas, como terpenos, flavonoides e compostos fenólicos (discutidos na seção 4.2), torna-os possíveis fontes de aleloquímicos capazes de influenciar no crescimento e desenvolvimento de outros organismos.

Essas interações podem se manifestar de diversas formas no ambiente. Em um estudo realizado com os extratos aquosos dos gametófitos de três espécies de musgos (*Sphagnum palustre*, *Sphagnum magellanicum* e *Polytrichum strictum*) de turfeiras no nordeste da China, observou-se que todos os extratos apresentaram efeitos inibitórios na germinabilidade dos esporos de outras briófitas (Bu *et al.*, 2017). O musgo *P. strictum* exibiu um efeito alelopático mais intenso do que as espécies de *Sphagnum* testadas. A alelopatia, junto da maior tolerância à seca de *P. strictum*, sugere um mecanismo no qual a espécie tenha uma vantagem no estabelecimento e expansão sobre as espécies de *Sphagnum* nessas turfeiras.

Outro exemplo de alelopátia em briófitas envolve liberação de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs). O musgo *Sphagnum flexuosum*, que coexiste naturalmente com *Hamatocaulis vernicosus*, afeta o crescimento de *H. vernicosus*. Os VOCs liberados por *S. flexuosum* tiveram um impacto direto em *H. vernicosus* ao aumentar seu crescimento em comprimento. Essa mudança morfológica pode ser uma resposta adaptativa de *H. vernicosus* para evitar o sombreamento por um competidor. *H. vernicosus* também alterou sua emissão de VOCs, produzindo mais compostos como o MTCC (metil 2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxilato). O MTCC possui similaridade estrutural com o β -ciclocitral (2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-carbaldeído), conhecido por seu papel na sinalização de estresse e alelopátia em plantas vasculares (Vicherová *et al.*, 2020).

Esses exemplos demonstram que a alelopátia em briófitas não apenas modula a competição interespecífica, mas também pode induzir respostas adaptativas e até mesmo comunicação química entre espécies, revelando a complexidade de suas interações ecológicas em diversos biomas.

4.4 Potencial alelopático das briófitas antárticas

A Antártica é um ecossistema de amplo estudo das estratégias de sobrevivência e interações ecológicas decorrentes de suas condições ambientais extremas (Convey *et al.*, 2014). Contudo, o continente enfrenta um risco elevado de introdução e estabelecimento de espécies invasoras devido às mudanças climáticas e ao aumento da pegada humana na região (Frenot, 2004; Brooks *et al.*, 2019). Desse modo, compreender os mecanismos de defesa de espécies nativas torna-se essencial para a conservação de seu ecossistema.

Estudos sobre a química de organismos antárticos já relataram uma notável capacidade de produzir metabólitos secundários com uma vasta gama de atividades biológicas (dos Santos *et al.*, 2021). Muitos desses compostos são reconhecidos por suas funções protetoras contra a radiação UV, estresse oxidativo ou antimicrobianos (Ivanova *et al.*, 2007; Bhattarai *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2017), entretanto a investigação de seu papel na alelopátia de ecossistemas polares ainda é escassa.

O estudo com *Sanionia georgicouncinata*, espécie do mesmo gênero que a *Sanionia uncinata* e também presente em ilhas antárticas, investigou seu potencial alelopático (Dziuba *et al.*, 2021). Conforme detalhado na seção 4.2.3, os extratos aquosos

de *S. georgicouncinata* foram avaliados quanto ao seu potencial alelopático e citostático. Embora os efeitos alelopáticos tenham sido baixos, a inibição significativa em raízes de rabanete, além de atividade citostática, indica que o gênero *Sanionia* possui a capacidade bioquímica de produzir compostos com potencial bioativo.

No entanto, grande parte do potencial alelopático dos metabólitos secundários de briófitas antárticas permanece pouco explorado já que a maioria desses compostos tem sido investigada principalmente por suas atividades para fins antrópicos como terapêuticos e cosméticos (Fernandes *et al.*, 2017; Teodoro *et al.*, 2024). Portanto, esta pesquisa se propõe a preencher essa lacuna, investigando o potencial alelopático do tapete de musgo com *Sanionia uncinata*, para contribuir com uma compreensão mais completa dos mecanismos de resistência de espécies nativas da Antártica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta do material vegetal

Foram realizadas duas coletas em datas distintas, ambas conduzidas pelo projeto de pesquisa BryoAntar, vinculado ao Laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília.

A primeira coleta ocorreu em 2023 no verão na Ilha Rei George, Antártica, durante a 41ª Operação Antártica (OPERANTAR XLI). As amostras foram coletadas no Refúgio 1 e no Parque de Tanques em março de 2023 e identificadas pelo taxonomista especialista Dr. Paulo Eduardo A. S. Câmara. Após as coletas, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por um período de seis meses e, posteriormente, transferidas para o congelador para preservação. Essas amostras foram designadas Amostras Antigas (AA).

A segunda foi realizada no verão de 2024, durante 42ª Operação Antártica (OPERANTAR XLII), também na Ilha Rei George. As amostras foram coletadas e identificadas pelo Dr. Paulo Eduardo A. S. Câmara, perto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). Diferente da primeira coleta, estas amostras foram mantidas sob congelamento contínuo desde o momento da coleta em campo até o armazenamento final no laboratório, visando preservar integralmente seus constituintes químicos. Estas foram nomeadas como Amostras Novas (AN).

5.2 Cultura de *Sanionia uncinata*

O material *Sanionia uncinata* utilizado nos experimentos foi uma cultura pura cedida pelo PROJETO BRIOTECH da Universidade Católica de Brasília (UCB).

Essa cultura foi mantida sob condições controladas, com temperatura de 20 °C e fotoperíodo de doze horas, em meio de cultura BDC, sob agitação constante a 130 rpm. O material foi transferido para nossa pesquisa após o período de cultivo de 2 de janeiro a 3 de setembro de 2024.

5.3 Extração do material

Diferentes métodos foram testados para encontrar o composto bioativo do material vegetal. Foram usados como solventes com diferentes polaridades água destilada, acetato de etila e acetona (Harborne, 1998), sendo a proporção planta-solvente de 1:40 para todos os solventes. Todas as extrações foram realizadas em capela de exaustão, em temperatura ambiente.

Para cada solvente, 4 gramas do material vegetal de AA e AN foram trituradas em um gral de pistilos, utilizando 160 mL de cada solvente. Os extratos ficaram 25 minutos no ultrassom para melhor eficiência da extração (United Nations Industrial Development Organization, et al., 2008), sendo filtrados e armazenados em um Falcon. A amostra extraída com água destilada foi liofilizada, enquanto as extraídas com acetato de etila e acetona foram secas na capela ou em SpeedVac para remoção do solvente.

Os tubos foram identificados de acordo com o solvente utilizado. Os extratos foram comparados entre si e aquele que apresentou o resultado significativo em relação ao controle no bioensaio preliminar foi selecionado para análises posteriores.

No caso das amostras de cultura de *S. uncinata*, o material foi inicialmente liofilizado. Por limitação do material, foram utilizados 10 mg do material liofilizado que foram distribuídos em três tubos Erlenmeyer distintos. Para cada tubo, foram adicionados 20 mL de água destilada, 15 mL de acetato de etila e 15 mL de acetona, respectivamente, garantindo que as amostras ficassem completamente submersas. A partir dessa etapa, os procedimentos foram os mesmos descritos anteriormente para as amostras AA e AN: aplicação de ultrassom, filtração e armazenamento de acordo com o solvente utilizado.

5.4 Bioensaio de coleóptilos de trigo

O bioensaio de coleóptilo de trigo (Hancock *et al.*, 1964) foi usado inicialmente para verificar qual dos extratos preparados apresentou maior atividade fitotóxica geral. Aproximadamente 100 sementes de trigo (*Triticum* spp.) foram germinadas em caixas Gerbox com papel filtro junto de 15 mL de água destilada. As placas foram envolvidas em papel alumínio para evitar que tivessem contato com a luz e crescessem estioladas, incubadas por 4 dias a 25°C (Hancock *et al.*, 1964).

As placas foram abertas em uma sala sob luz verde para evitar o crescimento dos coleóptilos (Folta & Maruhnich, 2007). Os coleóptilos foram selecionados e cortados com uma guilhotina Van de Wij com um papel filtro umedecido. Foi cortado 4 mm dos coleóptilos a uma distância de 2 mm da extremidade apical (Nitsch & Nitsch, 1956). Os fragmentos foram colocados em uma placa de Petri com água destilada durante o processo de produção de decapitação.

Em tubos de ensaios, foram usados 2 mL do extrato nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1.600 ppm com três repetições de cada e 5 fragmentos de coleóptilos em cada tubo. No controle, foi usada solução aquosa de sacarose com três repetições e 5 coleóptilos em cada tubo. Os tubos foram fechados e colocados em um rotor envolvidos com papel alumínio. O rotor foi ligado e mantido em uma rotação constante de 6 rpm por 24 horas a 22°C.

Após as 24 horas, os coleóptilos foram retirados dos tubos, sendo secados e colocados sobre uma planilha numerada em função do produto e concentração. Depois, foram realizadas fotos, transferindo-as para o computador e analisando-as pelo programa ImageJ o qual mediu o comprimento dos coleóptilos em milímetros. A bioatividade foi analisada no programa PHOTOMED[®], o qual calculou a porcentagem de atividade dos tratamentos em relação ao controle utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [(XT - XC) / XC] \times 100\%$$

Onde:

- % inibição é a porcentagem de inibição.
- XT é o comprimento médio dos coleóptilos no tratamento.

- XC é o comprimento médio dos coleóptilos no controle.

A significância estatística dos resultados foi avaliada por meio do Teste t de Student, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para os extratos provenientes da cultura de *S. uncinata*, a metodologia seguiu os mesmos passos descritos, com a diferença nas concentrações testadas. Devido à menor quantidade de amostra disponível, foram utilizadas concentrações de 200, 400 e 800 ppm.

5.5 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes

Os extratos AA que apresentaram resultados significativos em relação ao controle no bioensaio de coleóptilo foram avaliados sua atividade em germinação e crescimento de plantas-alvo padrão. Para isso, foram preparados extratos nas mesmas concentrações do bioensaio de coleóptilo de 100, 200, 400, 800 e 1.600 ppm. É importante salientar que, para este bioensaio, os extratos provenientes da cultura de *Sanionia uncinata* não foram utilizados.

As espécies-alvos padrão que foram utilizadas são a alface (*Lactuca sativa*), o tomate (*Solanum lycopersicum*), o agrião (*Nasturtium officinale*) e a cebola (*Allium cepa*) por serem sensíveis e facilmente encontrados em lojas agropecuárias (Macías *et al.*, 2000).

Para cada planta-alvo, foram colocadas 20 sementes em cada placa de Petri de 50 mm de diâmetro com um papel filtro. Cada placa recebeu 1 mL de extrato nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1.600 ppm e o controle, 1 mL de água destilada. Foram feitas 4 repetições por dose e por controle. As placas foram fechadas e envolvidas por papel filme e, depois, por papel alumínio, armazenadas em uma caixa e colocadas para germinar no escuro por 4 dias.

Depois do período de crescimento, as plantas foram congeladas e em seguida esticadas. Foram tiradas fotos das plântulas de cada planta-alvo que foram contadas e esticadas sobre uma planilha com régua para calibração, tendo o comprimento das partes aérea e radicular medidas pelo programa ImageJ. Considerou semente germinada as que tinham emissão de radícula.

A porcentagem de inibição da germinação e do crescimento da parte aérea e radicular foi calculada utilizando o programa FITOMED, com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [(XT-XC)/XC] \times 100\%$$

Onde:

- % inibição representa a porcentagem de inibição.
- XT é a média do comprimento (ou número de germinação) dos tratamentos.
- XC é a média do comprimento (ou número de germinação) do controle.

A análise estatística para comparação entre os tratamentos e o controle foi realizada utilizando o Teste de Welch, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O bioensaio com as amostras da cultura de *S. uncinata* não foram realizados por limitações da quantidade do material.

5.6 Cromatografia de camada delgada (CCD)

A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi empregada para a análise preliminar dos extratos orgânicos. Para tanto, utilizou-se uma placa de fase normal DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, composta por sílica gel de 0,20 mm de espessura, como fase estacionária. As placas foram cortadas em dimensões apropriadas para a corrida cromatográfica, com altura de 5 cm.

A fase móvel foi constituída por uma solução de hexano (80%) e acetona (20%) (v/v). Os extratos orgânicos analisados, selecionados com base nos resultados significativos dos bioensaios, foram os seguintes:

- Ponto 1: extrato da amostra AA com acetona.
- Ponto 2: extrato da amostra AA com acetato de etila.

A aplicação das amostras foi realizada por meio de capilar de vidro. As placas foram, então, desenvolvidas em uma cuba cromatográfica com tampa contendo a fase móvel.

Após a corrida cromatográfica, as placas foram reveladas por imersão em uma solução de *oleum*, preparada com 200 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico e

40 mL de ácido acético. Em seguida, as placas foram aquecidas a 180 °C com um aquecedor para a visualização dos compostos.

5.7 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA

O fracionamento do extrato de acetona da amostra AA foi realizado por cromatografia em coluna aberta. Para a obtenção do material a ser fracionado, 129,8232g de material vegetal da amostra AA foram extraídos em 1,5 L de acetona. O extrato ficou 25 minutos em ultrassom para otimizar a extração. Após esse período, o material foi filtrado. O solvente (acetona) foi então removido do filtrado por secagem em capela de exaustão, resultando em um extrato bruto de acetona concentrado.

Para o carregamento na coluna, o extrato bruto seco foi dissolvido em um volume mínimo de hexano.

A coluna de vidro utilizada foi empacotada com sílica gel, formando uma fase estacionária com 30 centímetros de altura. Antes da aplicação da amostra, a coluna foi pré-equilibrada com 100 mL de hexano.

A eluição foi realizada em modo de gradiente de polaridade, utilizando misturas de solventes conforme detalhado na Tabela 1. As frações eluídas foram coletadas individualmente.

Tabela 1. Gradiente de Eluição Utilizado na Cromatografia de Coluna do Extrato de Acetona da Amostra Antiga (AA)

Estágio	Acetona	Hexano	Metanol	Frascos
1%	1 mL	99 mL	-	0
2%	2 mL	98 mL	-	1 – 7
4%	4 mL	96 mL	-	8 – 15
8%	8 mL	92 mL	-	16 – 21
16%	16 mL	84 mL	-	22 – 28
32%	32 mL	68 mL	-	29 – 36
64%	64 mL	36 mL	-	37 – 43
100%	-	100 mL	-	44 – 50

100%	-	-	100 mL	51 – 57
-------------	---	---	--------	---------

Após a coleta, cada uma das frações obtidas foi analisada por cromatografia de camada delgada (CCD), seguindo a metodologia descrita na seção 5.6, para monitorar o perfil cromatográfico e a presença de compostos. Com base na similaridade visual das bandas na CCD, frações com perfis semelhantes foram agrupadas de acordo com a Tabela 2. As frações agrupadas foram então submetidas a uma nova análise por CCD para confirmação da homogeneidade e, posteriormente, a um bioensaio de coleóptilos de trigo na concentração única de 332 ppm por limitação da quantidade das frações, conforme descrito na seção 5.4, para avaliar a atividade fitotóxica das frações purificadas.

Tabela 2. Agrupamento das Frações Coletadas da Cromatografia de Coluna do Extrato de Acetona da Amostra AA Essa tabela não é muito usual. O que costumamos a dizer é que as frações foram realizada conforme similaridade em CCD

Fração agrupada	Frações individuais (Número do Frasco)
1	9, 20, 21, 22, 23
2	25
3	26, 27, 28
4	30
5	31, 32, 33, 34, 35, 36
6	37, 38, 39
7	41, 42, 43, 44
8	48, 49, 50, 51

5.8 Testes fitoquímicos preliminares

Foram realizados testes generalistas para a identificação de fenóis, terpenos e alcaloides. O conteúdo liofilizado do extrato AA foi dissolvido em 8 mL de água destilada, divididos em três tubos contendo 2 mL de extrato cada. Os resultados foram expressos em forma de presença (+) e ausência (-).

5.8.1 Fenol

Em um tubo, foram adicionadas duas gotas de solução FeCl_3 a 1%. Mudança na coloração ou formação de precipitado indica resultado positivo.

5.8.2 Terpeno

Em um tubo, foi adicionado gotas de uma solução formada por 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico. Mudança de coloração é resultado positivo.

5.8.3 Alcaloide

Em outro tubo, foi adicionado gotas de Dragendorff formado pela mistura de soluções A e B. A solução A continha 0,85 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético e 40 mL de água destilada, enquanto a solução B era constituída por 8 g de iodeto de potássio e 30 mL de água. Ambas as soluções foram misturadas em proporção de 1:1. A mudança de cor é indicativa da presença de alcaloides.

5.9 Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

As análises de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) foram realizadas com o objetivo de iniciar a identificação dos compostos presentes nos extratos de acetato de etila e de acetona das amostras AA e frações com atividade biológica.

As análises de LC-MS foram realizadas no Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB). Para cada amostra, foram obtidos dados de massa molecular (m/z) e seus respectivos tempos de retenção, além de perfis de fragmentação, permitindo a inferência da estrutura dos compostos.

Os dados gerados por LC-MS foram posteriormente processados e interpretados utilizando, auxiliando na identificação dos compostos com base em suas massas exatas e padrões de fragmentação, conforme descrito na seção 5.10 (Identificação dos Compostos Bioativos).

5.10 Identificação dos compostos bioativos

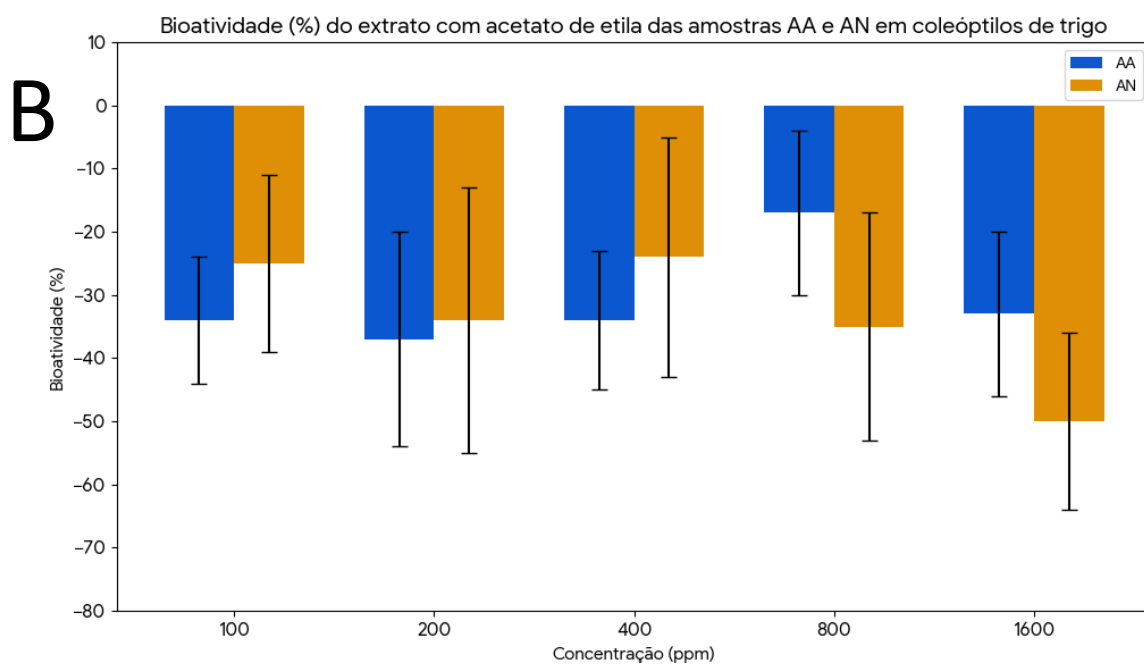
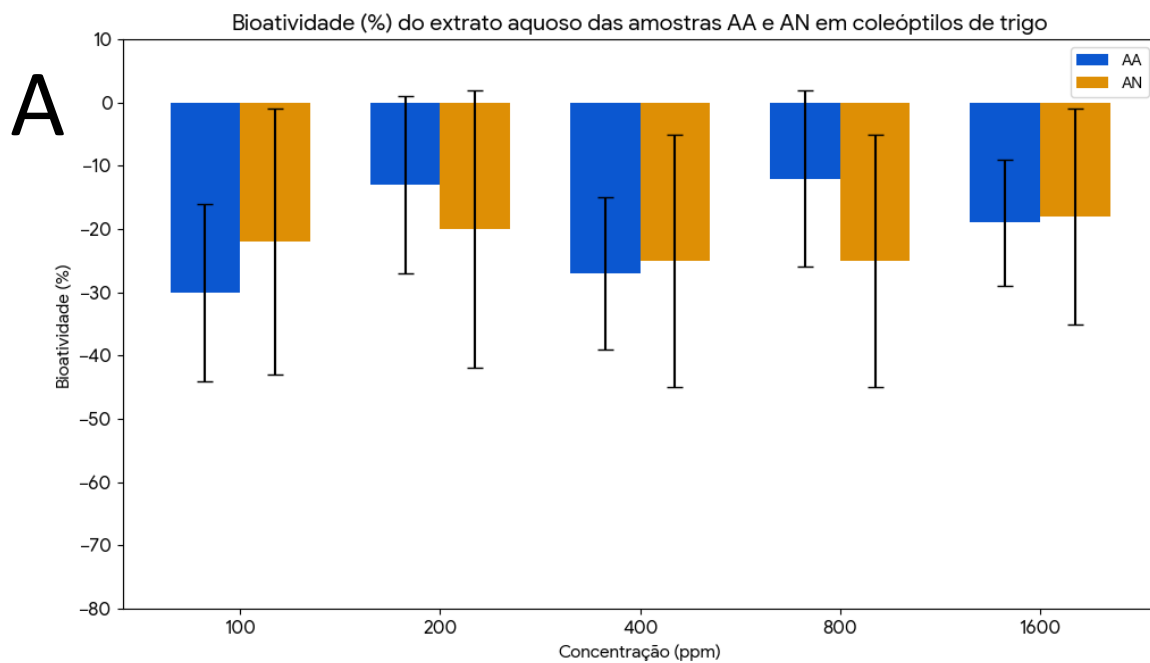
A identificação dos compostos bioativos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB), o mesmo laboratório que foi responsável pelas análises de LC-MS.

Para a identificação dos compostos, os dados de LC-MS foram processados e analisados utilizando os softwares Sirius e PeakView. Estes programas permitiram a elucidação estrutural preliminar dos metabólitos secundários com base em suas massas exatas, padrões de fragmentação e comparação com bancos de dados espectrais e bibliotecas de compostos. A correlação entre os perfis químicos e a atividade fitotóxica observada nos bioensaios foi um critério fundamental para a identificação dos compostos considerados bioativos.

6. RESULTADOS

6.1 Bioensaio de coleóptilos

Os resultados dos bioensaios das amostras AA e AN com os diferentes extratos analisados pode ser visto na Figura 1. Na Figura 2, são mostrados os resultados dos bioensaios das amostras com a cultura de *Sanionia uncinata*.



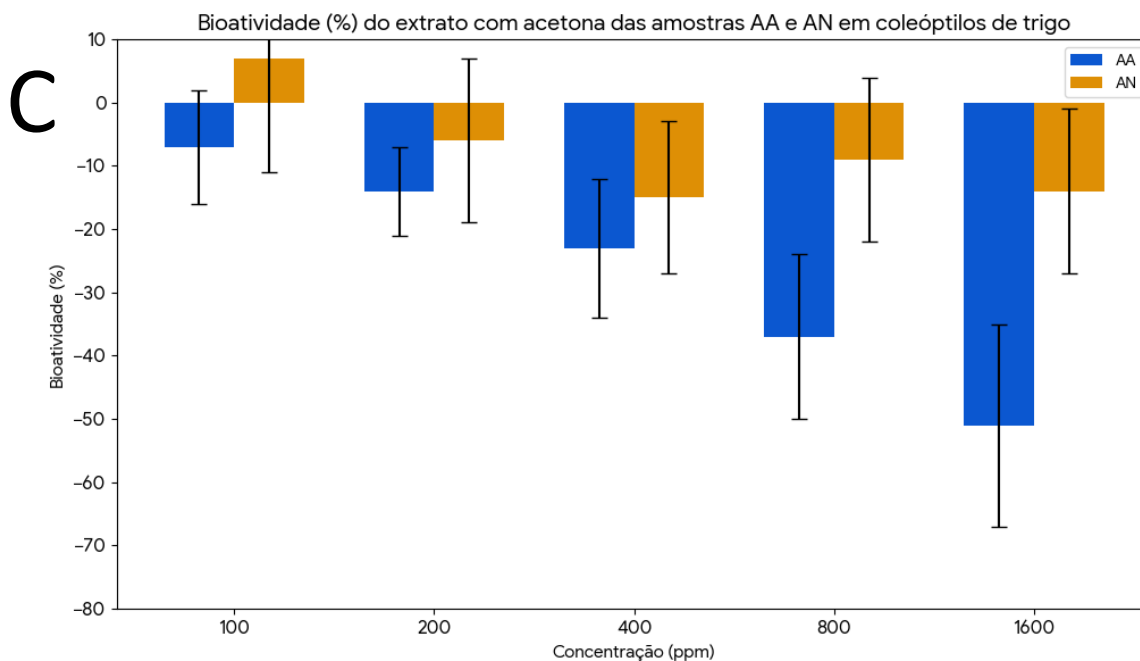


Figura 1. Bioatividade (%) dos extratos brutos de musgos das amostras AA (amostras antigas) (em azul) e AN (amostra novas) (em laranja) da Antártica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo em diferentes concentrações. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle, de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade do extrato aquoso. (B) Bioatividade do extrato de acetato de etila. (C) Bioatividade do extrato de acetona.

No extrato aquoso (Fig. 1, A), para a amostra AA (azul), não foi observada bioatividade estatisticamente significativa (n.s.) em nenhuma das concentrações analisadas. Para a amostra AN (laranja), foram observadas inibições significativas (b) de 22% na concentração de 100 ppm e de 25% na concentração de 800 ppm. Por outro lado, o extrato de acetato de etila (Fig. 1, B) apresentou inibições significativas (b) nas concentrações de 100 ppm (34%), 200 ppm (37%) e 400 ppm (34%) para a amostra AA, enquanto o extrato de acetona (Fig. 1, C) registrou-se inibições significativas (b) nas concentrações de 800 ppm (37%) e 1.600 ppm (51%) para a amostra AA. Em contraste, para a amostra AN, não foi detectada bioatividade estatisticamente significativa (n.s.) em nenhuma das concentrações testadas.

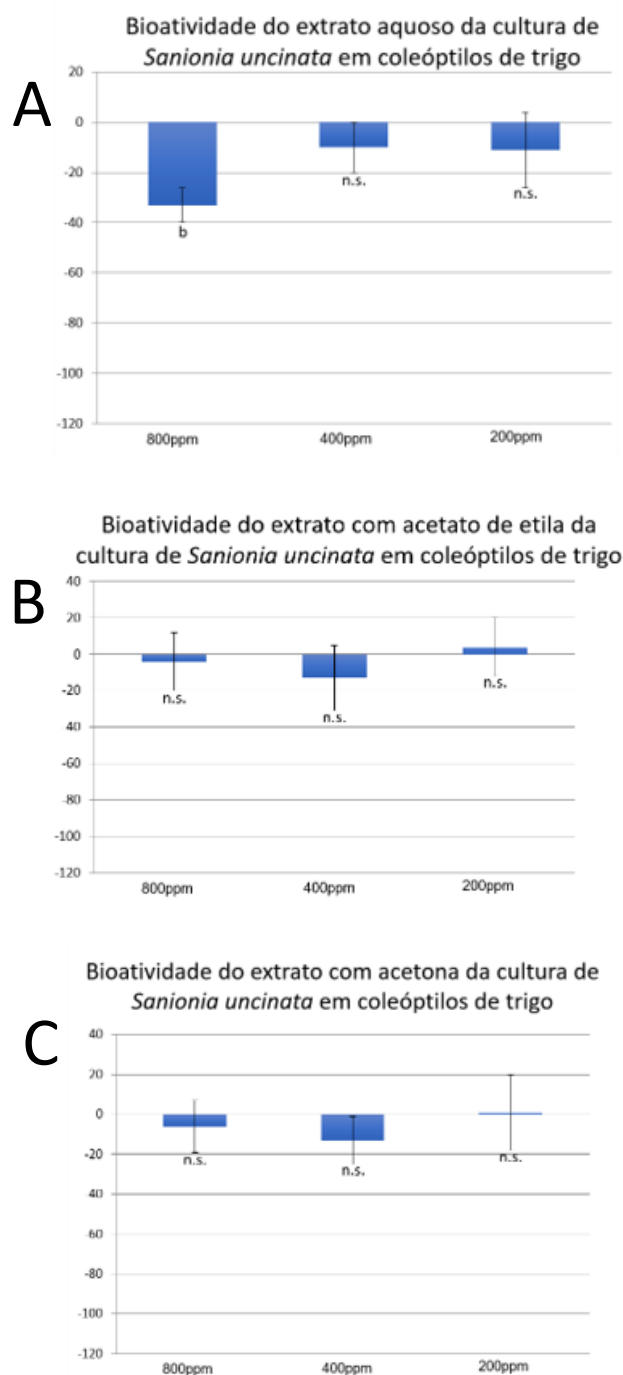
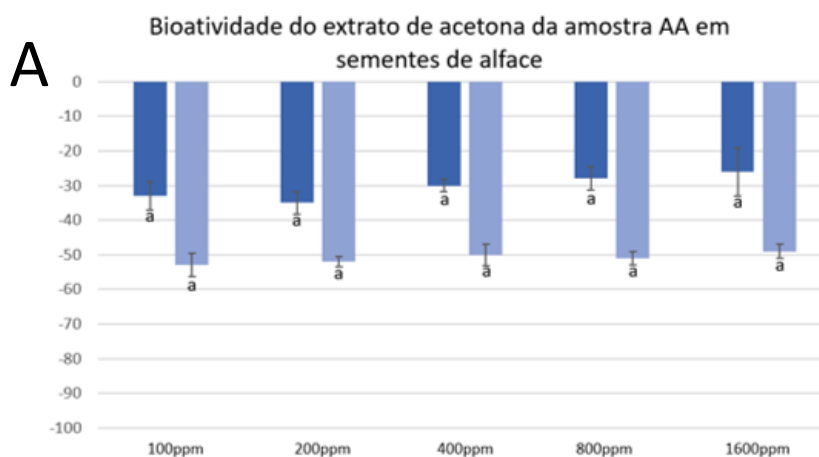


Figura 2. Bioatividade (%) dos extratos da cultura de *Sanionia uncinata* sobre o crescimento de coleóptilos de trigo em diferentes concentrações. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade do extrato aquoso da cultura de *Sanionia uncinata*. (B) Bioatividade do extrato com acetato de etila da cultura de *Sanionia uncinata*. (C) Bioatividade do extrato com acetona da cultura de *Sanionia uncinata*.

Observou-se uma inibição significativa (b) de 34% na concentração de 800 ppm no extrato aquoso da cultura de *Sanionia uncinata*. Nas concentrações de 400 ppm (10%) e 200 ppm (10%), não foi detectada bioatividade estatisticamente significativa (n.s.) (Fig. 2, A). No extrato com acetato de etila da cultura de *Sanionia uncinata*, não foi detectada bioatividade estatisticamente significativa (n.s.) em nenhuma das concentrações testadas. Os extratos apresentaram bioatividade variando de 0% a 8% (200 ppm, 800 ppm) a cerca de 15% (400 ppm), porém sem significância estatística (Fig. 2, B). Também não foi observada bioatividade estatisticamente significativa (n.s.) no extrato com acetona da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 2, C) em nenhuma das concentrações testadas. Os extratos apresentaram bioatividade variando de 0% (200 ppm) a cerca de 5% (800 ppm) e 10% (400 ppm), porém sem significância estatística.

6.2 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes

Para esse bioensaio, foi escolhido, inicialmente, o extrato com acetona da amostra AA. Posteriormente, o extrato com acetato de etila foi analisado que pode ser visto nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Os extratos da amostra AN não foram analisados.



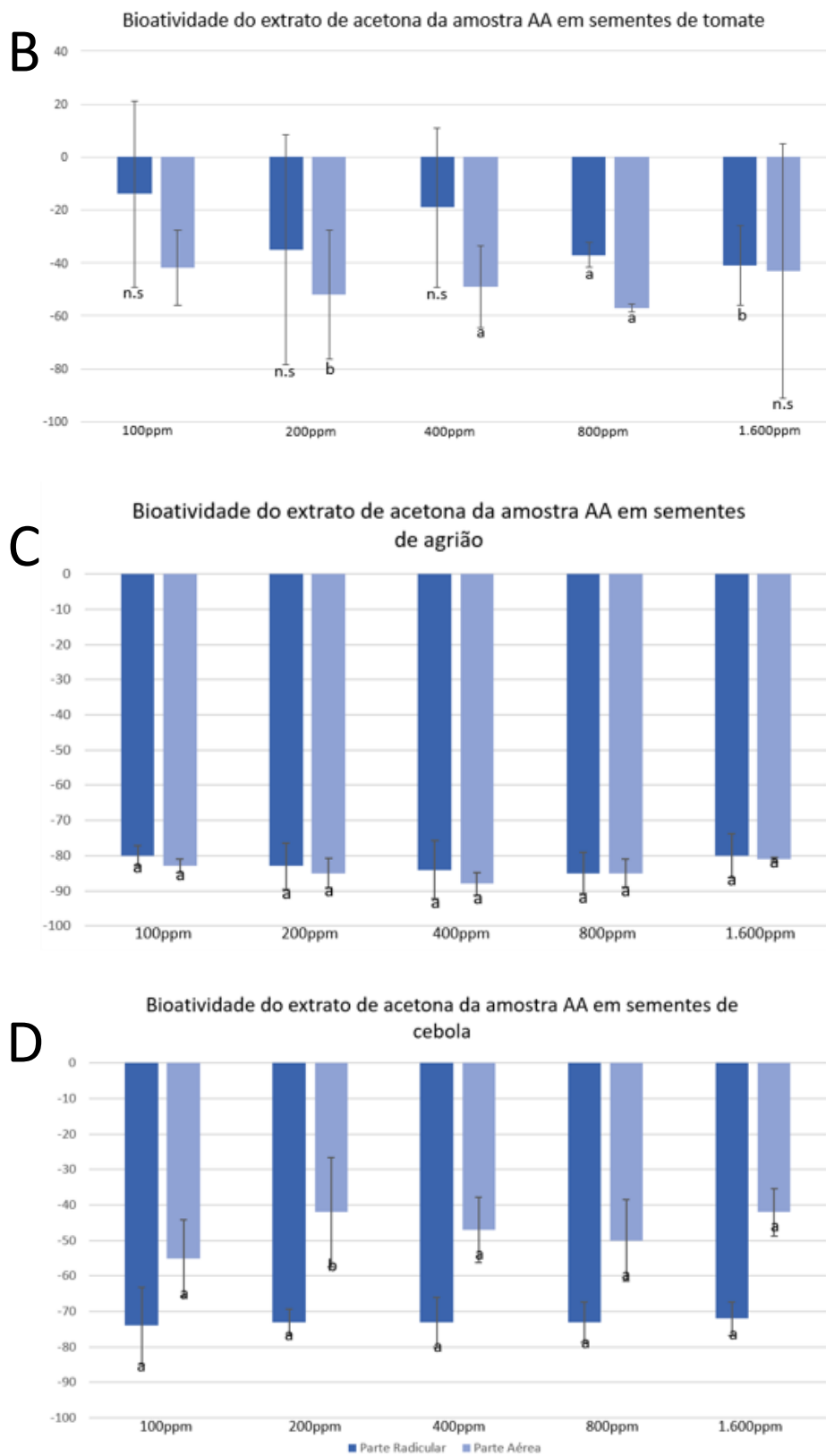


Figura 3. Bioatividade (%) do extrato de acetona da amostra antiga (AA) de musgos da Antártica sobre o crescimento da parte radicular e da parte aérea de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), agrião (*Nasturtium officinale*) e cebola (*Allium cepa*). As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação

ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste de Welch, onde: $a = p < 0,01$; $b = 0,01 < p < 0,05$; e $n.s. = p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). **(A)** Bioatividade em plântulas de Alface (*Lactuca sativa*). **(B)** Bioatividade em plântulas de Tomate (*Solanum lycopersicum*). **(C)** Bioatividade em plântulas de Agrião (*Nasturtium officinale*). **(D)** Bioatividade em plântulas de Cebola (*Allium cepa*).

Em plântula de alface, para a parte radicular, observou-se inibição altamente significativa (a) do extrato de acetona da amostra AA em todas as concentrações, variando de aproximadamente 26% (1600 ppm) a 35% (200 ppm). Os desvios padrão variaram de 1,8 a 6,9. Para a parte aérea, a inibição foi igualmente altamente significativa (a) em todas as concentrações, com valores entre 49% (1600 ppm) e 53% (100 ppm). Os desvios padrão variaram de 1,5 a 3,4 (Fig. 3, A). Por outro lado, em plântulas de tomate, para a parte radicular, não houve inibição estatisticamente significativa (n.s.) do extrato de acetona da amostra AA nas concentrações de 100 ppm (14%), 200 ppm (35%) e 400 ppm (19%). No entanto, observou-se inibição altamente significativa (a) de aproximadamente 37% a 800 ppm, e inibição significativa (b) de 41% a 1600 ppm. Os desvios padrão variaram de 4,7 a 43,4. Para a parte aérea, a inibição foi altamente significativa (a) nas concentrações de 100 ppm (42%), 400 ppm (49%) e 800 ppm (57%), e significativa (b) a 200 ppm (52%). A concentração de 1600 ppm (43%) não apresentou inibição estatisticamente significativa (n.s.). Os desvios padrão variaram de 1,5 a 48 (Fig. 3, B).

No agrião, a inibição da parte radicular do extrato de acetona da amostra AA foi altamente significativa (a) em todas as concentrações, variando de aproximadamente 80% (100 ppm e 1600 ppm) a 85% (800 ppm). Os desvios padrão foram baixos, entre 2,8 e 8,2. Para a parte aérea, também houve inibição altamente significativa (a) em todas as concentrações, variando de 81% (1600 ppm) a 88% (400 ppm). Os desvios padrão foram consistentemente baixos, entre 0,6 e 4,2 (Fig. 3, C).

Para as plântulas de cebola, observou-se inibição altamente significativa (a) do extrato de acetona da amostra AA em todas as concentrações, variando de 72% (1600 ppm) a 74% (100 ppm) na parte radicular. Os desvios padrão variaram de 3,6 a 10,9. Para a parte aérea, a inibição foi altamente significativa (a) nas concentrações de 100 ppm (55%), 400 ppm (47%), 800 ppm (50%) e 1600 ppm (42%). A 200 ppm, a inibição foi significativa (b) em aproximadamente 42%. Os desvios padrão variaram de 6,7 a 15,4 (Fig. 3, D).

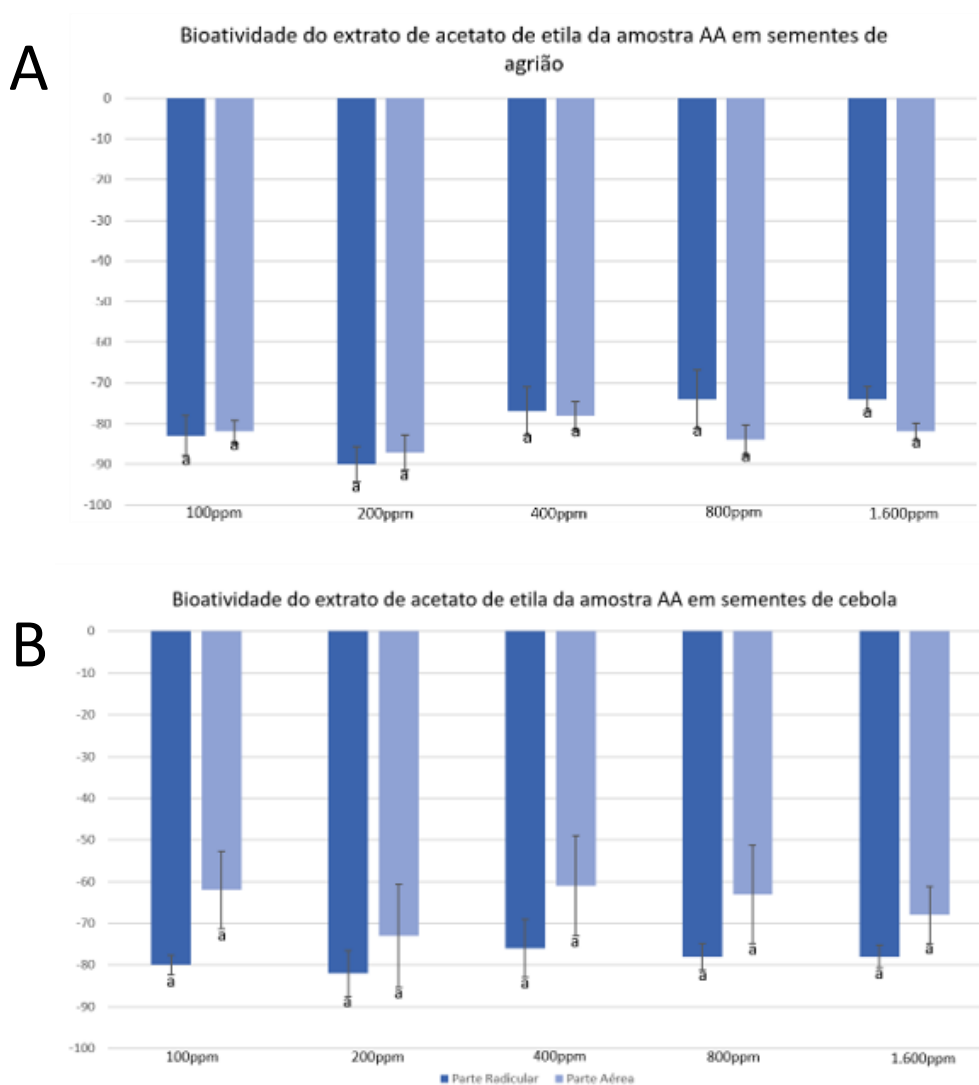


Figura 4. Bioatividade (%) do extrato de acetato de etila da amostra antiga (AA) de musgos da Antártica sobre o crescimento da parte radicular e da parte aérea de plântulas de agrião (*Nasturtium officinale*) e cebola (*Allium cepa*). As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística altamente significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$. O eixo X representa as concentrações dos extratos em partes por milhão (ppm). (A) Bioatividade em plântulas de Agrião (*Nasturtium officinale*). (B) Bioatividade em plântulas de Cebola (*Allium cepa*).

A inibição da parte radicular do extrato de acetato de etila da amostra AA em plântulas de agrião foi altamente significativa (a) em todas as concentrações, com valores que variaram de 74% (800 ppm e 1600 ppm) a 90% (200 ppm). Os desvios padrão foram relativamente baixos, entre 3,2 e 7,3. Para a parte aérea, a inibição foi igualmente

altamente significativa (a) em todas as concentrações, com valores entre 78% (400 ppm) e 87% (200 ppm). Os desvios padrão variaram de 2,1 a 4,3 (Fig. 4, A).

Em plântulas de cebola, para a parte radicular, a inibição do extrato de acetato de etila da amostra AA foi altamente significativa (a) em todas as concentrações, variando de 76% (400 ppm) a 82% (200 ppm). Os desvios padrão foram consistentemente baixos, entre 2,3 e 7,0. Para a parte aérea, também houve inibição altamente significativa (a) em todas as concentrações, variando de 61% (400 ppm) a 73% (200 ppm). Os desvios padrão variaram de 6,8 a 12,4 (Fig. 4, B).

6.3 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Os resultados da cromatografia de camada delgada (CCD) das amostras AA e da cultura de *Sanionia uncinata* podem ser observadas nas Figuras 5 e 6 respectivamente.

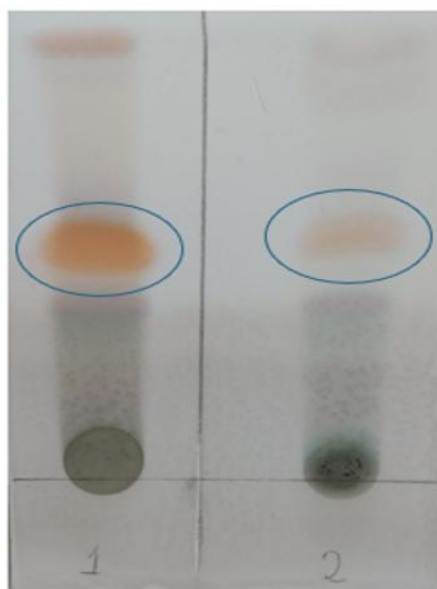


Figura 5. Cromatograma em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos da amostra antiga (AA) de musgo. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento. **Pista 1:** extrato de acetona da amostra AA. **Pista 2:** extrato de acetato de etila da amostra AA.

Os círculos azuis na Figura 5 destacam as manchas mais proeminentes dos compostos. Observa-se que a Pista 1 (extrato de acetona) apresenta uma mancha principal

mais intensa e de coloração alaranjada em comparação com a Pista 2 (extrato de acetato de etila), sugerindo uma maior concentração ou uma diferença no perfil de compostos presentes nessa fração de polaridade.



Figura 6. Cromatograma em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos da cultura de *Sanionia uncinata*. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento. **Pista 1:** extrato de acetona da cultura de *Sanionia uncinata*. **Pista 2:** extrato de acetato de etila da cultura de *Sanionia uncinata*.

O cromatograma da Figura 6 revela perfis de compostos distintos para cada extrato. A Pista 1 (extrato de acetona) exibe várias bandas bem resolvidas e de diversas colorações (tons de roxo, verde e azul), indicando a presença de uma variedade de metabólitos secundários. Em contraste, a Pista 2 (extrato de acetato de etila) mostra um perfil mais difuso e agrupado, com uma banda azul-esverdeada proeminente, sugerindo uma menor resolução ou uma distribuição diferente de compostos nessa polaridade. Ambas as pistas apresentam material na linha de base, indicando compostos de alta polaridade retidos.

6.4 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA

Os resultados da cromatografia de camada delgada (CCD) do fracionamento do extrato de acetona da amostra AA, seguindo as especificações descritas na Tabela 2, é apresentado na Figura 7.

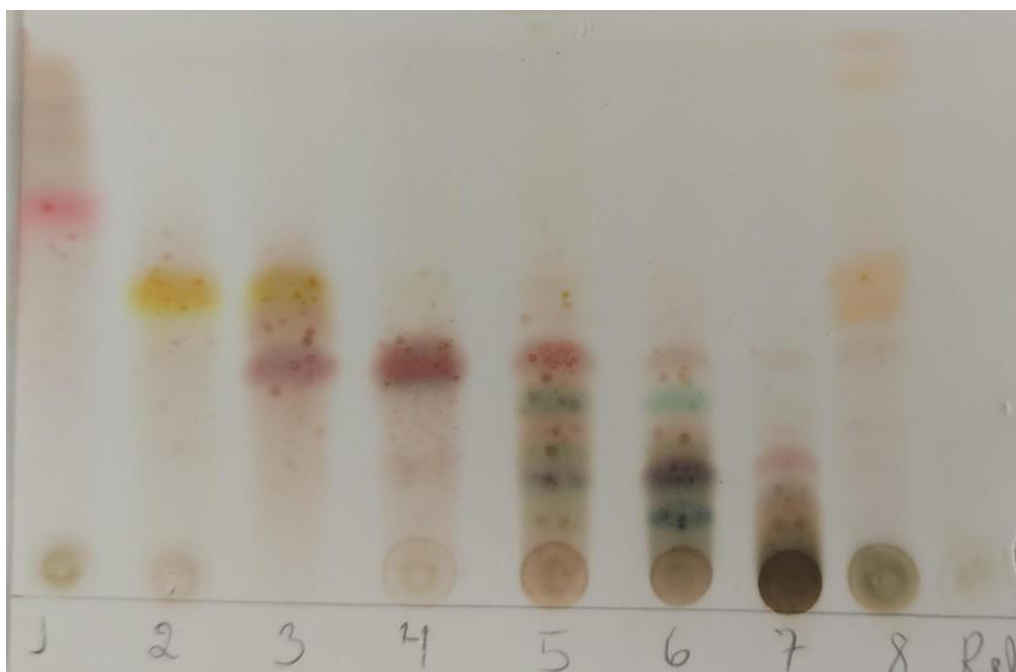


Figura 7. Cromatograma em camada delgada (CCD) das frações agrupadas obtidas da cromatografia de coluna do extrato de acetona da amostra antiga (AA) de musgo. A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel, e revelada por imersão em solução de oleum seguida de aquecimento, conforme descrito na seção 5.6. As pistas representam frações agrupadas de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos observados em CCD, além do extrato bruto utilizado como referência.

O cromatograma demonstra a separação efetiva dos componentes do extrato bruto nas diversas frações agrupadas (Fig. 7). Observa-se uma variação nos perfis de manchas entre as pistas, com diferentes colorações (tons de roxo, azul, verde e laranja/marrom), indicando uma boa resolução e heterogeneidade química dos compostos presentes em cada agrupamento de frações. O perfil da pista de referência (Ref) reflete a complexidade do extrato bruto, enquanto as pistas das frações agrupadas mostram os compostos enriquecidos e/ou purificados.

Os resultados do bioensaio de coleóptilos de trigo para o fracionamento das amostras AA no extrato de acetona na concentração de 332 ppm podem ser observados na Figura 8.

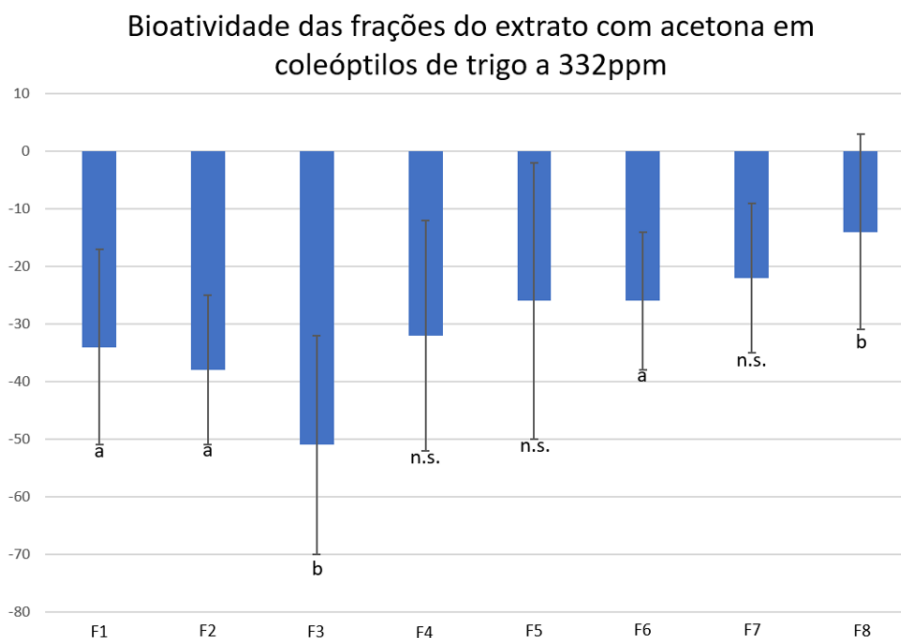


Figura 8. Bioatividade (%) das frações agrupadas do extrato de acetona (amostra AA) sobre o crescimento de coleóptilos de trigo na concentração de 332 ppm. As barras representam a média da bioatividade (%), e as linhas verticais indicam o desvio padrão. Letras abaixo das barras denotam diferença estatística significativa em relação ao controle (0% de bioatividade), de acordo com o Teste t de Student, onde: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; e n.s. = $p > 0,05$.

As frações F1 e F2 apresentaram inibições altamente significativas ($p < 0,01$) de 34% e 38%, respectivamente. A fração F3 demonstrou a maior inibição entre todas as frações testadas, de 51%, sendo este efeito significativo ($p < 0,05$). Entretanto, as frações F4 e F5 exibiram inibições de 32% e 26%, respectivamente, porém estas não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Por outro lado, a fração F6, com inibição de 26%, tendo um valor similar à F5, mostrou-se altamente significativa ($p < 0,01$). As frações F7 e F8 apresentaram inibições de 22% (não significativa) e 14% (significativa, $p < 0,05$), respectivamente.

6.5 Testes fitoquímicos preliminares

Os resultados dos testes fitoquímicos preliminares para a detecção da presença de fenol, terpeno e alcaloide podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos Testes Fitoquímicos Preliminares para Extratos Brutos de *Sanionia uncinata* da Amostra AA e da Cultura

Extrato/Amostra	Terpenos	Fenóis	Alcaloides
Amostra AA - Extrato de Acetona	+	-	-
Amostra AA - Extrato de Acetato de Etila	+	-	-
Cultura <i>S. uncinata</i> - Extrato de Acetona	+	-	-
Cultura <i>S. uncinata</i> - Extrato de Acetato de Etila	+	-	-

Legenda:

+: Presença do metabólito

-: Ausência do metabólito

6.5.1 Fenol

Os resultados para a presença de fenóis em extratos da amostra AA e da cultura *Sanionia uncinata* são mostrados na Figura 9.

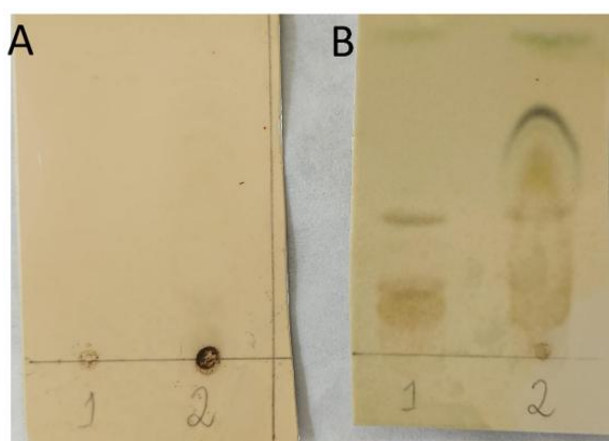


Figura 9. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de fenóis em extratos do tapete de musgo da amostra antiga (A) e da cultura de *Sanionia uncinata* (B). As placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram desenvolvidas utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel. A revelação foi realizada pela aplicação de solução de cloreto de ferro III (FeCl₃) a 1%. A presença de fenóis seria indicada pelo surgimento de coloração preta ou azul-escura.

Em ambas as placas, a ausência de coloração preta ou azul-escura sugere que não houve detecção de fenóis nos extratos da amostra AA (Fig. 9, A) e da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 9, B) utilizando este teste preliminar.

6.5.2 Terpeno

Os resultados para a presença de terpenos em extratos da amostra AA e da cultura *Sanionia uncinata* são mostrados na Figura 10.

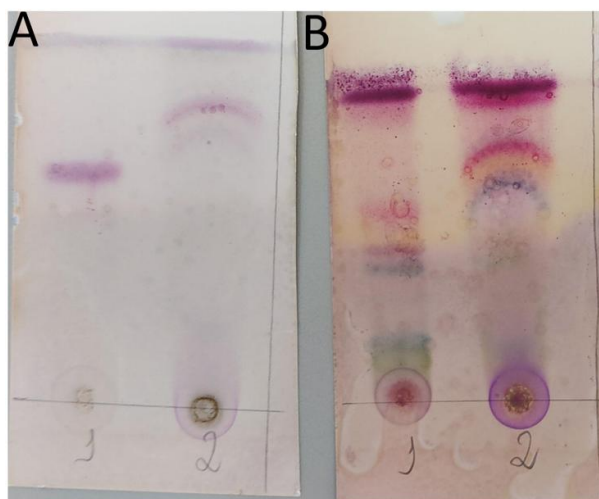


Figura 10. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de terpenos em extratos do tapete de musgo da amostra antiga (A) e da cultura de *Sanionia uncinata* (B).

As placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram desenvolvidas utilizando hexano:acetona (80:20 v/v) como fase móvel. A revelação foi realizada pela aplicação de uma solução de anisaldeído-ácido sulfúrico (preparada com 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico), seguida de aquecimento direto. A coloração rosada a avermelhada/roxa nas manchas indica a presença de terpenos.

Nos extratos da amostra AA (Fig. 10, A), observa-se a formação de uma mancha rosada de intensidade moderada em R_f intermediário, além de uma mancha tênue próxima

à linha de base na Pista 1, enquanto a Pista 2 apresenta uma mancha rosada de maior intensidade na linha de base e uma mancha mais fraca em Rf superior, indicando a presença de terpenos com diferentes polaridades.

Por outro lado, os extratos da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 10, B), na Pista 1, revela múltiplas bandas de coloração roxa/rosada intensa, bem distribuídas ao longo da pista, sugerindo uma alta concentração e diversidade de terpenos neste extrato. A Pista 2 também apresenta uma mancha muito intensa e concentrada na linha de base, de coloração roxa/rosada escura, e algumas manchas mais difusas em Rf superiores, indicando alta concentração de terpenos, possivelmente mais polares ou agregados.

6.5.3 Alcaloide

Os resultados para a presença de alcaloides em extratos da amostra AA e da cultura *Sanionia uncinata* são mostrados na Figura 11.



Figura 11. Resultado do teste fitoquímico preliminar para a presença de alcaloides em extratos do tapete de musgo da amostra antiga e da cultura de *Sanionia uncinata*. As amostras foram submetidas ao teste de alcaloides utilizando o reagente de Dragendorff, conforme metodologia descrita na seção 5.9.3. A presença de alcaloides é indicada pela formação de um precipitado colorido nos tubos. **Tubo A:** Extrato com acetato de etila da amostra AA. **Tubo B:** Extrato com acetona da amostra AA. **Tubo C:** Extrato com acetato de etila da amostra da cultura de *Sanionia uncinata*. **Tubo D:** Extrato com acetona da amostra da cultura de *Sanionia uncinata*.

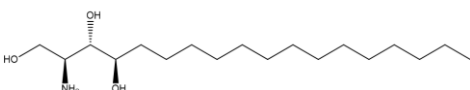
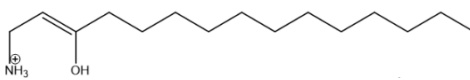
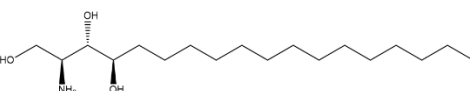
Visualmente, não foi observada a formação de precipitado colorido em nenhum dos tubos (A, B, C e D). Isso sugere a ausência de alcaloides detectáveis nos extratos testados da amostra AA e da cultura de *Sanionia uncinata* sob as condições deste teste preliminar.

6.6 Identificação dos compostos bioativos

Os resultados da identificação dos compostos bioativos podem ser vistos na Tabela 4.

Como resultado das análises de LC-MS e do processamento dos dados pelos softwares Sirius e PeakView, foi elucidado a identificação estrutural dos metabólitos secundários. Os compostos bioativos são apresentados na Tabela 4. Contudo, é importante destacar que a identificação estrutural completa dos terpenos, que foram detectados como abundantes nos testes fitoquímicos preliminares (Seção 7.5.2), ainda está em andamento.

Tabela 4. Identificação dos compostos bioativos encontrados no extrato de acetona das amostras AA através de LC-MS

Molécula	Estrutura	Propriedades
Fitoesfingosina C18 (t18:0)		Fórmula molecular: $C_{18}H_{39}NO_3$ Massa molecular: $317.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Fitoesfingosina C16 (t16:0)		Fórmula molecular: $C_{16}H_{35}NO_3$ Massa molecular: $289.45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Hexadecaesfinganina (d16:0)		Fórmula molecular: $C_{16}H_{35}NO_2$ Massa molecular: $273.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

7. DISCUSSÃO

7.1 Bioensaio de coleóptilos

7.1.1 Bioatividade de extratos de musgos antárticos das amostras AA e AN em coleóptilos de trigo

Os bioensaios de coleóptilos de trigo revelaram que os extratos brutos do tapete de musgos da Antártica das amostras AA e AN possuem bioatividade fitotóxica que se manifesta como inibição do crescimento do coleóptilo.

O extrato aquoso da amostra AN (Fig. 1, A) demonstrou inibições significativas de 22% (a 100 ppm) e 25% (a 800 ppm). Esse achado é corroborado pela literatura na qual, em diversos estudos, o extrato aquoso apresentou bioatividade, pois a extração aquosa mimetiza a liberação natural de substâncias químicas no ambiente, como a lixiviação pela chuva ou orvalho (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Além disso, estudos prévios já demonstraram que as briófitas antárticas possuem a capacidade de inibir a germinabilidade de esporos de outras briófitas através de interações alelopáticas, como observado entre espécies de *Polytrichum* e *Sphagnum* (Bu *et al.*, 2017).

No extrato de acetato de etila da amostra AA observou-se bioatividade inibitória já nas menores concentrações (34% a 100 ppm, 37% a 200 ppm, 34% a 400 ppm) (Fig. 1, B). Em concentrações mais altas (800 e 1.600 ppm), essa inibição não se intensifica, indicando que o efeito inibitório pode atingir um platô nessas doses. Esse padrão sugere que os compostos presentes no extrato de acetato de etila apresentam atividade inibitória consistente, mas aumentar a concentração não necessariamente amplifica esse efeito. Por outro lado, na amostra AN (Fig. 1, B), o extrato de acetato de etila apresentou uma resposta dependente de dose em que doses mais concentradas (800 e 1.600 ppm) possuem uma bioatividade inibitória mais acentuada (Wu *et al.*, 2024).

Observou-se um contraste marcante ao comparar a bioatividade dos extratos de acetona das amostras AA e AN nesse mesmo bioensaio. O extrato de acetona da amostra AA apresentou inibições significativas de 37% na concentração de 800 ppm e 51% na concentração de 1.600 ppm (Fig. 1, C), enquanto o extrato de acetona da amostra AN (Fig. 1, C) não demonstrou bioatividade estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações testadas.

Essa diferença na atividade fitotóxica pode ser atribuída às distintas condições de armazenamento às quais as amostras foram submetidas. A amostra AA permaneceu em temperatura ambiente por seis meses antes de ser refrigerada, enquanto a amostra AN foi armazenada integralmente em congelador, sem exposição prolongada a temperaturas mais elevadas.

A exposição por longos períodos do material vegetal a temperaturas ambientes pode induzir alterações significativas no perfil dos metabólitos secundários. Fatores ambientais, como temperatura, luz e umidade, influenciam a produção, a estrutura química e o grau de atividade dos metabólitos, podendo ocorrer degradação, transformação ou, até mesmo, formação de novos compostos bioativos (Bhattarai *et al.*, 2008; Turnbull *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2021; Kulshrestha *et al.*, 2022).

Essa variação observada na bioatividade fitotóxica dos extratos de acetona reforça a importância de protocolos de coleta e armazenamento para garantir que a bioatividade observada reflita o potencial químico *in situ*. Na Antártica, em que as condições ambientais são extremas, fatores como a variação acentuada da temperatura, os longos períodos de luminosidade, os microclimas, a ecologia microbiana do solo e a dinâmica de degradação de substâncias, podem ser um fator relevante para a alelopatia em campo (Inderjit & Weston, 2000; Reigosa *et al.*, 2013). Essas condições extremas afetam a planta e sua microbiota associada. Assim, parte da diferença de bioatividade entre as Amostras Antigas e Novas pode refletir a degradação pós-coleta e o estado fisiológico e ecológico dos tapetes de musgos no momento da coleta. Portanto, estudos futuros deverão focar em abordagens mais integradas, combinando análises químicas laboratoriais com experimentos de campo que avaliem e validem os achados em bioensaios.

7.1.2 Bioatividade de extratos de cultura de *Sanionia uncinata* em coleóptilos de trigo

Como já mencionado na seção 7.1.1, o extrato aquoso da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 2, A) simula a liberação natural de metabólitos secundários no ambiente antártico. Assim, a ausência de bioatividade significativa nos extratos orgânicos para *S. uncinata* (Fig. 2, B e C) sugere que os compostos bioativos mais relevantes para a alelopatia em condições naturais (solúveis em água) são os principais responsáveis pela interferência no crescimento do coleóptilo de trigo.

Além disso, a ausência significativa de bioatividade nos extratos de cultura pode estar associada, em parte, à falta ou alteração da microbiota simbiótica naturalmente presente nos tapetes de musgos. Estudos prévios demonstraram que *S. uncinata* contém fungos e bactérias endofíticos que podem modular a fisiologia das plantas, influenciando na produção de metabólitos secundários (Park *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2023). Desse modo, a cultura axênica de *S. uncinata* pode exibir um perfil fitoquímico diferente daquele observado em ambiente natural, o que explicaria a alteração da atividade fitotóxica, principalmente nos extratos orgânicos.

7.2 Bioensaio de fitotoxicidade em sementes

Este bioensaio de fitotoxicidade revelou uma ampla atividade inibitória dos extratos de acetona e acetato de etila da amostra AA. Ao contrário do bioensaio de coleótilos de trigo, este apresenta resultados que demonstram uma capacidade fitotóxica mais pronunciada da amostra AA quando são aplicados em sementes de alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), agrião (*Nasturtium officinale*) e cebola (*Allium cepa*).

Esses resultados demonstram a presença de fitoquímicos na amostra AA (Figs. 2 e 3), obtidos por procedimentos de extração não naturais para potencializar a solubilidade de compostos químicos e maximizar a liberação de substâncias bioativas do material vegetal (Reigosa *et al.*, 2013). Embora esses métodos não mimetizem a liberação natural de aleloquímicos, a alta bioatividade e consistência da inibição observadas em plântulas de espécies-alvo sensíveis para esses extratos são indicadores do potencial fitotóxico presente nesses tapetes de musgos (Bhattarai *et al.*, 2008). A diversidade de produtos naturais em briófitas, como terpenos e flavonoides, é bem relatada em diversos estudos e muitos desses compostos possuem uma ampla gama de bioatividades (Chen *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2018; Ludwiczuk & Asakawa, 2019; Commisso *et al.*, 2021; Horn *et al.*, 2021; Dziwak *et al.*, 2022), o que poderia explicar os resultados obtidos em diferentes plântulas.

A ausência de uma resposta inibitória dependente de dose, observada principalmente para o agrião (Figs. 3, C e 4, A) e para a cebola (Figs. 3, D e 4, B) em ambos os extratos, em que as inibições se mantiveram elevadas e consistentes em diferentes concentrações, sugere que a menor concentração testada (100 ppm) pode ter

sido o suficiente para induzir o efeito inibitório máximo nas plântulas. Isso implica que a dose de 100 ppm e as demais concentrações estavam acima do limiar de saturação necessário para ocorrer a resposta fitotóxica completa. Se os sítios de ação dos fitoquímicos na planta receptora estão saturados ou as vias metabólicas são inibidas, o aumento da concentração não representará uma resposta mais acentuada, resultando em um platô na curva dose-resposta (Belz *et al.*, 2005; Dubey, 2016; Eze *et al.*, 2021; Guedes *et al.*, 2023).

Ademais, os extratos orgânicos são misturas de diversos metabólitos secundários (Reigosa *et al.*, 2013; Horn *et al.*, 2021; Vaou *et al.*, 2022), com possíveis efeitos sinérgicos, o que pode contribuir para a independência de dose aparente (Belz *et al.*, 2005; Boik *et al.*, 2009; Dilipkumar & Chuah, 2013; Zuo *et al.*, 2016; Pardo-Muras *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022). Assim, a combinação de diversos compostos pode atingir mais rapidamente o limiar de toxicidade máxima, mesmo em concentrações que, para um único composto isolado, seriam subletais (Boik *et al.*, 2009; Pardo-Muras *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022).

Deve-se considerar também que os tapetes de musgos atuam como microecossistemas complexos (Yu *et al.*, 2018), contendo bactérias e fungos endofíticos, cianobactérias epifíticas (Solheim & Zielke, 2003) e microfauna, que interagem entre si e com o hospedeiro. Assim, essas interações influenciam a quantidade, a produção, a liberação e o tipo de metabólito secundário (Zhang *et al.*, 2013). Desse modo, a microbiota associada aos musgos antárticos contribui para a síntese, modulação e/ou acúmulo de compostos bioativos. Essas interações complexas podem indicar a bioatividade observada nas sementes, principalmente, de agrião e de cebola com os extratos orgânicos das Amostras Antigas (AA).

Portanto, a ausência de uma relação dose-resposta destaca a importância de explorar faixas de concentração ainda menores em estudos futuros para identificar o limiar de atividade e a verdadeira curva de dose-resposta desses fitoquímicos. Assim, compreender se os musgos antárticos podem atuar como uma barreira química natural contra a invasão de espécies exóticas é fundamental para a conservação da frágil biodiversidade polar.

7.3 Cromatografia de camada delgada (CCD)

A análise por cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos das amostras de musgo (Amostra Antiga e cultura de *Sanionia uncinata*) forneceu compreensões visuais sobre a diversidade e polaridade dos metabólitos secundários presentes (Gocan, 2002; Bele & Khale, 2010; Peters *et al.*, 2019). A CCD, mesmo sendo uma técnica de triagem qualitativa, é fundamental para visualizar o perfil bruto de compostos e guiar etapas posteriores de purificação (Jesionek *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2021).

Para a AA, o cromatograma (Fig. 5) revelou perfis de polaridade distintos entre o extrato de acetona (Pista 1) e o extrato de acetato de etila (Pista 2) (Bele & Khale, 2010). A Pista 1 (extrato de acetona) exibiu uma mancha mais intensa e alaranjada, possivelmente em maior concentração ou com maior visibilidade sob a metodologia utilizada. Entretanto, a Pista 2 (extrato de acetato de etila) mostrou uma mancha alaranjada mais tênue e difusa na mesma região de polaridade.

A diferença encontrada nos perfis cromatográficos de AA pode ser relacionada com as maiores inibições observadas para o extrato de acetona nos bioensaios de fitotoxicidade em plântulas de alface, agrião e cebola (Fig. 3). Manchas mais intensas e coloridas no extrato de acetona podem indicar maior concentração de compostos fitoquímicos bioativos (Jesionek *et al.*, 2015). Compostos como terpenos e flavonoides são abundantes em briófitas e podem ser extraídos por solventes orgânicos como acetona e acetato de etila (Chen *et al.*, 2018; Ludwiczuk & Asakawa, 2019; Horn *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2024).

No cromatograma da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 6), a Pista 1 (extrato de acetona) exibiu uma variedade de bandas coloridas (tons de roxo, verde e azul), indicando uma complexa mistura de metabólitos secundários de diversas polaridades. Em contraste, a Pista 2 (extrato de acetato de etila) mostrou um perfil mais agrupado com uma banda azul-esverdeada proeminente.

A presença de material na linha de base em ambas as pistas para *S. uncinata* sugere a existência de compostos de alta polaridade que foram retidos na fase estacionária (Gocan, 2002; Zapała & Waksmundzka-Hajnos, 2005; Bele & Khale, 2010). As briófitas, em geral, são quimicamente complexas e produzem diversos metabólitos secundários (Chen *et al.*, 2018; Ludwiczuk & Asakawa, 2019; Horn *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2024).

Apesar do bioensaio com a cultura de *S. uncinata* tenha mostrado uma inibição significativa apenas no extrato aquoso a 800 ppm, e não nos extratos orgânicos (Fig. 6), o perfil rico em bandas visíveis por CCD nesses extratos orgânicos sugere que muitos compostos foram extraídos, mas talvez em concentrações sub-limiar ou com efeitos sinérgicos/antagônicos complexos que não se manifestaram nos bioensaios de laboratório (Inderjit & Weston, 2000; Boik *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2016; Pardo-Muras *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022).

Além disso, culturas axênicas, como a da *S. uncinata*, podem alterar o perfil fitoquímico do musgo. A contaminação de fungos endofíticos, mesmo após os procedimentos de esterilização, evidencia o grau de associação entre briófitas e sua microbiota (Chen *et al.*, 2022; Misic *et al.*, 2025). A eliminação completa dos simbiossiontes naturais pode alterar o perfil dos compostos bioativos produzidos pela planta e reduzir sua bioatividade observada nos bioensaios de coleóptilos de trigo e de fitotoxicidade em sementes.

7.4 Fracionamento do extrato de acetona da amostra AA

O bioensaio de coleóptilos de trigo com as frações do extrato de acetona da amostra AA, em uma concentração fixa de 332 ppm (Fig. 8), revelou que nem todas as frações mantiveram a bioatividade fitotóxica significativa observada no extrato bruto.

Esses resultados indicam que o fracionamento por cromatografia de coluna foi eficaz em separar e concentrar os compostos bioativos em frações específicas. Desse modo, a maior inibição observada na F3 é um forte indicativo de que esta fração contém uma maior concentração de compostos ativos ou uma combinação mais potente. Além disso, essa separação permite inferir que a bioatividade observada no bioensaio de coleóptilos de trigo em determinadas frações pode ser atribuída ao enriquecimento ou purificação de compostos específicos, enquanto a perda de significância em outras pode ser devida à diluição de compostos ativos ou à separação de misturas sinérgicas (Inderjit & Weston, 2000; Boik *et al.*, 2009; Reigosa *et al.*, 2013; Zuo *et al.*, 2016; Pardo-Muras *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022).

A CCD do fracionamento do extrato de acetona da amostra AA (Fig. 7) demonstra a separação efetiva dos componentes do extrato bruto em diversas frações agrupadas. As variações nos perfis de manchas entre as pistas, com diferentes colorações, indicam uma

heterogeneidade química substancial dos compostos presentes em cada agrupamento de frações (Gocan, 2002; Bele & Khale, 2010; Jesionek *et al.*, 2015).

7.5 Testes fitoquímicos preliminares

Os testes fitoquímicos preliminares, realizados com os extratos orgânicos da amostra AA e da cultura de *Sanionia uncinata*, fornecem informações sobre a natureza química das substâncias responsáveis pela bioatividade observada nos bioensaios anteriores.

7.5.1 Fenol

Os testes para a presença de fenóis não detectaram a formação de coloração preta ou azul-escura em nenhuma das placas para a amostra AA (Fig. 10, A) ou para a cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 10, B). Isso sugere a ausência de fenóis detectáveis por este método nos extratos orgânicos analisados (Tabela 3).

Apesar dos fenóis serem o segundo maior grupo de produtos naturais em briófitas e desempenhem papéis importantes na tolerância ao estresse e na alelopatia (Peters *et al.*, 2019; Horn *et al.*, 2021), sua ausência aparente nesses extratos pode indicar que os terpenos são os principais constituintes químicos bioativos nestas frações, ou que os fenóis estão presentes em concentrações muito baixas ou em formas que não reagem com o reagente de FeCl₃ nessas condições.

7.5.2 Terpeno

Os resultados indicaram a presença de terpenos em todas as amostras analisadas (Tabela 3). Para os extratos da amostra AA (Fig. 9, A), a formação de manchas rosadas confirmou a existência de terpenos, com perfis distintos de polaridade para o extrato de acetona (Pista 1) e o extrato de acetato de etila (Pista 2). Essa diversidade de terpenos é consistente com a composição química esperada em briófitas. A presença de terpenos é relevante, pois são a maior classe de produtos naturais em briófitas, além serem conhecidos por possuírem diversas bioatividades (Ludwiczuk & Asakawa, 2019; Horn *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2024). Portanto, os terpenos presentes nesse extrato podem estar

relacionados à bioatividade fitotóxica observada nos bioensaios de fitotoxicidade em sementes para os extratos orgânicos da amostra AA.

Para os extratos da cultura de *Sanionia uncinata* (Fig. 9, B), a formação de bandas roxas/rosadas intensas e bem distribuídas na Pista 1 (extrato de acetona), e uma mancha muito intensa na linha de base na Pista 2 (extrato de acetato de etila), também confirmou a presença de terpenos. A ausência de uma bioatividade estatisticamente significativa nos bioensaios de coleótilos de trigo pode ser atribuída a fatores como concentrações sub-limiáres dos compostos bioativos, interações sinérgicas/antagônicas na mistura ou a uma menor sensibilidade do bioensaio de coleótilo para *S. uncinata* em comparação com a amostra AA (Boik *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2016; Pardo-Muras *et al.*, 2022; Vaou *et al.*, 2022).

7.5.3 Alcaloide

O teste preliminar para alcaloides não resultou na formação de precipitado colorido em nenhum dos extratos testados (Fig. 11). Isso sugere a ausência de alcaloides detectáveis nas amostras sob as condições deste teste (Tabela 3). Essa descoberta está alinhada com a literatura de que metabólitos secundários contendo nitrogênio, como os alcaloides, são raros em briófitas em comparação com as angiospermas (Salm *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 2021). Portanto, os alcaloides provavelmente não são os compostos ativos responsáveis pela bioatividade observada nos bioensaios.

7.6 Compostos bioativos

A análise fitoquímica do extrato AA de acetona revelou a presença de bases de cadeia longa (LCBs do inglês *long-chain bases*) do tipo esfingolípido (SLs do inglês *sphingolipids*), tais como a fitoesfingosina C18 (t18:0), a fitoesfingosina C16 (t16:0) e a hexadecaesfinganina (d16:0) (Tabela 4). Esses compostos são componentes das membranas celulares dos eucariotos, desempenhando papéis na estrutura, sinalização e imunidade (Pata *et al.*, 2010; Mamode Cassim *et al.*, 2020; Zeng & Yao, 2022).

Fitoesfingosina C18

A fitoesfingosina C18 (t18:0) é a LCB tri-hidroxi mais abundante e característica das plantas (Michaelson *et al.*, 2016; Mamode Cassim *et al.*, 2020), apresentando efeitos biológicos relevantes. A t18:0 atua como um mecanismo de *feedback* negativo na biossíntese total de SLs (Kimberlin *et al.*, 2013).

A ausência da fitoesfingosina C18 em mutantes de *Physcomitrella patens*, musgo modelo utilizado em estudos fisiológicos, e de *Arabidopsis thaliana* acarreta o acúmulo de precursores e ceramidas de cadeia curta, resultando em nanismo, defeitos de crescimento e aumento descontrolado do conteúdo total de SLs (Chen *et al.*, 2008; Steinberger *et al.*, 2021).

Além disso, a t18:0 desempenha um papel essencial na canalização metabólica, sendo preferencialmente incorporada em SLs contendo ácidos graxos de cadeias muito longas (VLCFA do inglês *very long chain fatty acids*), que são importantes para a estruturação e o tráfico das membranas celulares (Michaelson *et al.*, 2016; Murimwa *et al.*, 2022).

Ademais, as LBCs livres, como a fitoesfingosina C18, são moléculas potencialmente tóxicas, induzindo a morte celular programada (PCD) e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo desordenado dessas LBCs é, inclusive, o mecanismo de ação de micotoxinas que mimetizam os esfingolipídios (Michaelson *et al.*, 2016; Mamode Cassim *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a t18:0 é capaz de recrutar a proteína PDLP5, que regula o fechamento dos plasmodesmos e limita o transporte intercelular de moléculas durante respostas imunes. Dessa forma, a fitoesfingosina C18 estimula a deposição de calose nos plasmodesmos, auxiliando na defesa da planta (Zeng & Yao, 2022). Esse composto também já foi detectado em exsudatos de raízes de trigo, apresentando potencial aleloquímico ao inibir o crescimento de fungos patogênicos e afetar a comunidade microbiana no solo (Zeng & Yao, 2022).

A presença de fitoesfingosina C18 no extrato AA sugere que os musgos antárticos podem utilizar mecanismos de defesa semelhantes aos descritos na literatura para plantas vasculares. Assim, a t18:0 pode estar associada ao potencial fitotóxico observado nos bioensaios de coleóptilos de trigo e de fitotoxicidade com sementes.

Fitoesfingosina C16

A presença de fitoesfingosina C16 (t16:0) é condizente com a biossíntese de LBCs. Em plantas, as LBCs variam entre C16 a C20, sendo a C18 mais predominantes em tecidos vegetais e animais distintos (Kimberlin *et al.*, 2013). A fitoesfingosina C16 difere da hexadecaesfingina (d16:0) pela presença adicional de hidroxila no C4 (Kimberlin *et al.*, 2013). Ela representa uma variante de cadeia reduzida em relação à fitoesfingosina C18. Como as demais LBCs, apresenta funções estruturais e sinalizadoras nas membranas das células vegetais (Pata *et al.*, 2010).

Apesar da maior parte dos estudos focarem no C18 (t18:0), as evidências suportam que a t16:0 compartilha as funções de regulação da síntese total de SLs, atuando, juntamente da fitoesfingosina C18, no mecanismo de *feedback* negativo (Kimberlin *et al.*, 2013). A utilização do análogo sintético t17:0 em mutantes do musgo *P. patens* retomou a morfologia das plantas e restabeleceu a regulação da biossíntese de LBCs (Steinberger *et al.*, 2021).

A presença de t16:0 na forma livre no extrato sugere um papel semelhante à t18:0 na defesa da planta. A fitoesfingosina C18 apresenta atividade antimicrobiana (Glenz *et al.*, 2022), além de atuar como sinalizadora na indução de morte celular programada (Mamode Cassim *et al.*, 2020) e no fechamento de plasmodesmos em resposta a patógenos (Mamode Cassim *et al.*, 2020; Zeng & Yao, 2022).

Desse modo, a fitoesfingosina C16 provavelmente compartilha com a t18:0 funções associadas à sinalização de estresse e à defesa química. Sua presença no extrato indica que LCBs distintas podem atuar de forma sinérgica, contribuindo para a resistência dos musgos antárticos em um ambiente hostil e para o efeito inibitório observado nos bioensaios realizados.

Hexadecaesfinganina

A hexadecaesfinganina (d16:0) é uma LCB, contendo dois grupos hidroxila – característica que a diferencia da fitoesfingosina C16. É uma molécula estruturalmente semelhante à esfinganina (d18:0), tendo como diferença a extensão da cadeia carbonada (Pruett *et al.*, 2008). Atua como precursora na biossíntese de ceramidas e fitoesfingosinas,

sendo importante na estrutura e sinalização celular de plantas e fungos (Michaelson *et al.*, 2016; Mamode Cassim *et al.*, 2020).

Embora a d16:0 não seja um componente abundante como a d18:0, há evidências de que LCBs de cadeia curta podem apresentar bioatividade significativa (Pata *et al.*, 2010). O seu acúmulo em células ocasiona desequilíbrio da homeostase de membrana, inibição da H⁺-ATPase e aumenta da permeabilidade (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020), além de induzir respostas oxidativas e morte celular programada (Michaelson *et al.*, 2016; Zeng & Yao, 2022).

Em resíduos de sorgo, a hexadecaesfinganina foi associada à inibição da germinação e do crescimento de plântulas de *Bidens pilosa*, *Eleusine indica* e *Sesamum indicum*, apesar dos autores destacarem que o efeito inibitório pode ter sido parcialmente mascarado por fatores nutricionais (Murimwa *et al.*, 2022).

Compostos como análogos de esfinganina micotóxicos (SAMs do inglês *sphinganine-analog mycotoxins*) são similares à hexadecaesfinganina e mimetizam a estrutura da LCB natural. Desse modo, interferem na síntese de ceramidas e resultam no acúmulo citotóxico de esfinganinas livres (Chen *et al.*, 2020). Além disso, o excesso de LCBs di-hidroxiladas acumuladas em plantas, como a d16:0 ou o seu homólogo d18:0, acarretam diminuição da fluidez, aumento da permeabilidade da membrana plasmática e estresse oxidativo (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020).

Em macroalgas, a hexadecaesfinganina foi identificada em extratos de *Ulva prolifera* com potencial antimicrobiano e bioativo (Ribeiro *et al.*, 2024). Em *Parthenium hysterophorus*, foram detectadas hexadecaesfinganina, fitoesfingosina e eicosasfinganina no extrato metanólico, o que sugere que esses compostos contribuem ativamente para a inibição de espécies competidoras (Motmainna *et al.*, 2021).

Portanto, a detecção de hexadecaesfinganina no extrato de musgos antárticos indica que esse composto pode afetar a integridade das membranas e induzir estresse oxidativo em organismos sensíveis, desempenhando papel ativo na defesa química dessas espécies.

Terpenos

Ainda que os testes fitoquímicos preliminares tenham indicado a presença de terpenos, a análise de LC-MS e a identificação estrutural detalha desses compostos bioativos ainda está em andamento. Até o momento, foi possível confirmar a ocorrência de sinais compatíveis com esse grupo funcional nos extratos orgânicos AA e nas frações do extrato de acetona AA.

8. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta pesquisa reforçam a hipótese de que os tapetes de musgos antárticos possuem compostos químicos que desempenham um papel importante na sua ecologia. A presença de metabólitos secundários com potencial fitotóxico sugere que as briófitas podem atuar como uma barreira química natural, influenciando o estabelecimento de partes vegetais que chegam ao continente antártico.

A variação observada entre amostras e tipos de extratos indica que fatores ambientais e condições de armazenamento influenciam diretamente o perfil químico e a bioatividade desses compostos.

As análises fitoquímicas preliminares e cromatográficas indicaram a presença de terpenos e esfingolípídios como classes predominantes dos compostos bioativos. A detecção de bases de cadeia longa (LBCs), como fitoesfingosina C18 (t18:0), fitoesfingosina C16 (t16:0) e hexadecaesfinganina (d16:0), destaca seu papel fisiológico e potencial alelopático. A presença dessas LBCs livres nos extratos sugere que podem contribuir para os efeitos inibitórios observados nos bioensaios, possivelmente por meio da indução do estresse oxidativo, disruptura de membranas ou interferência metabólica.

Portanto, esta pesquisa fornece uma base sólida para futuras investigações sobre a ecologia química das briófitas antárticas e sua contribuição para a manutenção e conservação da biodiversidade polar. Estudos futuros devem englobar análises químicas, moleculares e ecológicas para elucidar a produção, liberação e função desses compostos em campo.

9. REFERÊNCIAS

- Amaral C, Evangelista H, Anjos D, Goldenberg-Barbosa R, Donato A, de Moura VC, de Freitas AC, Câmara PEAS, Rosa LH.** 2025. Abrupt greening observed since 2020 at Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Polar Biology* 48: 40.
- Amesbury MJ, Roland TP, Royles J, Hodgson DA, Convey P, Griffiths H, Charman DJ.** 2017. Widespread Biological Response to Rapid Warming on the Antarctic Peninsula. *Current Biology* 27: 1616–1622.e2.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A.** 2018. Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *Journal of Natural Products* 81: 641–660.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F.** 2013. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* 91: 52–80.
- Bardón A, Kamiya N, Toyota M, Asakawa Y.** 1999. A 7-nordumortenone and other dumortane derivatives from the Argentine liverwort *Dumortiera hirsuta*. *Phytochemistry* 51: 281–287.
- Barrera A, Acuña-Rodríguez IS, Ballesteros GI, Atala C, Molina-Montenegro MA.** 2022. Biological Soil Crusts as Ecosystem Engineers in Antarctic Ecosystem. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Bele AA, Khale A.** 2010. An overview on thin layer chromatography. *ResearchGate*.
- Belz RG, Hurle K, Duke SO.** 2005. Dose-Response—A Challenge for Allelopathy? *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine* 3: nonlin.003.02.002.
- Bhat KA et al.** 2022. Low Temperature Stress Tolerance: An Insight Into the Omics Approaches for Legume Crops. *Frontiers in Plant Science* 13.
- Bhattarai HD et al.** 2008. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species. *Phytotherapy Research* 22: 1635–1639.
- Boik J et al.** 2009. Interactions of Bioactive Plant Metabolites. In *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Springer, 213–230.
- Brooks ST, Jabour J, van den Hoff J, Bergstrom DM.** 2019. Our footprint on Antarctica competes with nature for rare ice-free land. *Nature Sustainability* 2: 185–190.

- Bu Z-J et al.** 2017. Bryophyte spore germinability is inhibited by peatland substrates. *Acta Oecologica* 78: 34–40.
- Budke JM et al.** 2018. Introduction to the Special Issue on Bryophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences*.
- Câmara PEAS et al.** 2021. The largest moss carpet transplant in Antarctica and its bryosphere cryptic biodiversity. *Extremophiles* 25: 369–384.
- Cannone N, Malfasi F, Favero-Longo SE, Convey P, Guglielmin M.** 2022. Acceleration of climate warming and plant dynamics in Antarctica. *Current Biology* 32: 1599–1606.e2.
- Carvalho-Silva M et al.** 2021. Exploring the plant environmental DNA diversity... *Antarctic Science* 33: 469–478.
- Casanova-Katny A, Cavieres LA.** 2012. Antarctic Moss Carpets Facilitate Growth... *Polar Biology* 35: 1869–1878.
- Cassaro A et al.** 2021. Antarctica as a reservoir of planetary analogue environments. *Extremophiles* 25: 437–458.
- Chen F et al.** 2018. Terpenoid Secondary Metabolites in Bryophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 37: 210–231.
- Chen J et al.** 2020. Sphinganine-Analog Mycotoxins. *Journal of Fungi* 6: 312.
- Chen M et al.** 2008. Sphingolipid Long-Chain Base Hydroxylation. *The Plant Cell* 20: 1862–1878.
- Chen K-H et al.** 2022. Comparative transcriptomics of fungal endophytes in co-culture with moss. *New Phytologist* 234: 1832–1847.
- Cheng F, Cheng Z.** 2015. Research Progress on Plant Allelopathy. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Commisso M et al.** 2021. Bryo-Activities: bryophytes as source of antifungal compounds. *Plants* 10: 203.
- Convey P.** 2019. Antarctic environmental change and biological responses. *Science Advances* 5: eaaz0888.

- Convey P et al.** 2014. The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs* 84: 203–244.
- Dilipkumar M, Chuah TS.** 2013. Combination Ratio in Allelopathic Extracts. *Int. J. Agric. Biol.* 15.
- dos Santos GS et al.** 2021. Natural Products from the Poles. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 31: 531–560.
- da Silva Fernandes A et al.** 2019. Toxicity of *Sanionia uncinata* aqueous fraction. *BMC Clinical Pharmacology* 20: 1–10.
- Dziuba O et al.** 2021. Allelopathic potential of *Sanionia georgicouncinata*. *Biosystems Diversity* 29: 264–268.
- Dziwak M et al.** 2022. Modern Use of Bryophytes. *Agronomy* 12: 1456.
- Eldridge DJ et al.** 2023. Global contribution of soil mosses. *Nature Geoscience* 16: 430–438.
- Eze MO, George SC, Hose GC.** 2021. Dose-response analysis of diesel fuel phytotoxicity. *Chemosphere* 263: 128382.
- Fernandes AS et al.** 2017. Protection against UV-induced toxicity in *Sanionia uncinata*. *Toxicology* 376: 126–136.
- Folta KM, Maruhnich SA.** 2007. Green light signaling. *Journal of Experimental Botany* 58: 3099–3111.
- Frangedakis E et al.** 2021. The hornworts: morphology, evolution and development. *New Phytologist* 229: 735–754.
- Frenot Y.** 2004. Biological invasions in the Antarctic.
- Glenz R et al.** 2022. Phytosphingosine inhibits bacterial/fungal growth. *Scientific Reports* 12: 1081.
- Gocan S.** 2002. Stationary Phases for TLC. *Journal of Chromatographic Science* 40: 538–549.
- Guedes RNC et al.** 2023. Insecticides in plants. *Agriculture Communications* 1: 100002.
- Gutiérrez-Nájera NA et al.** 2020. Sphingolipid effects on maize embryos. *Plants* 9: 150.

- Han J et al.** 2021. Terpenoids from Liverworts *Scapania*. *Journal of Natural Products* 84: 1210–1215.
- Hancock CR, Barlow HWB, Lacey HJ.** 1964. Coleoptile Straight Growth Test. *Journal of Experimental Botany* 15: 166–176.
- Harborne AJ.** 1998. *Phytochemical Methods*. Chapman & Hall.
- Hierro JL, Callaway RM.** 2021. The Ecological Importance of Allelopathy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 52: 25–45.
- Hill PW et al.** 2011. Vascular plant success in warming Antarctica. *Nature Climate Change* 1: 50–53.
- Horn A et al.** 2021. Natural Products from Bryophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 40: 191–217.
- Horozhankina NA et al.** 2023. Antarctic tourism: spatial structure. *Diversity* 17.
- Horst NA, Reski R.** 2016. Alternation of generations. *Plant Biology* 18: 549–551.
- Hughes KA et al.** 2020. Invasive species threatening Antarctica. *Global Change Biology* 26: 2702–2716.
- Huiskes AHL et al.** 2014. Transfer of plant propagules by human visitors. *Biological Conservation* 171: 278–284.
- Inderjit, Weston LA.** 2000. Are Lab Bioassays Suitable for Allelopathy? *Journal of Chemical Ecology* 26: 2111–2118.
- Ivanova V et al.** 2007. Sanionins: anti-inflammatory metabolites. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 37: 343–352.
- Jalal A et al.** 2021. Hormesis in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207: 111225.
- Jesionek W et al.** 2015. TLC-Direct Bioautography. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 98: 1013–1020.
- Khamare Y, Chen J, Marble SC.** 2022. Allelopathy for weed management. *Frontiers in Plant Science* 13.
- Kim H et al.** 2024. Amorphadiene production from *Sanionia uncinata*. *Planta* 260: 145.

- Kimberlin AN et al.** 2013. Serine Palmitoyltransferase-Interacting Proteins. *The Plant Cell* 25: 4627–4639.
- Kulshrestha S et al.** 2022. Stress and metabolites in bryophytes. *Journal of Experimental Botany* 73: 4396–4411.
- Lambers H, Oliveira RS.** 2019. Plant Water Relations. In *Plant Physiological Ecology*.
- Li C et al.** 2019. UV-B response in *Pohlia nutans*. *Plant Physiology and Biochemistry* 134: 113–122.
- Li J et al.** 2021. Allelopathic effects of *Artemisia argyi*. *Scientific Reports* 11: 4303.
- Li Z-H et al.** 2010. Phenolics and Allelopathy. *Molecules* 15: 8933–8952.
- Li Z et al.** 2023. Functional Endophytes and Secondary Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1153.
- Liu S et al.** 2022. Genome of *Pohlia nutans*. *Frontiers in Plant Science* 13.
- Ludwiczuk A, Asakawa Y.** 2019. Bryophytes as sources of volatile terpenoids. *Food and Chemical Toxicology* 132: 110649.
- Mamode Cassim A et al.** 2020. Sphingolipids in plants. *FEBS Letters* 594: 3719–3738.
- Michaelson LV et al.** 2016. Importance of plant sphingolipids. *BBA - Lipids* 1861: 1329–1335.
- Misic LV et al.** 2025. Fungal Associates of *Leucobryum candidum*. *Diversity* 17: 370.
- Motmainna Mst et al.** 2021. Allelopathy of *Parthenium hysterophorus*. *Plants* 10: 1445.
- Motti R, Palma AD, de Falco B.** 2023. Bryophytes in Folk Medicine. *Horticulturae* 9: 137.
- Murimwa JC et al.** 2022. Sorghum mulches on weed emergence. *International Journal of Agronomy*.
- Nimbal CI et al.** 1996. Herbicidal Activity of Sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54: 73–83.
- Nitsch JP, Nitsch C.** 1956. Growth of Coleoptile Sections. *Plant Physiology* 31: 94–111.

- Nozaki H et al.** 2007. Momilactones from moss *Hypnum plumaeforme*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 3127–3130.
- Pardo-Muras M et al.** 2022. Synergistic interactions among volatile compounds. *Plants* 11: 1114.
- Park M et al.** 2013. Endophytic bacteria of *Sanionia uncinata*. *Antarctic Science* 25: 51–54.
- Parnikoza I et al.** 2009. Status of Antarctic herb tundra. *Global Change Biology* 15: 1685–1693.
- Pata MO et al.** 2010. Plant sphingolipids. *New Phytologist* 185: 611–630.
- Perera-Castro AV et al.** 2020. Photosynthesis in Antarctic mosses. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Peters K et al.** 2019. Chemical Diversity of Bryophytes. *Metabolites* 9: 222.
- Pruett ST et al.** 2008. Diversity of sphingoid bases. *Journal of Lipid Research* 49: 1621–1639.
- Reigosa M et al.** 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 629–646.
- Rempt M, Pohnert G.** 2010. Acetylenic oxylipins from *Dicranum scoparium*. *Angewandte Chemie* 49: 4755–4758.
- Ribeiro CF et al.** 2024. Chemical profiling of *Laminaria japonica* and *Ulva prolifera*. *ResearchGate*.
- Rice EL.** 2012. *Allelopathy*. Academic Press.
- Salm RF et al.** 1998. Nitrogen-containing compounds from *Fontinalis squamosa*. *Phytochemistry* 49: 887–892.
- Samecka-Cymerman A et al.** 2011. *Sanionia uncinata* as a bioindicator of metal pollution. *Polar Biology* 34: 381–388.
- Simberloff D.** 2009. Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 81–102.

- Solheim B, Zielke M.** 2003. Associations Between Cyanobacteria and Mosses. In *Cyanobacteria in Symbiosis*.
- Stein W, Zinsmister HD.** 1990. New Flavonoids from *Bryum pseudotriquetrum*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 45: 25–31.
- Steinberger AR et al.** 2021. Disruption of sphingolipid hydroxylation in *Physcomitrella*. *Plant Direct* 5: e336.
- Tejedo P et al.** 2022. Real environmental impacts of Antarctic tourism. *Journal of Environmental Management* 308: 114634.
- Teodoro ALS et al.** 2024. Bioactivity of *Sanionia uncinata*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 96: e20240678.
- Trennheuser F, Burkhard G, Becker H.** 1994. Alkaloid from *Anthoceros agrestis*. *Phytochemistry* 37: 899–903.
- Turnbull JD et al.** 2009. UV-B protection in Antarctic mosses. *Functional Plant Biology* 36: 214–221.
- Turner J et al.** 2014. Antarctic climate change update. *Polar Record* 50: 237–259.
- Turner J et al.** 2016. Absence of 21st century warming. *Nature* 535: 411–415.
- Turner J, Marshall GJ, Clem K et al.** 2020. Antarctic temperature variability. *International Journal of Climatology* 40: 2986–3007.
- United Nations Industrial Development Organization.** 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Vaou N et al.** 2022. Synergistic antimicrobial effects of plant compounds. *Antibiotics* 11: 1014.
- van Zuijlen K et al.** 2022. Warming effects on alpine bryophytes. *Arctic Science* 8: 831–842.
- Vicherová E et al.** 2020. Bryophytes recognize neighbours via VOCs. *Scientific Reports* 10: 7405.
- Villarreal JC et al.** 2010. Synthesis of hornwort diversity. *Phytotaxa*.
- Wang K et al.** 2022. Aqueous plant extracts on lettuce germination. *Plants* 11: 486.

- Waterman MJ et al.** 2017. Antarctic moss biflavonoids. *Journal of Natural Products* 80: 2224–2231.
- Weir TL, Park S-W, Vivanco JM.** 2004. Mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472–479.
- Whitehead J, Wittemann M, Cronberg N.** 2018. Allelopathy in bryophytes. *Lindbergia* 41.
- Wu J et al.** 2024. Volatile sesquiterpenes with allelopathic potential. *Scientia Horticulturae* 327: 112830.
- Yu NH et al.** 2018. Fungal endophytes in maritime Antarctica. *Fungal Systematics and Evolution* 2: 263–272.
- Zapala W, Waksmundzka-Hajnos M.** 2005. Retention process in reversed-phase TLC. *Journal of Separation Science* 28: 566–574.
- Zeng H-Y, Yao N.** 2022. Sphingolipids in plant immunity. *Phytopathology Research* 4: 20.
- Zhang T et al.** 2013. Cold-adapted endophytic fungi from bryophytes. *FEMS Microbiology Letters* 341: 52–61.
- Zuo S et al.** 2016. Interactions among allelochemicals. *Ecological Engineering* 97: 486–492.