

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DAIANA JUNGBLUTH

**Atividade alelopática de extratos de *Ocotea puberula*
(Rich.) Nees sobre a germinação e o crescimento inicial de
alface (*Lactuca sativa* L.)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SANTA HELENA
2018

DAIANA JUNGBLUTH

**Atividade alelopática de extratos de *Ocotea puberula*
(Rich.) Nees sobre a germinação e o crescimento inicial de
alface (*Lactuca sativa* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Edicléia A. Bonini e Silva

SANTA HELENA
2018

DAIANA JUNGBLUTH

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS DE *OCOTEA PUBERULA*
(RICH.) NEES SOBRE A GERMINAÇÃO E O CRESCIMENTO INICIAL
DE ALFACE (*LACTUCA SATIVA* L.)**

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 26 de junho de 2018, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A aluna foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Tit. Jociani Ascari
UTFPR



Prof. Tit. Rejane Barbosa de Oliveira
UTFPR



Prof. Tit. Edicléia A. Bonini e Silva
Orientadora - UTFPR

Dedico esse trabalho a Deus, a minha família, aos meus amigos, e aos orientadores, pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, persistência e determinação de nunca, mesmo nos momentos mais difíceis, desistir.

À minha família e amigos, pelas palavras de apoio, paciência e carinho.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Edicléia Aparecida Bonini e Silva, pela confiança, compreensão e auxílio em todos os momentos que precisei.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Jociani Ascari, pela ajuda nas análises bioquímicas e grande parceria.

Agradeço aos meus amigos e colegas de turma, pelo conhecimento, momentos de descontração, auxílio e amizade: Jeniffer Sabrina Machado, Pamela Maceno Marques, Barbara Cristina Lopes, e em especial ao meu amigo e colega Daniel Reis Soares Silva, pela parceria e colaboração na condução do experimento.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas pelos anos dedicados e pelo aprendizado teórico e prático passado para nós alunos.

RESUMO

JUNGBLUTH, Daiana. **Atividade alelopática de extratos de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees sobre a germinação e o crescimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2018. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2018.

A alelopatia é um processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um vegetal são liberados, interferindo no desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas. O interesse na exploração de compostos do metabolismo secundário é visto como alternativa estratégica na agricultura, inclusive para o controle de plantas invasoras. Apesar do aumento nas últimas décadas nas pesquisas por plantas com potencial alelopático, poucos estudos foram realizados sobre o perfil químico ou a atividade biológica de espécies nativas. A espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Lauraceae), conhecida como guaicá, é uma espécie medicinal endêmica da Floresta Ombrófila Mista, utilizada principalmente por índios do Paraná e Santa Catarina. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade alelopática de extratos CHCl_3 e AcOEt das folhas de *O. puberula* sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (*alface*). O extrato etanólico foi obtido a partir do material seco e moído. O extrato bruto foi solubilizado em etanol e acidificado (fração hidroalcoólica). A fração C_6H_{14} foi obtida por extração líquido-líquido da fração hidroalcoólica, mesmo procedimento utilizado para extração da fração AcOEt . A fração hidroalcoólica foi basificada e extraída com CHCl_3 . O perfil químico das frações obtidas foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se reveladores específicos. A análise por CCD confirmou a presença de alcalóides como compostos majoritários nas frações AcOEt e CHCl_3 . As frações foram avaliadas quanto ao potencial alelopático, nas concentrações de $0,8 \text{ gmL}^{-1}$, $0,4 \text{ gmL}^{-1}$ e $0,2 \text{ gmL}^{-1}$. Os testes de germinação foram realizados em câmara germinativas à 25°C , em placas de Petri contendo 25 sementes de alface com quatro repetições. Para o teste de crescimento foram utilizadas 10 plântulas por placa de Petri pré-germinadas seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). Os parâmetros germinativos analisados foram porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Os resultados indicaram alterações significativas na %G no IVG e no **crescimento radicular (CR)** das sementes de alface. Todas as concentrações da CHCl_3 reduziram significativamente os parâmetros germinativos avaliados, sendo que a concentração de $0,8 \text{ gmL}^{-1}$ diminuiu 50% a %G e 80% o IVG e 74% o CR, quando comparados com o controle. Já as AcOEt não interferiram na %G, porém todas as concentrações aplicadas reduziram significativamente o IVG e o CR. Muitas vezes o efeito alelopático não se manifesta sobre a %G, mas sobre o IVG das sementes. As frações AcOEt e CHCl_3 , extraídas das folhas de *O. puberula*, apresentaram influência alelopática sobre a germinação de alface. No entanto a CHCl_3 mostrou-se mais efetiva, provocando uma redução acentuada na %G no CR e no tempo de germinação das sementes.

Palavras chave: Alelopatia. Lauraceae. Controle plantas daninhas. Germinação.

ABSTRACT

JUNGLUTH, Daiana. **Allelopathic activity of *Ocotea puberula* (Rich) Nees. extract on the germination and initial growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.)**2018. 32 f. Completion of course work (Degree in biological sciences) Federal Technological university of Paraná. Santa Helena, 2018.

Allelopathy is a process whereby the compounds of the secondary metabolism of a plant are released, interfering in the growth of other relatively close plants. The interest in the exploration of compounds from the secondary metabolism is seen as a strategic alternative in agriculture, even for the control of invasive plants. Despite the increase in the last decades on the research by plants with allelopathic potential, few studies have been conducted on the chemical profile or the biological activity of native species. *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Lauraceae), known as guaicá, is a medicinal species endemic to the Ombrophilous Mixed Forest, mainly used by Brazilian indians on Paraná and Santa Catarina states. The objective of this work was to measure the allelopathic activity of extracts CHCl_3 and AcOEt from the leaves of *O. puberula* on the germination of *Lactuca sativa* L. (lettuce). The ethanolic extract was obtained from the dried and milled leaves. The crude extract was solubilized in ethanol and acidified (hydroalcoholic fraction). The C_6H_{14} fraction was obtained by liquid-liquid extraction of the hydroalcoholic fraction, the same procedure was used to extract the AcOEt fraction. The hydroalcoholic fraction was basified and extracted with CHCl_3 . The chemical profile of the obtained fractions was analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using specific revelators. TLC analysis confirmed the presence of alkaloids as majority compounds in AcOEt and CHCl_3 fractions. The fractions were evaluated for allelopathic potential on lettuce cypselas at 0.8 gmL^{-1} , 0.4 gmL^{-1} and 0.2 gmL^{-1} . Germination tests were carried out in a growth chambers at 25°C with Petri dishes containing 25 lettuce cypselas with four replicates. For the growth test, were used ten pre-germinated seedlings per petri dish, we followed the same procedures as above. The data were submitted to ANOVA and compared by the Scoot-Knoot test ($p > 0.05$). The germination parameters analyzed were: germination percentage (% G) and germination speed index (IVG). The results indicated significant changes in the %G and the IVG and root growth (CR) of the lettuce seeds. All CHCl_3 concentrations reduced significantly the germinative parameters evaluated, and the concentration of 0.8 gmL^{-1} decreased 50% to %G and 80% the IVG, and 74% the CR. when compared to the control. The AcOEt did not interfere with the %G, but all the concentrations applied significantly reduced the IVG and CR. Sometimes the allelopathic effect does not manifest on the % G, but only in the IVG of the seeds. The AcOEt and CHCl_3 fractions, extracted from the leaves of *O. puberula*, revealed allelopathic influence on lettuce germination. However, CHCl_3 showed to be more effective, with marked reduction in the %G and CR and in the germination time of the seeds.

Keywords: Allelopathy. Lauraceae. Control weeds. Germination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A. estrutura geral da planta. B. ramo da espécie, onde se observa a filotaxia e a inflorescência	18
Figura 2 – Processo de evaporação em Rotaevaporador.	19
Figura 3 - Sementes de <i>Lactuca sativa</i> L dispostas sobre o papel germitest umedecido com a solução desejada	20
Figura 4 - Contagem e retirada das sementes germinadas	21
Figura 5 – Crescimento das raízes de <i>L. sativa</i>	22
Figura 6 – Cromatoplaça do extrato bruto e frações das folhas de <i>O. puberula</i> . 1: Fração C ₆ H ₁₂ , 2: Fração CHCl ₃ , 3: Fração AcOEt, 4: Extrato bruto. Revelador: Dragendorff	23

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
C ₆ H ₁₂	Hexano
CR	Comprimento Radicular
Cul	Cultivar
g	Gramas
gmL ⁻¹	Gramas por Mililitro
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
MeOH	Metanol
nm	Nanômetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaOH	Hidróxido de sódio
UV	Ultravioleta
%G	Porcentagem de Germinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	GERAL.....	13
2.2	ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	14
3.2	ALELOPATIA	15
3.3	<i>Lactuca sativa</i> L.....	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	18
4.3	ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	19
4.4	EXPERIMENTO EM LABORATÓRIO.....	20
4.5	TESTE DE GERMINAÇÃO	20
4.6	TESTE DE CRESCIMENTO	22
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
6	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O termo alelopatia pode ser considerado como, qualquer efeito direto ou indireto que uma planta ou microrganismo exerce sobre outra planta, mediante a produção de compostos químicos liberados no ambiente (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Estes compostos liberados no ambiente são denominados de aleloquímicos ou metabólitos secundários. Cada espécie vegetal pode sintetizar mais de um tipo de metabólito secundário (FERREIRA, 2004). Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos, estão as substâncias pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (MONTEIRO e VIEIRA, 2002).

Dentre os metabólitos secundários, os alcalóides, geralmente definidos como moléculas naturais por apresentarem o nitrogênio em sua estrutura, são abundantes nas plantas e representam uma das classes mais difundidas de compostos e apresentam propriedades farmacológicas múltiplas e variadas (ZANIN, 2006).

Apesar do aumento nas investigações sobre o potencial alelopático das espécies nativas ocorrido nas últimas décadas, o conhecimento atual ainda é considerado escasso (FERREIRA et al., 1992). Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes plantas, incluindo as pertencentes ao gênero *Ocotea*, visando o isolamento e a caracterização de compostos químicos. Dentre os metabólitos vegetais identificados, destacam-se os alcalóides benzilisoquinolínicos e aporfínicos, as lignanas e neolignanas, os monoterpenos, os sesquiterpenos e os fenilpropanóides (FARAGO et al., 2005). Estudos realizados com *O. puberula* apresentaram potencial alelopático sobre a germinação de espécies invasoras (SILVA e AQUILA, 2006). Contudo, deve-se salientar que essas espécies não apresentam indícios visuais da ocorrência de alelopatia a campo.

Com os recentes avanços na química de produtos naturais e por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, estes compostos têm sido identificados a nível molecular, podendo assim ser fontes potenciais de herbicidas, sendo utilizados no controle de plantas daninhas (SILVEIRA, 2010).

A utilização de herbicidas é o principal recurso no controle de plantas invasoras, porém nem sempre é eficaz, pois elimina apenas espécies mais suscetíveis, causando uma pressão de seleção cada vez maior sobre espécies resistentes ou tolerantes. Assim, é evidente a necessidade da busca por novas alternativas de manejo para o controle das espécies daninhas resistentes, bem como, métodos que visem à prevenção da ocorrência da resistência em novas áreas. Dentre as alternativas de manejo disponíveis, interações alelopáticas entre plantas podem ser usadas como um método eficiente para o controle de plantas daninhas resistentes (RODRIGUES, 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de frações químicas extraídas de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (*O. puberula*), espécie nativa da flora brasileira, verificando sua ação sobre a germinação e o crescimento inicial da espécie bioindicadora de alelopatia, *Lactuca sativa* L. (alface).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito alelopático de extratos de folhas de *O. puberula* sobre a germinação e o crescimento inicial de alface.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar corretamente a espécie coletada;
- Obter o extrato etanólico bruto a partir das folhas secas da espécie doadora;
- Realizar o fracionamento dos extratos;
- Caracterizar as classes de metabólicos secundários presentes no extrato bruto e frações das folhas de *O. puberula*;
- Verificar os potenciais alelopáticos de extratos obtidos sobre os parâmetros germinativos da espécie alvo.
- Comparar o potencial as frações testadas sobre a germinação e o crescimento inicial de alface.
- Identificar qual concentração dos extratos analisados apresenta maior influência negativa sobre a germinação e o crescimento inicial de alface.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

A região sul do Brasil, além da floresta de Araucárias, possui uma flora bastante diversificada, distribuída em regiões de cerrado e de Mata Atlântica. No Paraná, entre as famílias mais representativas (com maior número de espécies) estão Asteraceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Piperaceae, Lamiaceae, Lauraceae (ARAÚJO et al., 2001).

A distribuição da família Lauraceae no mundo é de aproximadamente 50 gêneros e 2.500 a 3.000 espécies. No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies (QUINET et al., 2012).

Esta família destaca-se não apenas pela distribuição e o uso econômico da sua madeira, mas também pelo alto valor comercial que alcançam seus óleos essenciais (QUINET e ANDREATA, 2002) e a presença de uma importante classe de metabólitos que são os alcalóides, responsáveis por diversas atividades terapêuticas.

Mais de 400 alcalóides já foram identificados em 189 espécies de Lauraceae, e cerca de 54 alcalóides aporfínóides com pronunciada bioatividade foram isolados no gênero *Ocotea* (ZANIN e LORDELLO, 2007).

O gênero *Ocotea* tem despertado o interesse de pesquisadores brasileiros devido a sua ampla distribuição no território nacional e ao fato de algumas de suas espécies serem muito apreciadas no comércio madeireiro pelo alto valor de sua madeira (RIZZINI e MORS, 1995). Através de um levantamento preliminar nas várias reservas florestais no Estado do Paraná foi possível constatar a existência de várias espécies do gênero *Ocotea*, dentre elas a canela-preta, *Ocotea catharinensis* Mez; a canela-sassafrás, *Ocotea odorifera* (Vellozo) também chamada *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez; a canela lageana, *Ocotea pulchella* Martius; a imbuia, *Ocotea porosa* (Nees); e a canela-guaicá, *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (ZANIN, 2006).

As espécies do gênero *Ocotea* são conhecidas por acumularem como metabólitos secundários, alcalóides com esqueletos benzilisoquinolínico ou bisbenzilisoquinolmico, oxo-aporfínico, aporfínico e pró-aporfínico.

A espécie *O. puberula* é uma espécie arbórea nativa com 10-25 metros de altura e com tronco de 40-60 cm de diâmetro, é revestida por casca pardacenta com ritidoma parcialmente estriado. Folhas alternas espiraladas, flores amarelo-

esverdeado e fruto do tipo baga. Segundo Lorenzi (1998) essa planta ocorre por toda América tropical e subtropical, em quase todas as formações florestais e é uma das plantas pioneiras mais comuns no planalto meridional.

O. puberula é conhecida popularmente como guaicá, canela-guaicá, canela-sebo, canela-parda, canela-de corvo, canela-pimenta e guaicá-branca (FARAGO et al., 2004). É uma planta semidecídua, heliófita, indiferente às condições físicas do solo, que invade capoeiras e capoeirões, chegando a dominar um determinado estágio de sucessão secundária (LORENZI, 1998). Inoue et al., (1984) relatam que *O. puberula* floresce durante os meses de maio a agosto, e frutifica no verão, principalmente nos meses de novembro e dezembro e é encontrada com elevada frequência como elemento dominante nas bordaduras de capões. Como espécie pioneira e produtora de grande quantidade de frutos muito apreciados por pássaros (estes considerados seus maiores dispersores), não deve faltar nos plantios mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1998).

3.2 ALELOPATIA

O termo alelopatia pode ser considerado como, qualquer efeito direto ou indireto que uma planta possa exercer sobre outras, através da produção de compostos químicos que são liberados no ambiente. Compostos estes que podem ser estimuladores ou inibidores de outras plantas e/ou comunidade biológica (INDERJIT; KEATING, 1999, HAGEMANN et al., 2010). Esses efeitos alelopáticos podem ser observados na germinação, no crescimento e no desenvolvimento de plantas, sugerindo alternativas no manejo integrado de plantas daninhas (SILVA et al., 2009; INOUE et al., 2010).

Grande parte das substâncias alelopáticas são originárias do metabolismo secundário de plantas, possuindo a função de protegê-las e/ou defendê-las. Isto porque durante a evolução das plantas, estes compostos apresentaram alguma eficiência contra a ação de diferentes microrganismos, insetos e vírus, estimulando o desenvolvimento e o crescimento da planta ou inibindo a ação destes patógenos e predadores (WALLER, 1999).

As substâncias alelopáticas são compostos que podem ser produzidos em qualquer parte da planta, como folhas, flores, frutos, gemas, caules aéreos, rizomas, raízes e sementes (PUTNAM, 1985). Porém, os compostos concentram-se

principalmente nas folhas, seguido do caule, flores e raízes (MOREIRA et al., 2006). No entanto, sua concentração é alterada de espécie para espécie e em uma mesma espécie, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e também do órgão produtor da substância (RODRIGUES et al., 1993).

Geralmente, a alelopatia resulta da ação de vários aleloquímicos em conjunto, sendo que essas misturas podem conter substâncias similares ou de naturezas químicas diversas (EINHELLIG, 1999). Na maioria dos casos, os aleloquímicos dessas misturas não são capazes de causar nenhum efeito sobre a planta-alvo quando sozinhos, uma vez que são liberados em pequenas quantidades em condições naturais (EINHELLIG, 1999; REIGOSA et al., 1999).

As substâncias alelopáticas são liberadas para o ambiente por volatilização (substâncias voláteis), lixiviação (pela chuva ou orvalho), exsudação radicular (liberação pelas raízes) e pela decomposição de resíduos vegetais (PIRES et al., 2011). Depois de liberados no ambiente através dessas rotas, os aleloquímicos podem causar diversos efeitos diretos e indiretos sobre as plantas. Os efeitos indiretos compreendem alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e, também, nas populações e, ou, atividades de microrganismos, nematóides e insetos. Já os efeitos diretos incluem alterações no crescimento e metabolismo vegetal (RIZVI et al., 1992), englobando alterações em níveis celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, bem como modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas.

Miller (1996) classifica o efeito alelopático em dois tipos: autotoxicidade, é um mecanismo intraespecífico de alelopatia que ocorre quando uma espécie de planta libera determinada substância que retarda ou inibe a germinação e o crescimento de plantas da própria espécie. Heterotoxicidade, ocorre quando uma substância com efeito fitotóxico é liberada por determinada planta afetando a germinação e o crescimento de plantas de outras espécies.

Segundo Scrivanti et al., (2003) a alelopatia é reconhecida como um processo ecológico importante em ecossistemas naturais e manejados, influenciando na sucessão vegetal primária e secundária, na estrutura, composição e dinâmica de comunidades vegetais nativas ou cultivadas. Com isso, os aleloquímicos são vistos como alternativas a agroquímicos sintéticos, objetivando o manejo sustentável e ecológico na produção agrícola. Muitas substâncias alelopáticas apresentam grande potencial para uso no controle biológico de ervas daninhas (PUTNAM e DUKE, 1974;

MACHARIA e PEFFLEY, 1995; ANAYA, 1999; CHOU, 1999; CHUNG et al., 2001), sendo ativas em baixas concentrações e parcial ou totalmente solúveis em água. Em contrapartida ao poder fitotóxico, os efeitos de promoção da germinação e do crescimento vegetal causados por aleloquímicos também são de interesse para o manejo agrícola (VYVYAN, 2002).

3.3 *Lactuca sativa* L.

A espécie indicadora utilizada para avaliar o potencial alelopático deve apresentar diversos atributos, entre os quais possuem alto índice de germinação em meio natural, disponibilidade de sementes, homogeneidade entre os indivíduos, além de alta sensibilidade à ação de diferentes compostos alelopáticos. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo, a alface (*Lactuca sativa* L.) muito utilizada em biotestes de laboratório (SILVA et al., 2009).

De acordo com Sousa (2005), a principal vantagem do uso de alface como alvo de estudos alelopáticos reside na sensibilidade das sementes da espécie, pois mesmo em baixas concentrações de aleloquímicos o processo de germinação pode ser comprometido. Além disso, a germinação é rápida, em aproximadamente 24 h, possui crescimento linear, é insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e aos potenciais osmóticos das soluções (COELHO et al., 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas foram coletadas da espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Figura 1) localizada na Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) de Santa Helena no Oeste do estado do Paraná nas coordenadas 24°51'05.3"S 54°21'06.1"W. A espécie foi coletada no mês de agosto de 2017.

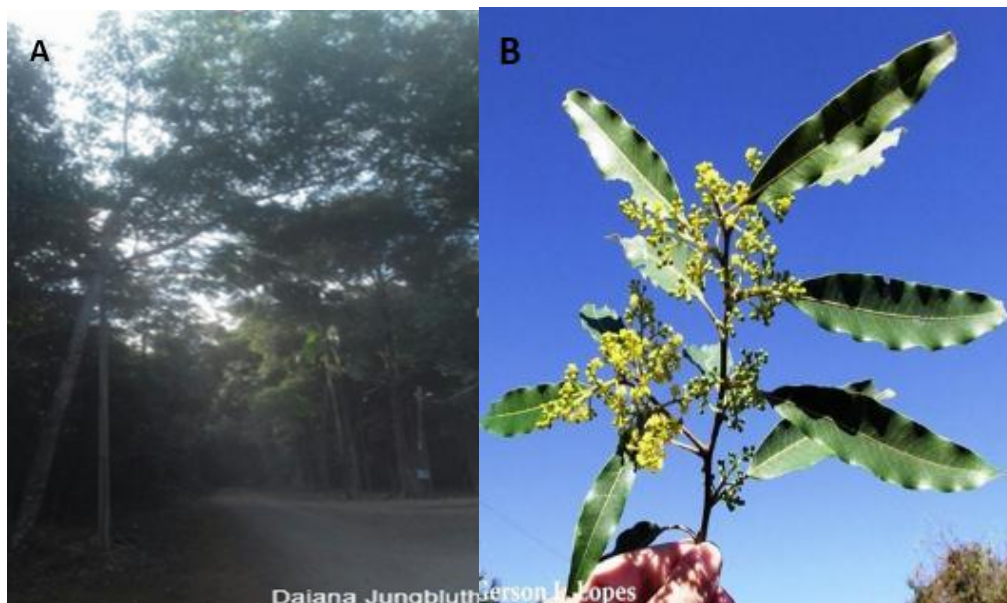


Figura 1. A. estrutura geral da planta. B. ramo da espécie, onde se observa a filotaxia e a inflorescência.

Para a identificação botânica da espécie foram coletados ramos de aproximadamente 30 centímetros com inflorescências e preparada exsicata segundo Judd (2009). A identificação das espécies foi realizada por meio de material botânico coletado, contou com o auxílio do curador do herbário da UTFPR-Campus Santa Helena, Leonardo Biral dos Santos e da utilização de literatura especializada. A confirmação da grafia das espécies e nome dos respectivos autores foi feita pelo site do Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>).

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

As folhas foram cuidadosamente separadas e secas em estufa com temperatura de 60°C por 24 horas. Após este período as amostras foram processadas em um moinho de facas e armazenadas em um freezer até a data da obtenção do extrato.

Para obtenção do extrato etanólico utilizou-se 300g do material seco e moído. No material vegetal adicionou-se 600mL de etanol mantendo-se em banho ultrassônico por 60 minutos e filtrado utilizando filtração a vácuo. Este procedimento foi realizado por três vezes utilizando a mesma amostra. O solvente resultante das três extrações foi reunido e evaporado em rotaevaporador (Figura 2) a pressão

reduzida. O rendimento do extrato bruto foi calculado em relação a massa inicial seca resultando em 32g (10,6%).



Figura 2 – Processo de evaporação em Rotaevaporador.

Para obtenção das frações solubilizou-se 15g de extrato bruto em 80mL de etanol e adicionou-se 160mL de água acidificada (pH 2) fornecendo a fração hidroalcoólica. A fração hexânica (C_6H_{12}) foi obtida por extração líquido-líquido da fração hidroalcoólica adicionando-se 80mL de hexano. Este procedimento foi realizado três vezes. O C_6H_{12} foi evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida resultando em 4,3g (28,7%) desta fração.

A fração acetato de etila ($AcOEt$) foi obtida utilizando o mesmo procedimento descrito acima. O rendimento desta fração foi de 1,9g (12,7%). Para a obtenção da fração clorofórmica ($CHCl_3$) a fração hidroalcoólica foi basificada a pH 7 ($NaOH$ 5%). Posteriormente realizou-se extração líquido-líquido adicionando 80mL de $CHCl_3$ a fração hidroalcoólica basificada. Este procedimento foi realizado 3 vezes. O $CHCl_3$ foi evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida resultando em 0,36g (2,4%) desta fração. O extrato bruto e as frações foram armazenadas sob refrigeração.

4.3 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações foi analisado em cromatoplasas de sílica gel 60 UV_{254nm} da marca Macherey-nagel® utilizando várias fases móveis: $CHCl_3/AcOEt$ 1:9 e $AcOEt/MeOH$ 8:2. As composições das amostras

foram comparadas semiquantitativamente, com a aplicação de 5uL de soluções das amostras a 10mg/mL, sendo aplicadas com a utilização de capilares. As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda 254nm e reveladas com reagente específico para a classe de alcaloides, reagente Dragendorff.

4.4 EXPERIMENTO EM LABORATÓRIO

Os testes de germinação foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Santa Helena, em incubadora do tipo BOD da marca LimaTec® com fotoperíodo (12 horas), temperatura controlada (25 °C) e umidade de 70%.

4.5 TESTE DE GERMINAÇÃO

Para as avaliações de germinação as sementes utilizadas no estudo foram acondicionadas em placas de Petri, as quais foram previamente preparadas, contendo dois discos de papel germitest cada. As sementes de alface Cult. GrandRapids foram dispostas sobre o papel germitest umedecido com a solução desejada (Figura 3).



Figura 3 – Sementes de *Lactuca sativa* L dispostas sobre o papel germitest umedecido com a solução desejada.

As placas de Petri foram umedecidas com 5mL de cada solução (água, e as frações de 0,2, 0,4, e 0,8gmL⁻¹ de AcOEt e de CHCl₃). Cada unidade experimental foi

constituída de três placas de Petri contendo 25 sementes, resultando em 21 placas e 525 sementes ao total, esse teste foi realizado duas vezes. Após a colocação das sementes, as placas foram transferidas para a câmara de crescimento do tipo BOD a 25° C com 12 horas de fotoperíodo e umidade de 70% até o término do experimento (sete dias).

Durante o experimento procedeu-se um acompanhamento diário das condições de temperatura e fotoperíodo, bem como, a contagem e retirada das sementes germinadas (Figura 4). Foram consideradas como germinadas as sementes que apresentaram protrusão de radícula ($\pm 2\text{mm}$) (FERREIRA e AQUILA, 2000).

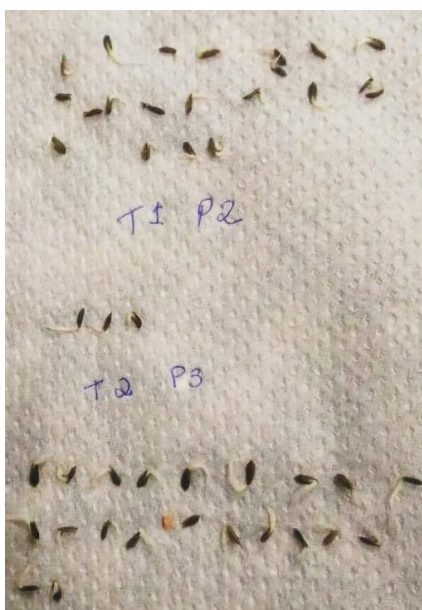


Figura 4 – Contagem e retirada das sementes germinadas.

Para o cálculo da percentagem de germinação foi usado a fórmula $\%G = (N/25) \times 100$, onde N (número de sementes germinadas ao final do teste unidade dividido por 25 que era o total de sementes por placa, multiplicado por 100 para a porcentagem (FERREIRA e AQUILA, 2000). Para o cálculo do Índice de Velocidade de Germinação foi utilizado a fórmula $IVG = \sum (ni/ti)$, onde ni é o número de sementes que germinaram no tempo 'i' e ti é o tempo após instalação do teste, $i = 1 \rightarrow X$ dias (FERREIRA e BORGHETTI, 2004).

4.6 TESTE DE CRESCIMENTO

Para os bioensaios de crescimento inicial foram utilizadas plântulas de alface *Cul. GrandRapids*. A obtenção das plântulas ocorreu com a pré-germinação das sementes de alface em água destilada, sob as condições descritas no item anterior.

Após a protrusão da radícula (2mm), 10 plântulas foram transferidas para placas de Petri de vidro (9 cm), contendo dois discos de papel filtro e as soluções das frações de *O. puberula* (AcOEt e CHCl_3) nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 gmL^{-1} e água destilada para determinar o controle. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD a 25° C com 12 horas de fotoperíodo e umidade de 70% até o término do experimento (sete dias). Nesta amostragem utilizou-se então 10 sementes por placa, com quatro repetições de cada tratamento, totalizando em 280 sementes (Figura 5).

A mensuração do crescimento foi realizada após sete dias de incubação, utilizando papel milimetrado para medir o comprimento da raiz primária.



Figura 5 – Crescimento das raízes de *L. sativa*

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizados. Cada unidade experimental foi constituída de três placas de Petri contendo 25 sementes, resultando em 21 placas e 525 sementes por experimento; sendo feito duas repetições. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-

Knott ($p>0,05$). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa SISVAR da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise do perfil químico do extrato bruto e frações das folhas de *O. puberula* por CCD indicou a presença de alcalóides nas frações CHCl_3 e AcOEt com a revelação do reagente Dragendorff, específico para esta classe de metabólitos secundários. A fase móvel AcOEt/MeOH 8:2 demonstrou a melhor separação dos compostos conforme Figura 6.



Figura 6: Cromatoplate do extrato bruto e frações das folhas de *O. puberula*.
1: Fração C_6H_{12} , 2: Fração CHCl_3 , 3: Fração AcOEt, 4: Extrato bruto. Revelador: Dragendorff.

O teste alelopático nas sementes de alface (espécies-alvo padrão) foi empregado para avaliar a bioatividade do extrato de folhas de *O. puberula* na germinação e crescimento inicial.

Verificou-se que as folhas de *O. puberula* apresentaram atividade alelopática, variando o potencial de acordo com o tratamento e amostra, sendo que a maioria das amostras reduziram significativamente parâmetros de germinação e crescimento inicial das sementes de *L. sativa*. Destaca-se a fração CHCl_3 , que apresentou maior grau de pureza em comparação com a fração AcOEt pela análise por CCD. De acordo

com Lordello (1997) estudos químicos realizados com espécies do gênero *Ocotea* demonstrou a presença de alcalóides aporfínicos.

Todas as concentrações do extrato CHCl_3 reduziram significativamente a %G e o IVG quando comparados ao controle (Tabela 01), sendo que a maior concentração ($0,8\text{mg mL}^{-1}$) causou uma redução de 50% na %G e de 80% no IVG. A fração AcOEt não inibiu significativamente a germinação das sementes de alface. No entanto, o IVG teve redução significativa em todas as concentrações avaliadas. Candido, et al (2016) avaliando os efeitos alelopáticos do extrato de folhas de *O. pulchella* verificaram que a fração AcOEt desse extrato inibiram em 45% e 65% a germinação de alface e tomate, respectivamente.

Tabela 01 – Porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Lactuca sativa* L. sob frações de folhas de *O. puberula*

FRAÇÕES	CONCENTRAÇÕES	%G	IVG
CHCl ₃	controle	99 a	13.475 a
	0,2 mg.mL ⁻¹	85 b	7.432 b
	0,4 mg.mL ⁻¹	72 c	3.870 c
	0,8 mg.mL ⁻¹	50 c	2.635 c
AcOEt	controle	99 a	14.100 a
	0,2 mg.mL ⁻¹	95 a	8.675 b
	0,4 mg.mL ⁻¹	94 a	7.522 b
	0,8 mg.mL ⁻¹	91 a	5.010 c

*Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais na coluna, não apresentam diferenças estatísticas entre si, por meio dos testes ANOVA comparados por Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os compostos alelopáticos podem causar alterações no padrão de germinação e podem resultar em efeitos sobre a divisão celular, permeabilidade de membranas, ativação de enzimas, sequestro de oxigênio (fenóis) entre outros (ROSADO, 2009; FERREIRA e AQUILA, 2000).

Muitas vezes o efeito alelopático não se manifesta sobre a porcentagem de germinação, mas sobre o índice de velocidade de germinação das sementes. Esse fator pode ter um significado ecológico, pois plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido. E em consequência, podem ser mais

suscetíveis a estresses e terem menor chance na competição por recursos (SILVEIRA, 2010). Portanto, esta variável também foi analisada.

Com relação ao IVG, nota-se pela Tabela 01 que houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, em ambos os extratos testados. Dentre os extratos testados no bioensaio a concentração de $0,8\text{gmL}^{-1}$ da CHCl_3 foi a mais efetiva, reduzindo em até 80% o IVG, proporcionando maior redução no tempo de germinação das sementes e promovendo atraso na germinação. Apesar de não ter causado efeito negativo na germinação, a fração AcOEt , também na concentração de $0,8\text{gmL}^{-1}$, inibiu em aproximadamente 65% o IVG das sementes de alface.

Estudos mostram que, embora a porcentagem final de germinação possa não ser significativamente afetada pela ação de aleloquímicos, o padrão de germinação pode ser modificado, verificando-se diferenças na velocidade e na sincronia da germinação de sementes submetidas a tais compostos (SANTANA et al., 2006). A importância dessa metodologia se deve ao fato de que as sementes constituem unidades biológicas por meio das quais processos ecológicos, como a competição intra e interespecíficas, a invasão de novos nichos por espécies não nativas, a colonização de novos habitats e a regeneração da vegetação nativa, dentre outros, podem ser desencadeados.

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento da plântula (FERREIRA e BORGHETTI, 2004), porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois, para cada semente, o fenômeno é discreto, germinando ou não. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da raiz um dos sintomas mais comuns.

Todos os extratos de folhas de *O. puberula* causaram diminuição do crescimento do sistema radicular e os maiores efeitos foram verificados nas plântulas submetidas às CHCl_3 (Tabela 02). O perfil de atividade do extrato CHCl_3 das folhas apresentou uma relação dose-resposta na qual aumento na concentração de 0,2 até $0,8\text{gmL}^{-1}$ resultou numa inibição de aproximadamente 75% no comprimento das raízes de alface.

Tabela 02 - Comprimento radicular (cm) de plântulas de *Lactuca sativa* sob frações de folhas de *O. puberula*

FRAÇÕES	CONCENTRAÇÕES	CR (cm)
CHCl ₃	Controle	2.716 a
	0,2 mg.mL ⁻¹	1.845 b
	0,4 mg.mL ⁻¹	1.115 c
	0,8 mg.mL ⁻¹	0.705 d
AcOEt	controle	2.843 a
	0,2 mg.mL ⁻¹	1.913 b
	0,4 mg.mL ⁻¹	1.740 b
	0,8 mg.mL ⁻¹	1.661 b

*Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais na coluna, não apresentam diferenças estatísticas entre si, por meio dos testes ANOVA comparados por Scott-knott ($p < 0,05$).

Mesmo não se observando diferença estatística entre a AcOEt dos extratos das folhas de *O. puberula* sobre a germinação das sementes de alface, o crescimento dessas foi afetado negativamente por todas as concentrações avaliadas, no entanto, sem apresentar relação dose-resposta. Pode-se inferir que a atividade apresentada pela fração AcOEt pode estar sendo influenciada por outros metabólitos presentes nesta fração como observado pela análise por CCD.

Em Araújo (2012), as frações CHCl₃, AcOEt e remanescente hidroalcoólica das folhas de *O. pulchella* apresentaram atividade tóxica capaz de provocar mortalidade do microcrustáceo, sugerindo bioatividade. Estudo utilizando os frutos da espécie *O. heterochroma* (CUCA et al., 2009) apresentaram atividade para o extrato bruto etanólico, fração butanólica e com a fração benzeno sendo considerada com boa bioatividade.

O potencial herbicida do gênero *Ocotea* já foi identificado por outros pesquisadores. Borges et al., (1993) descobriram que extratos etanólico e aquosos das folhas de *O. pretiosa* reduziram significativamente o crescimento do hipocótilo e da radícula de plântulas de alface..

A alelopatia pode ser considerada uma alternativa viável no manejo de plantas daninhas, devido a seu excelente potencial de interação e importância ecológica, assim como a possibilidade de fornecer novas estruturas químicas para

produção de bioativos que combatam as pragas ou plantas invasoras e sejam menos danosos ao ambiente.

Novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito alelopático dos extratos de *O. puberula* sobre a germinação e o crescimento inicial de espécies invasoras, através de bioensaios com diferentes solventes e concentrações. Podem ser utilizadas também moléculas específicas já conhecidas e isoladas dos extratos dessa mesma planta para avaliar seu potencial alelopático. Cabe ressaltar que os resultados obtidos em laboratório para a alelopatia podem não se confirmar em condições naturais, visto a ocorrência simultânea de fatores bióticos e abióticos que podem interferir nos resultados finais.

6 CONCLUSÕES

As frações (CHCl₃ e AcOEt) obtidas a partir do extrato de folhas de *O. puberula* apresentaram influência alelopática sobre a espécie *L. sativa*. A AcOEt não alterou a germinação das sementes alface, porém diminuiu significativamente o IVG e o CR, não apresentando relação dose-resposta nos tratamentos. Já o extrato CHCl₃ das folhas de *O. puberula* mostrou-se mais efetivo, visto que provocou redução significativa de todos os índices avaliados e em todas as concentrações testadas, indicando uma inibição dose-resposta entre os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ANAYA, A.L. 1999. **Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems**. Critical Reviews in Plant Science 18: 697-739.
- ARAUJO, A. J. **Etudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich) Nees (LAURACEAE)**. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas – Universidade Federal do Paraná.
- ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. S.; Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula*. **Revista visão acadêmica**. Curitiba. Vol. 02, No. 02, Pp. 81-84, 2001.
- ARAÚJO, A. C. R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae)**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.
- BORGES, E.E.L.; LOPES, E.S. & SILVA, G.F. 1993. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I - árvores. **Revista Árvore** 17: 69-84.
- CHOU, C.H. 1999. **Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture**. Critical Reviews in Plant Science 18: 609-636.
- COELHO MFB; MAIA SSS; OLIVEIRA AK; DIÓGENES FEP. 2011. **Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro**. Horticultura Brasileira 29: 108-111.
- CHUNG, I.M.; AHN, L.K.; YN, S.J. 2001. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p. 921-928.
- CUCA, L. E.; LEON, P.; COY, E. D. A bicyclo [3.2. 1] octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of natural compounds** , v. 45, n. 2, p. 179-181, 2009.
- EINHELLIG, F.A. 1999. **An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses**. p.479-494. In: INDERJIT, K.M.M.; DAKSHINI & FOY, C.L. Principles and Practices in Plant Ecology. Boca Raton, CRC Press. FERNANDEZ, C.; MONNIER, Y.; ORMEÑO, E.; BALDY, V.; GREFF, F.; PASQUALINI, V.; MEVY, J.P.; BOUSQUET-MÉLOU, A. 1996. Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an.
- FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(3): 250-255, Jul./Set. 2005.
- FARAGO, P. V.; DUARTE, M, R.; NAKASHIMA, Y. A. T. Análise farmacognóstica das cascas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 85(1): 23-26, 2004.

FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. 323 p.

FERREIRA, A. G. **Interferência: competição e alelopatia**, In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 16.

FERREIRA, A.G., AQUILA, M.E.A., JACOBI, U.S. & RIZVI, V. 1992. **Allelopathy in Brazil**. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, V. (Eds.). Allelopathy: basic and applied aspects. London: Chapman & Hall. 504 p.

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

HAGEMANN, T. R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J. A.; MARTIN, T. N.; PAGLIOSA, E. S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, Campinas, v.69, p.509-517, 2010.

INDERJIT; KEATING, K. I. Allelopathy: Principles, Procedures, Processes, and Promises for Biological Control. Original Research Article. **Advances in Agronomy**, v.67, p. 141-231, 1999.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, p.488-498, 2010.

INOUE, M.T; RODERJAN, C.V. & KUNIYOSHI, Y.S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984.

JUDD, S.W.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed. 632p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª edição. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998, v. 2.

MACHARIA, C. & PEFFLEY, E.B. 1995. **Suppression of *Amaranthus spinosus* and *Kochia scoparia*: evidence of competition of allelopathy in *Allium fistulosum***. Crop Protection 14(2): 155-158.

MILLER, D. A., **Allelopathy in forage crop systems**. Agron J, 88:854-859, 1996.

MONTEIRO, C. A.; VIEIRA, E. L. **Substâncias alelopáticas**. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. 1ª ed. Maringá: EDUEM, 2002, p. 79-104.

MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; SILVA, E. M.; MORENO, S. C.; MARTINS, J. C. **Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas**. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Eds.). Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças. Viçosa: Epamig/CTZM. p. 117-136, 2006.

- PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. **Alelopatia**. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INQUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Ompipax. Cap. 5. p. 95-123. 2011.
- PUTNAM, A. R. **Weed allelopathy**. In: DUKE, S. O. *Weed Physiology*, 1a.ed. Florida: CRC Press, 1985. P. 131-155.
- PUTNAM, A.R. & DUKE, W.B. 1974. Biological Suppression of Weeds: Evidence for Allelopathy in Accession of Cucumber. **Science** 185: 370-372.
- QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P.; **Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil**. *Rodriguésia*, vol.53, No.82, Pp.59–121, Rio de Janeiro, 2002.
- QUINET, A., BAITELLO, J.B., MORAES, P.L.R. DE, ALVES, F.M. & ASSIS, L. 2012. **Lauraceae**. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- REIGOSA, M.J. SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, U.K. & RIZVI, V. **A discipline called allelopathy**. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. (Eds.) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, 1992.p.1-10.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2.ed. revista e atualizada. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. p. 141-142.
- RODRIGUES, L. R. A.; ALMEIDA, A. R. P.; RODRIGUES, T. J. D. **Alelopatia em forrageiras e pastagens**. In: *Simpósio sobre ecossistema de pastagens, 2.*, 1993, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1993.
- RODRIGUES, N, C.; **Alelopatia no manejo de plantas daninhas**. Sete Lagoas. 2016
- ROSADO, L. D. S. **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático da manjerição 'Maria Bonita'**. Lavras; UFLA, 2009.
- SÁNCHEZ, D. C. 2002. **Optimización de bioensayos alelopáticos: aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales**. 2002. 525 p. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Universidad de Cádiz, Porto Real, 2002.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, P.C.Y. & SILVA, R.M.G. 2006. **Germination measurements to evaluate allelopathic interactions**. *Allelopathy Journal* 17: 43-52.
- SCRIVANTI, L.R.; ZUNNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. 2003. **Tagetes minuta and Schinus areira essential oils as allelopathic agents**. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 563-572.
- SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.547-555, 2006.
- SILVA, H.L.; TREZZI, M. M.; MARCHESE, J.A.; BUZZELLO, G.; MIOTTO Jr. E.; PATEL, F.; DEBASTIANI, F; FIORESE, J. Determinação de espécies indicadora e

comparação de genótipos de girassol quanto ao potencial alelopático. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 4, p. 655-663, 2009.

SILVEIRA, P. F. **Efeito alelopático do extrato aquoso da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L).** 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, RN, 2010.

SOUZA SAM; CATTELAN LV; VARGAS DP; PIANA CFB; BOBROWSKI VL; ROCHA BHG. 2005. **Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface.** Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde 11: 29-38.

VYVYAN, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646.

WALLER, G.R. Introduction. In: F.A. MACIAS; J.C.G. GALINDO; J.M.G. MOLINILL; H.G. CUTLER (EDS.). **Recent advances in allelopathy.** Cádiz, Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz, v.1., 1999.

ZANIN, S. M. W.; **Alcalóides aporfinóides em mudas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (Lauraceae).** Curitiba, 2006.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L.; **Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae).** **Química Nova**, Vol. 30, No. 01, Pp. 92-98, 2007.