

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

LUCIANA BARBOSA SOARES CHAMOUN

**Efeito alelopático de nanoemulsões do óleo
essencial de alecrim e óleo-resina de copaíba**

Vitória, ES

2019

LUCIANA BARBOSA SOARES CHAMOUN

**Efeito alelopático de nanoemulsões do óleo essencial de
alecrim e óleo-resina de copaíba**

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Viviana Borges Corte

Coorientador: Prof. Dr. Hidalgo Seibert França

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Espírito Santo

2019

Barbosa Soares Chamoun, Luciana, 1975 – B238e

Efeito Alelopático de nanoemulsões do óleo essencial de alecrim e óleo-resina de
copaíba / Luciana Barbosa Soares Chamoun – 2019.

80 f.: il.

Orientadora: Viviana Corte.

Coorientador: Hildegardo França.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Corte, Viviana. II. França, Hildegardo. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela benção em conseguir essa vitória! Muito Obrigada!!!

Ao meu marido Carlos Augusto Chamoun do Carmo que sempre esteve ao meu lado, seu apoio e incentivo foram fundamentais. Amo você!

Aos meus filhos, Lucas, Ítalo e João, são meus maiores amores e a razão da minha vida.

A toda minha família, minha mãe Neli Barbosa Soares e avó Ana Barbosa Soares pelo exemplo e por me fazerem acreditar na importância dos estudos.

A sogra e amiga Maria Auxiliadora do Carmo e a minha secretária e amiga Jossélia Bispo Pessoa, pelo suporte tão necessário.

A Prof.^a Dra. Viviana Borges Corte pela oportunidade, orientação, amizade, atenção, esclarecimentos e pela conduta exemplar no tratamento com os alunos.

Ao Prof. Dr. Hildegardo Seibert França pela iniciativa do projeto, coorientação e colaboração na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Geraldo Cuzzuol por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Aos colegas do laboratório (LASEF), pessoal muito animado e solícito, Alessandro Bermudes, Camila Reis, Anderson Mariquito, Flávio Perini, Enes Nogueira, Tarsila e especialmente ao meu amigo Josinei Rodrigues Filho, sempre presente e contribuindo com os trabalhos de todos.

Ao técnico de laboratório Maurim, que veio da Universidade Federal de Viçosa, com toda boa vontade, compartilhar seus conhecimentos e desenvolver conosco uma parte dos experimentos. Foi uma semana muito proveitosa!

Ao programa de Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo

A FAPES pela bolsa concedida.

OBRIGADA!!!

RESUMO

Nanoemulsões são sistemas de emulsões formados por dois líquidos imiscíveis e emulsificantes. Elas formam dispersões estáveis, o que facilita a dispersão e, por conseguinte, absorção e atividade biológica do composto. Aliar a nanotecnologia aos conceitos da alelopatia, com a finalidade de testar a eficiência dos metabólitos secundários, pode contribuir de forma promissora para um manejo sustentável na agricultura. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial alelopático do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) e óleo-resina de *Copaifera* spp. (Copaíba), sob a forma de nanoemulsões. Essas foram produzidas na concentração de 5% dos óleos de Alecrim e Copaíba e, posteriormente, diluídas com água destilada à 5, 7 e 10 mg/mL. Foram avaliadas a germinação, crescimento inicial, e a atividade enzimática das sementes da espécie *Lactuca sativa* (Alface). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e para cada tratamento foram feitas 5 repetições. Os dados de germinação e de crescimento foram comparados pelo teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões do óleo essencial de alecrim apresentaram influência alelopática negativa na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), comprimento da folha, comprimento da raiz e redução na atividade da enzima peroxidase. O aumento da concentração proporcionou resultados mais pronunciados nas variáveis analisadas. Isso se deve a atuação específica de seus principais constituintes químicos ou, possivelmente, pela interação entre eles. O monoterpeneo 1,8 cineol é relatado como um potente inibidor e aparece como constituinte majoritário do óleo essencial de alecrim. As nanoemulsões do óleo resina de copaíba demonstraram influência positiva em alguns atributos avaliados. Não houve atividade na %G, comprimento da parte aérea e atividade enzimática. As menores concentrações das nanoemulsões do óleo de copaíba utilizadas neste estudo (5 e 7 mg/mL), apresentaram ação alelopática estimulante no crescimento da raiz. A não interferência alelopática na %G pode ser atribuída à estrutura química do sesquiterpeneo cariofileno, composto encontrado em maior quantidade no óleo de copaíba. Tais resultados indicam que a atividade alelopática está relacionada à constituição e estrutura dos componentes químicos, bem como de sua concentração.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* • *Copaifera* spp • Estresse oxidativo • Enzimas.

ABSTRACT

Allelopathy is defined as the ability of plants to produce chemical compounds that, when released into the environment, can influence, positively or negatively, other plants. Essential oils are secondary metabolites obtained from different parts of the plant, containing volatile compounds that may be associated with biological effects. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) and oil-resin of *Copaifera* spp. (Copaiba), in the form of nanoemulsions, since the efficiency of the compounds can be improved. The nanoemulsions were produced with a concentration of 5% of the oils of Rosemary and Copaiba and, later, diluted with distilled water to 5, 7 and 10 mg / mL. Germination, initial growth, and enzymatic activity of the seeds of the species *Lactuca sativa* (Lettuce) were evaluated. The experimental design was completely randomized and for each treatment, 5 replications were made. The germination and growth data were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test at 5% probability. The results showed that the rosemary essential oil nanoemulsions had a negative allelopathic influence on the germination percentage (% G), germination speed index (GSI), mean germination time (MGT), leaf length, root length and decrease in the activity of the enzyme peroxidase. The increase in concentration led to more pronounced results in the analyzed variables. Such effects are due to the specific action of their main chemical constituents or, possibly, by the interaction between them. The monoterpene 1,8-cineole is reported as a potent inhibitor and appears as the major constituent of the rosemary essential oil. The nanoemulsions of Copaiba oil-resin showed a positive influence on some evaluated attributes. There was no influence on %G, shoot length and enzyme activity. The lowest concentrations of the copaiba oil nanoemulsions used in this study (5 and 7 mg / mL) showed stimulatory allelopathic effect on root growth. The non-allelopathic influence on the %G can be attributed to the chemical structure of the sesquiterpene caryophyllene, a compound found in greater quantity in the copaiba oil. These results indicate that the allelopathic influence is related to the constitution and structure of the chemical components, as well as their concentration.

Key words: *Rosmarinus officinalis* • *Copaifera* spp • Oxidative stress • Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Diagrama do mecanismo de interferência das plantas.....	14
Figura 2 - Atuação dos componentes alelopáticos nos principais mecanismos fisiológicos dos vegetais.....	19
Figura 3 - Visão geral do ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	23
Figura 4 - Via metabólica de formação de EROs nos vegetais.....	27
Figura 5 - Formação do O ₂ ⁻ em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III.....	28
Figura 6 - <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	35
Figura 7 - Copaibeira.....	38

Figuras do artigo

Figura 1 - Comprimento raiz (A) e Comprimento parte aérea (B) de plântulas de alface, submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim.....	69
Figura 2 - Comprimento raiz (A) e Comprimento parte aérea (B) de plântulas de alface, cujas ementes foram submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões do óleo-resina de copaíba.....	71
Figura 3 - Efeitos das nanoemulsões do óleo essencial de alecrim na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), representados pelos gráficos A, B e C, respectivamente.....	73
Figura 4 - Efeitos das nanoemulsões do óleo-resina de copaíba na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), representados pelos gráficos A, B e C, respectivamente.....	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Quantificação e identificação da composição química em óleo essencial de Alecrim.....65
- Tabela 2** - Quantificação e identificação da composição química em óleo-resina de copaíba.....67
- Tabela 3** - Índices de Germinação (IG), Alelopatia (IA), de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo médio de Germinação (TMG) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações da nanoemulsão de alecrim comparados com o controle água destilada (C).....68
- Tabela 4** - Índices de Germinação (IG), Alelopatia (IA), Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo médio de Germinação (TMG) para as sementes de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões de copaíba comparadas como o controle água destilada (C).....70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVO GERAL	13
3. OBJETIVO ESPECÍFICO	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1. NANOEMULSÕES.....	13
4.2. ALELOPATIA.....	15
4.2.1. Alelopatia na agricultura.....	16
4.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	19
4.4. ÓLEOS ESSENCIAIS E ÓLEO RESINA.....	23
4.5 EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS ALELOQUÍMICOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS.....	26
4.5.1. Os aleloquímicos e seus potenciais efeitos no estresse oxidativo.....	28
4.6. FAMÍLIA LAMIACEAE.....	34
4.6.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	35
4.7 FAMÍLIA FABACEAE.....	36
4.7.1 Copaífera spp.....	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO - Efeito alelopático de nanoemulsões do óleo essencial de alecrim e óleo-resina de copaíba.....	55
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Preparo das Nanoemulsões.....	60
2.2 Identificação química dos óleos.....	61
2.3 Bioensaio de germinação.....	61
2.4 Extração das enzimas Catalase, Peroxidase e Superóxido dismutase.....	62
2.5. Determinação da atividade enzimática.....	62
2.5.1. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	62
2.5.2. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7).....	63
2.5.3. Determinação da atividade das superóxidos dismutase (SODs, EC 1.15.1.1).....	63

2.6. Análise estatística.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1 Identificação dos componentes do óleo essencial de alecrim.....	64
3.2 Identificação dos componentes do óleo-resina de copaíba.....	66
3.3 Efeito das Nanoemulsões de Alecrim.....	67
3.4 Efeito das Nanoemulsões de Copaíba.....	70
3.5 Influência dos aleloquímicos no estresse oxidativo.....	72
3.6 Influência das nanoemulsões de alecrim e copaíba na atividade enzimática.....	72
4. CONCLUSÃO.....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

A nanotecnologia é uma ciência emergente com grandes variedades de aplicações, em diversos setores industriais e de consumo, pode oferecer um desempenho melhorado, reduzir o uso de substâncias químicas perigosas, o consumo de energia e materiais e a geração de resíduos (SOM et al, 2010). Sua aplicação na agricultura é recente se comparada à área farmacêutica e de cosméticos. No entanto, está sendo considerada como uma revolução no setor, com investimentos de bilhões de dólares (CHAU et al., 2007).

A aplicação da nanotecnologia para produção de nanoemulsões através da utilização de bioativos naturais, como por exemplo, os óleos essenciais, pode ser promissora para a agricultura. Aliar essa tecnologia com os conhecimentos provenientes dos conceitos alelopáticos, que trata a interação positiva ou negativa entre plantas vizinhas (RICE, 1984; IMATOMI et al., 2015), poderia contribuir para a descoberta de componentes químicos que atuariam como herbicidas naturais. Inclusive, o óleo essencial de plantas aplicado em sementes de diversas espécies agrícolas vem sendo pesquisado pelo seu possível uso como inseticida, bactericida, fungicida e bioerbicida (MIRANDA et al., 2015).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários obtidos de diversas partes da planta, eles contêm compostos voláteis que podem estar associados aos efeitos biológicos. São constituídos por muitas substâncias químicas pertencentes à classe dos terpenóides e fenilpropanóides. Sua ação alelopática pode afetar a fisiologia da planta e a composição e quantidade de enzimas específicas, influenciando nos estágios de desenvolvimento e crescimento (SILVA et al., 2009; SIANI, 2000; DUKE et al., 2000). Eles possuem natureza lipofílica e hidrofóbica, o que dificulta sua dispersão em produtos à base de água (DONSI et al, 2012). Uma alternativa viável de uso é sob a forma de nanoemulsão, a pequena dimensão da gotícula é vantajosa, porque pode melhorar a atividade biológica do composto, por aumentar a superfície de contato facilitando a absorção (SOLÉ et al, 2012; YUKUYAMA et al., 2015; AHMAD. et al., 2014).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) e plantas do gênero *Copaífera* spp (Fabaceae), são conhecidas popularmente como plantas medicinais e produtoras de óleos-essenciais e óleo-resina, que apresentam atividades biológicas, pois possuem em sua composição componentes químicos com princípios terapêuticos, aromatizantes,

bactericidas, fungicidas, anti-inflamatórios e analgésicos (MELO et al., 2011; SANTOS, et al., 2013, BORGES, et al. 2017). Plantas com essas características, vêm despertando interesse por suas potencialidades alelopáticas, pois segundo SOUZA (2005), os constituintes químicos presentes no óleo, responsáveis pelas propriedades medicinais, têm também capacidade de influenciar o crescimento de outros vegetais.

Diante disso, objetiva-se neste estudo trabalhar com o óleo de alecrim e copaíba na forma de nanoemulsão, para testar seus efeitos biológicos sobre sementes de alface, analisando-se a germinação, o crescimento inicial e a atividade enzimática.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar o possível potencial alelopático das nanoemulsões do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e óleo resina de *Copaifera* spp. em diferentes concentrações.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais constituintes químicos presentes em nanoemulsões de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e óleo resina de *Copaifera* spp.
- Investigar os possíveis efeitos alelopáticos das nanoemulsões sobre a germinação, crescimento inicial e atividade enzimática em sementes de alface.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 NANOEMULSÕES

A nanotecnologia caracteriza-se por uma abordagem multidisciplinar e envolve a criação e utilização de diferentes proporções nanométricas de sistemas. Têm grande diversidade de aplicações, como na indústria de cosméticos, medicamentos, pesticida e indústria alimentar (DE VILLIERS et al. 2009; PATEL E VELIKOV 2011). É uma tecnologia revolucionária, porque melhora a lucratividade e oferece redução no consumo de substâncias químicas perigosas, energia, materiais e geração de resíduos (SOM, C. et al, 2010).

A aplicação da nanotecnologia na agricultura é recente se comparada a área farmacêutica e de cosméticos. No entanto, está sendo considerada como uma revolução no setor, com investimentos de bilhões de dólares (CHAU et al., 2007).

Emulsão consiste em um sistema termodinamicamente instável, formado por dois líquidos imiscíveis (água e óleo), sendo um disperso no outro, sob a forma de pequenas gotículas. Existem dois tipos de emulsão: do tipo água em óleo (A/O), onde a água é a fase dispersa e o óleo é a fase contínua ou do tipo óleo em água (O/A), na qual o óleo é a fase dispersa e a água é a fase contínua (YUKUYAMA et al. 2015). As emulsões são usualmente divididas em três grupos: microemulsões, macroemulsões e nanoemulsões.

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis e formam gotículas com diâmetro médio de aproximadamente 10 nm. As macroemulsões são sistemas instáveis termodinamicamente e o tamanho de sua gotícula está entre 0,5 até 100 μm (FORGIARINI et al., 2000).

Nanoemulsões são sistemas de emulsões, que formam dispersões estáveis, cujo tamanho da gota está entre 20 a 200 nm, o que facilita a dispersão e, por conseguinte, absorção e atividade biológica do composto. Esse diminuto tamanho permite que a mistura não sofra os efeitos gravitacionais, apresentando elevada estabilidade cinética (TRADOS et al., 2004; NEMEN & LEMOS-SENA, 2011; MCCLEMENTS 2012). Nanoemulsões tipo óleo em água tem sido investigado há muito tempo, enquanto as do tipo água em óleo, existem poucos estudos (ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002; CHIESA et al., 2008).

Diversos bioativos naturais, encontrados em pesquisas com plantas, são compostos instáveis que podem sofrer reações, perdendo a eficácia ou até mesmo serem degradados. Diante disso, novas tecnologias vêm sendo propostas para melhorar o desempenho dos produtos. As nanoemulsões aparecem neste cenário devido a sua capacidade de veicular substâncias lipofílicas em um sistema disperso aquoso, sendo um meio de transporte mais eficiente que as macroemulsões, pois apresentam tamanho reduzido e isto promove um aumento da superfície de contato com as membranas biológicas (BEDIN, 2011).

4.2 ALELOPATIA

4.2.1 DEFINIÇÃO

Em 1937, o pesquisador alemão Hans Molisch criou o termo “alelopatia”, o qual deriva de duas palavras gregas allélon (mútuo) e pathos (prejuízo). O fenômeno é conhecido como a capacidade que as plantas possuem de liberar no ambiente componentes bioquímicos capazes de favorecer ou prejudicar o metabolismo de outras plantas, incluindo microrganismos (RICE, 1984). Apesar deste termo ter sido estabelecido apenas em 1937, desde a antiguidade filósofos já preconizavam que as plantas são capazes de interferir no desenvolvimento e crescimento de outras. Há registros históricos dos primeiros relatos sobre alelopatia que datam de 300 a.c, no qual Teofrasto, filósofo grego discípulo de Aristóteles, observou que determinadas espécies de vegetais influenciavam no desenvolvimento de outras plantas (YUNES & CALIXTO, 2001; WEIR & VIVANCO, 2004).

Com o passar dos anos a alelopatia vem sendo redefinida. Segundo Taiz e Zeiger (2009) ela é definida como um fenômeno químico ecológico no qual espécies vegetais produzem metabólitos secundários, cuja liberação interfere na germinação e no desenvolvimento de outras plantas vizinhas, proporcionando maior adaptação evolutiva. Num conceito mais amplo, a Sociedade Internacional de Alelopatia define como a ciência que estuda processos que envolvam metabólitos secundários liberados pelas plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos, sendo esta influência positiva e/ou negativa, entre microrganismos, entre microrganismos e plantas, entre plantas cultivadas, entre plantas daninhas e entre plantas daninhas e cultivadas (RICE, 1984; MACÍAS et al., 2000; ALLEM, 2010).

Os primeiros a desenvolverem pesquisas sobre alelopatia no Brasil foram Coutinho e Hashimoto em 1971, eles observaram o efeito inibitório dos extratos aquosos de folhas da espécie *Calea cuneifolia* em sementes de tomate (OLIVEIRA, 2014). A partir desses experimentos pioneiros, muitos estudos foram desenvolvidos. Atualmente, já são conhecidas algumas alterações fisiológicas influenciadas por compostos alelopáticos, como por exemplo: alterações na atividade enzimática (SILVA et al., 2016), peroxidação lipídica (XIA et al. 2017), inibição do transporte de elétrons na respiração e fotossíntese (ABRAHIM et al., 2000) e a influência na viabilidade celular (ZHI-QIANG, 2015).

Segundo Rice (1984), o fenômeno da alelopatia é contrário ao da competição. Na alelopatia ocorre a incorporação de componentes químicos no ambiente e na competição a absorção de elementos abióticos como gás carbônico, água, luz e nutrientes (Figura 1).

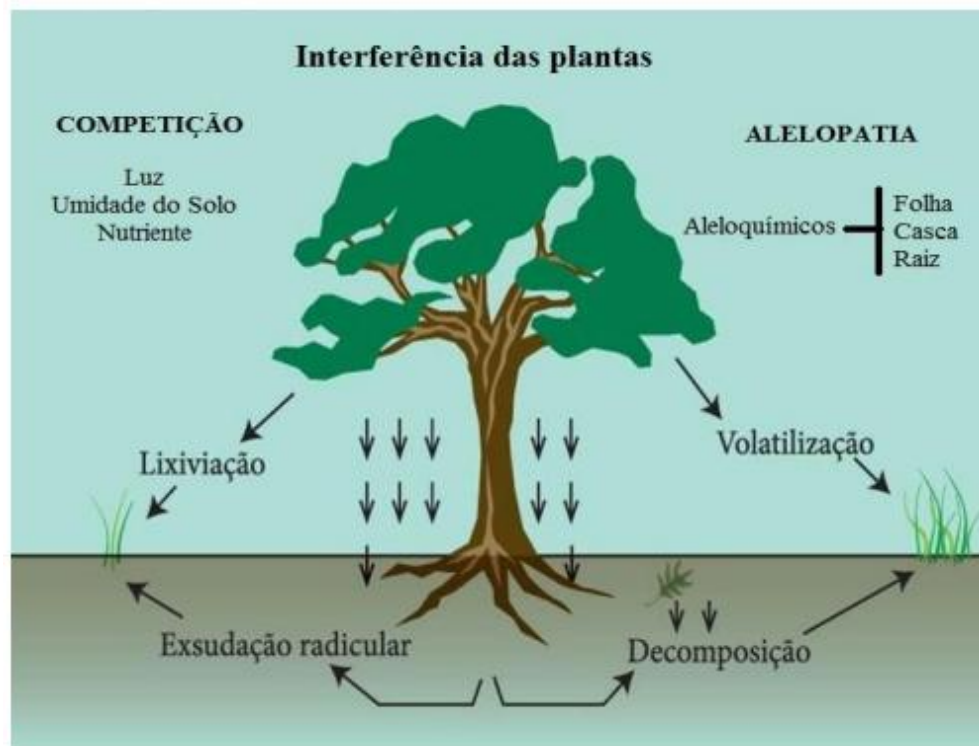


Figura 1: Diagrama do mecanismo de interferência das plantas (competição e alelopatia).

Fonte Adaptado de Chou (2016).

Os compostos químicos liberados pelas plantas que interferem em outros organismos das comunidades são denominados: substâncias alelopáticas, fitotoxinas, aleloquímicos ou produtos secundários (PIRES & OLIVEIRA, 2011).

4.2.2 ALELOPATIA NA AGRICULTURA

Os agrotóxicos são produtos utilizados nas plantações para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas. Apesar de serem eficientes, sua ação sobre os organismos não-alvo, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, os resíduos deixados nos alimentos e a emergência de populações de pragas resistentes, têm motivado o desenvolvimento de meios alternativos de controle (MELO & AZEVEDO, 1998).

Para os agricultores uma das grandes preocupações atuais são as plantas daninhas, pois causam maiores prejuízos à agricultura do que as pragas e as doenças. Elas competem com a cultura por água, luz, nutrientes e espaço físico, afetando o rendimento da produção e reduzindo o valor comercial (PITELLI, 1987; OLIVEIRA, 2010; VASCONCELOS, 2012). Associado a isto, os herbicidas sintéticos têm apresentado atuação cada vez menos efetiva contra as espécies invasoras, devido à seleção de organismos resistentes a esses produtos (GELMINI et al., 2001).

Portanto, para o controle eficaz de plantas daninhas, em substituição ao uso de herbicidas, alternativas de manejo ambientalmente sustentáveis têm sido amplamente valorizadas (BARBOSA et al., 2018). Como uma alternativa promissora tem se destacado a alelopatia (SARTOR et al., 2009).

De acordo com OLIVEIRA (2010), na natureza podem ser encontrados inúmeros compostos químicos, produzidos por plantas ou microrganismos, com capacidade para uso no combate a endemias na agricultura, prevenindo ou eliminando a contaminação do ambiente, conservando os recursos naturais e promovendo a oferta de produtos agrícolas livres de resíduos contaminantes e conseqüentemente com melhor qualidade.

Com a perspectiva de encontrar medidas de controle menos nocivas, às plantas tornaram-se alvo de pesquisas, pois àquelas que possuem compostos com atividade inibitória, têm potencial para serem utilizadas como herbicidas naturais, atuando sobre plantas daninhas e sendo indicativas para a descoberta de novos compostos com ação fitotóxica. Contribuindo assim para melhorar a produtividade e permanência sadia dos cultivares, tornando o meio ambiente mais equilibrado (PERES et al. 2004; MAIRESSE et al, 2007).

A influência de uma planta sobre a outra, pode acontecer diretamente, quando o aleloquímico se liga às membranas da planta receptora ou penetra nas células, agindo sobre seu metabolismo; e indiretamente, pela transformação do aleloquímico no solo ou pela ação de microrganismos. Tais compostos podem levar ao surgimento de plântulas anormais, sendo que a necrose da radícula é um dos sintomas mais comum (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

Pesquisas com alelopatia contribuem para descoberta de metabólitos com função herbicida, fungicida e farmacológica, que aplicados na agricultura, podem prevenir a poluição (DEZOTTI et al., 2002). Apropriando-se do conhecimento sobre a

interferência alelopática, alguns agricultores utilizam desta propriedade como estratégia alternativa para a produção sustentável de alimentos, através do consórcio com espécies cultivadas, que além de prevenir o crescimento de espécies invasoras, também pode impedir o aparecimento de vermes no solo (SCHIEDECK, 2008).

Na natureza os aleloquímicos de determinada espécie podem interferir na germinação e crescimento inicial de plantas vizinhas, de forma benéfica ou prejudicial, influenciados pelo tipo, grupo funcional, propriedade química e concentração no meio de sua atuação (GOLDFARB et al., 2009). A estimulação do desenvolvimento das plantas é um exemplo de atuação positiva que pode ser utilizado na agricultura. Por exemplo, a aplicação do extrato aquoso de falso-boldo (*Coleus barbatus* B.) em sementes de alface germinadas, estimula o crescimento da parte aérea (BACH & SILVA, 2010). O óleo essencial de eucalipto é um estímulo ao crescimento de mudas de sua espécie (STEFFEN et al., 2010).

Da mesma forma que os efeitos positivos são interessantes para agricultura; os negativos também podem ser aplicados para diminuir os prejuízos provocados por insetos, doenças e, principalmente de plantas daninhas. Na bibliografia existem vários trabalhos que demonstram esta interferência, como por exemplo, o óleo essencial extraído do rizoma da espécie *Hedychium coronarium* (lírio-do-brejo) que apresentou efeito inibitório sobre sementes de alface, reduzindo a germinação e índice de velocidade de germinação (MIRANDA, et al., 2015). Em estudo desenvolvido por ROSADO (2009), o óleo essencial de manjerição também demonstrou ação inibitória em sementes de alface, provocando decréscimo na porcentagem de germinação, velocidade de germinação e comprimento da raiz. SOUZA-FILHO et al. (2009), trabalhando com óleo essencial de pimenta-longa e oriza sobre as invasoras malícia e mata-pasto, observaram ação inibitória da pimenta longa superior ao da oriza, influenciada pelo aumento da concentração do óleo, sendo a espécie malícia a mais sensível aos aleloquímicos.

De acordo com FERREIRA & ÁQUILA (2000), todas as plantas produzem metabólitos secundários, variando sua quantidade e qualidade de acordo com a espécie e também pelas interferências ambientais e de cultivo, no qual as plantas estão expostas. O estudo da alelopatia e a descoberta de espécies que possuam moléculas bioativas é de grande importância para a agricultura, no controle de plantas daninhas e como forma de manejo mais adequado (CARVALHO et al, 1996). Dos compostos alelopáticos utilizados na

agricultura, os bioerbicidas ganham destaque, pois favorecem a agricultura sustentável (SOUZA-FILHO et al., 2006)

O entendimento de como os compostos alelopáticos atuam, pode ser promissor para a descoberta de fitotoxinas naturais, produzidas por plantas ou microrganismos, com capacidade para serem utilizadas como herbicidas naturais específicos e menos prejudiciais ao ambiente (MACIAS et al., 1998).

Segundo VENDRAMIM (2000), os compostos naturais extraídos das plantas são uma alternativa sustentável para o controle de pragas, visto que são renováveis, biodegradáveis, considerados produtos orgânicos, o desenvolvimento de resistência por insetos a estes compostos é lento, não deixam resíduos nos alimentos, possuem baixo custo e são seguros, sendo acessível aos pequenos produtores.

Diante disso, é notável que estudos experimentais com alelopatia contribuem para percepção da dinâmica entre as espécies vegetais e para um melhor entendimento e uso como forma de manejo alternativo de culturas (SOUZA-FILHO et al. 2010). Nas últimas décadas, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar substâncias que possuam capacidade de utilização na agricultura como herbicidas naturais, reduzindo assim a utilização de defensivos químicos e minimizando os danos ao meio ambiente (DUKE et al. 2002; GOLDFARB et al., 2009).

4.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários não se assemelham aos primários. Eles são específicos, estão presentes em todas as espécies vegetais, atraem polinizadores e atuam na defesa contra herbívoros (FERREIRA E AQUILA, 2000; TAIZ E ZEIGER, 2009). Podem ser produzidos em diversas partes da planta, como rizomas, flores, gemas, frutos, folhas, caules aéreos, sementes e raízes (PUTNAM, 1985). No entanto, são mais expressivos em folhas e raízes (WESTON, 1996). Durante a evolução das plantas, tais compostos possibilitaram algum benefício contra a ação de diferentes microrganismos, insetos, vírus e outros organismos prejudiciais, garantido o desenvolvimento e crescimento da planta (WALLER, 1999).

Os aleloquímicos são provenientes do metabolismo secundário das plantas e também são chamados de metabólitos secundários. Esses compostos são encontrados em

diversas partes da planta e distribuídos em concentrações variadas durante o seu ciclo de vida. Quando liberados em quantidades suficientes provocam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microorganismos (CARVALHO, 1993).

Plantas que estão próximas competem por recursos do meio, como nutrientes, água e luz. Dessa forma, é mais comum que essa interação seja negativa e a emergência e o crescimento de uma ou de ambas sejam prejudicados (PIRES e OLIVEIRA, 2011). Entretanto, determinada fitotoxina pode apresentar diferentes efeitos, que serão influenciados pelo tipo, grupo funcional, propriedade química e concentração no meio que está agindo (BARBOSA et. al. 2005).

A influência dos aleloquímicos é complexa, podendo ocorrer seletividade entre a ação do componente aleloquímico e a resposta da planta. Classes de químicos como compostos fenólicos, terpenóides, alcalóides, esteróides, aminoácidos e hidratos de carbono, podem atuar mutuamente e alcançar uma resposta alelopática maior do que agindo individualmente (FERGUSON et al., 2013).

Os aleloquímicos estão relacionados com vários efeitos nas plantas. Sua interferência resulta no atraso ou inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, ataque ao sistema radicular, murcha, clorose e morte das plantas (CORREIA, 2002). Entretanto, compostos que são tóxicos para algumas espécies de plantas, podem não ser para outras (RICE, 1984).

Os compostos alelopáticos interferem na fisiologia da planta, pois essas fitotoxinas podem prejudicar funções distintas, incluindo divisão celular (SANCHES et al., 2008), inibição do transporte de elétrons na respiração e fotossíntese (ABRAHIM et al. 2000), assim como modificações na atividade enzimática (SILVA et al., 2016). Além, de originar efeitos colaterais indistinguíveis dos principais (Figura 2).



Figura 2: Atuação dos componentes alelopáticos nos principais mecanismos fisiológicos dos vegetais. Fonte: Goldfarb (2009).

Mesmo depois da morte da planta, os aleloquímicos se mantêm nos tecidos vegetais. Essas substâncias são liberadas pela planta ou de partes dela no meio por volatilização, se forem substâncias voláteis; lixiviação ou decomposição de resíduos e exsudação radicular, por meio de orvalho e chuva (quando solúveis em água), deslocando-se no solo e, na concentração adequada interferindo no desenvolvimento de outras plantas (RICE, 1984; ALMEIDA, 1991; ALMEIDA et al. 2008).

De acordo com Miller (1996) a interferência alelopática pode ocorrer de duas formas. Uma delas, é a autotoxicidade, cuja liberação de componentes fitotóxicos irá interferir no crescimento e desenvolvimento de plantas pertencentes à mesma espécie. A outra, é a heterotoxicidade, no qual fitotoxinas são exsudadas das raízes ou liberadas pela decomposição de resíduos de uma espécie vegetal e afetar a germinação e crescimento de outra planta (ALMEIDA et al., 2008).

Segundo ALMEIDA (1998), a alelopatia é influenciada também por fatores externos como condições climáticas, tipos de solos, interação e transformação dos compostos alelopáticos. Vários aleloquímicos apenas atuam na presença de outros, numa relação de

sinergismo, sendo necessário uma concentração apropriada para ocorrência dos efeitos alelopáticos.

Pesquisas envolvendo os conceitos alelopáticos avaliam a ação de vários extratos e metabólitos secundários bioativos, retirados de material vegetal (IMATOMI et al., 2013b). Muitos métodos podem ser aplicados na identificação de compostos alelopáticos e, vários em laboratório. Os testes são realizados com a obtenção de extratos de plantas, por meio do emprego de solventes orgânicos, como o etanol, metanol ou acetato de etila, e a água (VIDAL, 2010).

Os compostos secundários, incluindo os óleos essenciais, são normalmente classificados de acordo com a sua rota de biossíntese (HARBONE, 1999). Frequentemente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, notáveis atividades biológicas e, diferentemente dos metabólitos primários, aparecem em baixas concentrações e em grupos de plantas específicos (BERG; LUBERT, 2008). Podem ser divididos quimicamente em três grupos distintos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (TAIZ & ZEIGER, 2009).

De acordo com SANTOS et al. (2004) os terpenóides ou terpenos são a maior classe de metabólitos secundários encontrados nas plantas, geralmente são insolúveis em água e biossintetizados a partir do Acetil-Coa ou de intermediários glicolíticos, através da justaposição de isopentenilpirofosfato. Esse dá origem a todos os terpenos: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (CROTEAU et al., 2000; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, eles geralmente são formados quando ocorrem situações de estresse como ferimentos, infecção, radiação UV e outros (NACZK & SHAHIDI, 2004). Quimicamente, possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (LEE et al. 2005). São usualmente encontrados em plantas e possuem diversos fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina, podem desempenhar função de agente antipatogênico e contribuir na pigmentação. Há, aproximadamente cinco mil fenóis, dos quais, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Os alcalóides são compostos nitrogenados que normalmente possuem um anel de estrutura variável com um estado de oxidação negativa. Sua grande maioria possui

caráter alcalino, uma vez que contém o grupamento amina, que os conferem caráter básico (HENRIQUES et al., 2003). Geralmente são provenientes do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina). Conferem à planta proteção por serem tóxicos. Entretanto, podem atuar como reserva de nitrogênio, reguladores de crescimento, metabolismo interno e da reprodução, agentes de desintoxicação e proteção contra radiação UV (ROBBERTS et al., 1997).

A fitotoxicidade dos metabólitos secundários está bem determinada, sendo estes compostos fonte de potenciais herbicidas naturais, tanto para uso direto, quanto para servirem como modelos moleculares para síntese de novos agroquímicos (ZIMDAHL, 1993).

4.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E ÓLEO RESINA

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de materiais vegetais como: flores, folhas, ramos, ervas, frutos, raízes e casca. Tornaram-se muito importantes, como matérias-primas, para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticas. Sua constituição é complexa, podendo conter até 100 ou mais compostos orgânicos e são provenientes do metabolismo secundário das plantas (SIMÕES et al., 2003).

O óleo-resina de copaíba é chamado assim, porque trata-se de um exsudato, extraído do caule da copaibeira, compostos por ácidos resinosos e produtos voláteis (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). É formado por uma parte resinosa sólida, que está diluída na parte volátil do óleo essencial. A parte resinosa representa cerca de 55 a 60% do óleo, composta por diterpenos; a outra parte, volátil, é constituída principalmente de sesquiterpenos, sendo obtida do óleo resina por arraste a vapor (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2006).

Atualmente, espécies produtoras de óleos essenciais vêm sendo utilizadas na indústria de perfumes, alimentos, medicina popular e atividades agrícolas, em decorrência de sua ação como inseticida, fungicida, bactericida e bioerbicida, atuando como um potente inibidor da germinação de sementes (DUKE, et al., 2000; SONOWA & KÖNIG, 2001; BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004, SOUZA-FILHO et al., 2010). Portanto, os óleos essenciais são compostos voláteis que podem ter relação com a atividade alelopática (DUKE, et al., 2000).

Os óleos essenciais são misturas que envolvem diferentes componentes que interagem entre si, não sendo completamente conhecido seu modo de ação sobre os organismos. Além disso, suas variações químicas indicam que os óleos essenciais, enquanto metabólitos secundários, tem sua constituição e quantidade de compostos ativos influenciados por diversos fatores ambientais, pela sazonalidade, condições de coleta, estabilização e estocagem (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Sua atuação sobre a germinação de sementes pode ser, geralmente, explicada em função da atuação isolada de seus principais constituintes (SOUZA-FILHO et al., 2009).

Embora seja recente, dentre as espécies vegetais estudadas em função de seu potencial alelopático, destacam-se as plantas medicinais (FORTES et al., 2009). Essas são produtoras de óleos essenciais que podem apresentar atividade alelopática, pois os mesmos constituintes químicos responsáveis pelas propriedades medicinais são ativos influenciando positiva ou negativamente no crescimento de outras plantas (SOUZA et al., 2005). MOURA et al., (2013) trabalhando com óleo essencial de várias espécies de plantas medicinais sobre a germinação e crescimento inicial de picão-preto e pimentão, observaram que o efeito do óleo essencial de alho promoveu baixa atividade alelopática, no entanto, foram expressivos os resultados obtidos com óleo essencial de alfavaca-cravo, canela e cravo-da-índia sobre o desenvolvimento da radícula e da parte aérea, tanto de picão-preto como de pimentão, indicando um significativo potencial alelopático.

Geralmente, estes compostos são constituídos por derivados terpênicos, incluindo os monos e sesquiterpenos e também fenilpropanóides (SOLÓRZANO-SANTOS, MIRANDA-NOVALES, 2012). Sua produção é influenciada por fatores genéticos e epigenéticos, ontogênicos e ambientais (ROBERTS et al., 1997). Seus compostos terpênicos podem apresentar várias funções orgânicas, como álcoois, cetonas, éteres, ésteres e aldeídos.

Os terpenóides são originários do mevalonato, enquanto os fenilpropanóides derivam do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico (Figura 3). Os fenilpropanóides são compostos naturais, geralmente voláteis, largamente distribuídas nos vegetais e considerados, juntamente com os monoterpênicos, óleos essenciais (PERES, 2004).

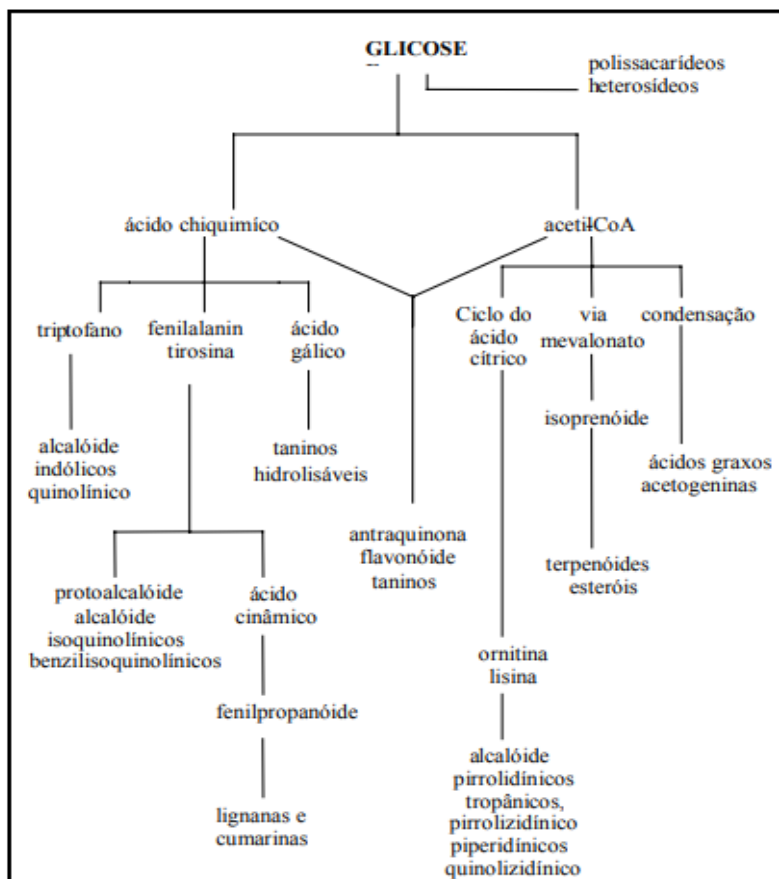


Figura 3: Visão geral do ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: SIMÕES et al., 2003

Nas plantas, os óleos essenciais desempenham diversas funções importantes, agindo como fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica e defesa contra herbívoros, feromônios, hormônios vegetais, moléculas de sinalização e aleloquímicos (CASTRO et al. 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os monoterpenos compreendem o grupo de compostos identificados como maior potencial inibidor, pois causam alterações na estrutura e função das membranas, impedindo o crescimento e atividade das células (ROSADO et al., 2009). Em estudo realizado por MIRANDA et al. (2015), com óleo essencial extraído do rizoma e folhas da planta “lírio do brejo” sobre sementes de alface, foi observado maior efeito inibitório provocado pelo óleo extraído do rizoma, provavelmente, devido a maior constituição de monoterpenos. O potencial alelopático dos óleos essenciais é com frequência atribuído a sua composição por monoterpenos. Estes compostos, podem afetar a germinação e

crescimento das plantas, por provocarem alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas, como as inibições da cadeia respiratória da matriz mitocondrial isolada e mitose, alteração da integridade das membranas das células, deterioração das ceras cuticulares, aumento da transpiração, peroxidação lipídica e danos aos microtúbulos (MIRANDA et al., 2014). Devido a isso, torna-se fundamental a análise comparativa do potencial fitotóxico dos óleos essenciais e de seus principais constituintes.

Os óleos essenciais podem ser extraídos por destilação a vapor, hidrodestilação, extração por solventes e outros (OLIVEIRA et al., 2012). A hidrodestilação é um método simples e muito utilizado, em laboratório, para extração do óleo essencial. Ele é realizado colocando-se a matéria prima em água e aquecendo-se até 100° C, essa temperatura é ideal para ebulição da água e mais alta que a necessária para os compostos do óleo, volatilizando-os. Logo após, componentes do óleo e vapor de água passam por um condensador, como são imiscíveis, são formadas duas fases (água e óleo) que vão para um recipiente separador (ABDELLATIF; HASSANI, 2015).

Atualmente, a Cromatografia gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS), é um dos métodos mais eficientes e utilizados para identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, pois os componentes destes apresentam baixo peso molecular (< 300 Dalton; aproximadamente $4,98 \times 10^{-25}$ Kg/mol). O óleo puro, sem nenhum tratamento, é injetado no cromatógrafo, dessa forma evita-se qualquer contaminação proveniente de pré tratamento. No cromatógrafo, os constituintes do óleo essencial se separam e penetram no espectrômetro de massas. Este, registra o correspondente espectro de cada uma das substâncias separadas, em seguida tais espectros são comparados com diferentes padrões de fragmentação de espectros de massas que estão contidos nas bibliotecas de espectros. Dessa forma, os espectros obtidos do óleo são correlacionados com o banco de dados da biblioteca e torna-se possível sua identificação química. A biblioteca Adams é um exemplo de base de dados com espectros de massas de vários componentes (SERAFINI et al., 2002).

4.5 EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS ALELOQUÍMICOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS

Em países onde os estudos com alelopatia estão começando ou até mesmo naqueles onde estão mais avançados, o uso de extratos brutos é um dos procedimentos mais empregados, inicialmente, em prospecção de atividade alelopática da planta de

interesse, o isolamento e a identificação dos aleloquímicos ocorre em poucos casos. São utilizados extratos com alta polaridade, como os extratos aquosos, hidroalcoólicos ou metanólicos. É utilizada esta técnica, pois acredita-se que os compostos químicos de alta polaridade possuem alta atividade alelopática e correlacionam isto ao potencial alelopático da espécie em estudo, o que pode ser um erro em alguns casos (SOUZA FILHO et al., 2010).

As plantas produzem uma infinidade de metabólitos com diferentes polaridades, podendo ser de baixa, média e alta polaridade. Diversos aleloquímicos de baixa polaridade apresentam alta atividade biológica, incluindo monoterpenos, monoterpenos oxigenados, diterpenos e outros. Sendo assim, quando são utilizados apenas os extratos de alta polaridade; os de baixa, acabam sendo perdidos. Os óleos essenciais são um bom exemplo, pois são constituídos, principalmente, por compostos de baixa polaridade e vêm apresentando, em vários estudos, alta atividade fitotóxica. Dessa forma, em estudos onde a espécie não é conhecida, o ideal é a preparação de dois tipos de extrato: um de baixa polaridade e outro de alta polaridade (SOUZA FILHO et al., 2010).

Muitas são as técnicas utilizadas para extração dos aleloquímicos, basicamente, se faz a trituração de partes da planta (folhas, raízes, sementes, caule e frutos) e adiciona-se um extrator orgânico (álcool, acetona, éter, clorofórmio, etc.) ou água, obtendo-se, logo após a filtração, o extrato com os compostos alelopáticos (WEIR et al., 2004).

Em estudos alelopáticos são utilizadas espécies que apresentam sensibilidade aos aleloquímicos, isso que possibilita obter um indicativo das interferências alelopáticas das espécies doadoras (FERREIRA & ÁQUILA, 2000) A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie muito utilizada nos bioensaios para verificar a atividade alelopática, por ter sensibilidade a agentes químicos, germinação rápida, facilidade de cultivo, crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e, insensibilidade aos potenciais osmóticos das soluções (RICE, 1984; FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

A germinação de sementes tem sido muito utilizada em bioensaios de alelopatia, pois é um bom indicador das reais potencialidades de um dado aleloquímico (CHIAPUSIO et al., 1997). O bioensaio, frequentemente, empregado é a inibição (ou em certos casos o estímulo). Normalmente, os ensaios de germinação e de análise do crescimento de plântulas são conduzidos em placas de Petri forradas com papel de filtro e umedecidas com soluções de extratos vegetais. Além disso, controla-se o fotoperíodo e a

temperatura ótimos para a espécie de semente escolhida. Essa forma é muito usada nos experimentos, por ser simples, prático, barato e rápido (DUKE et al. 2000). Na maioria das vezes, esse tipo de avaliação auxilia no biomonitoramento de cada etapa do isolamento, purificação e identificação de aleloquímicos, direcionando as ações de seleção das frações com melhor potencial alelopático (MACÍAS et al., 2000).

Efeitos fisiológicos, provocados pelas interações alelopáticas, são constantemente observados pela inibição da porcentagem e velocidade da germinação e na redução do crescimento inicial, sendo respostas secundárias de efeitos primários que ocorrem no processo metabólico das plantas afetadas (Pedrol et al. 2006). Pois, geralmente, os compostos alelopáticos interferem em processos vitais do metabolismo da planta, incluindo a fotossíntese, assimilação de nutrientes, respiração, síntese de proteínas, atividades enzimáticas, permeabilidade da membrana e no desenvolvimento da planta (SIQUEIRA et al., 1991).

4.5.1 OS ALELOQUÍMICOS E SEUS POTENCIAIS EFEITOS NO EXTRESSE OXIDATIVO

Com o surgimento dos organismos fotossintetizantes, o oxigênio passou a acumular-se na atmosfera e ser utilizado pelos organismos aeróbicos como acceptor final de elétrons no processo de respiração celular, no qual ocorre a queima da glicose e liberação de energia em quantidade superior comparado a fermentação. Apesar de necessário para a realização das funções celulares, o O₂ leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em processos metabólicos que acontecem nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

As EROs são formas reduzidas de oxigênio energeticamente mais reativas que o oxigênio molecular, sendo compostos com maior facilidade em reagir com outras substâncias e capazes de gerar danos aos componentes celulares, como : peroxidação lipídica de membranas, inativação de enzimas devido a desnaturação, oxidação de carboidratos, danos na conformação dos ácidos nucleicos e do complexo do fotossistema II (PS II) (GILL & TUTEJA, 2010) . As formas mais comuns de EROs encontrados nas células são:

- radicais superóxido (O₂⁻)

- hidroxila (OH^-)
- peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
- oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)

Como consequência de sua configuração eletrônica, o oxigênio, devido ao metabolismo aeróbico, tornou-se o principal oxidante. Este recebe um elétron de cada vez, o que resulta na formação de compostos intermediários altamente reativos, as EROs (Figura 4).

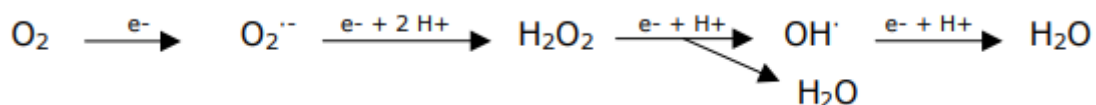


Figura 4: Via metabólica de formação de EROs nos vegetais.

Fonte: MORI & SCHROEDER, 2004 (Adaptado)

O primeiro composto obtido é o radical superóxido, formado quando o O_2 sofre a redução univalente isoladamente. Esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico. Como ele não é capaz de atravessar as membranas biológicas, é rapidamente dismutado a H_2O_2 . Os radicais hidroperoxila (HO_2^-) que são formados a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$ por protonação em soluções aquosas, podem atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados e hidroperóxidos de lipídeos, iniciando então, a auto-oxidação de lipídeos (BHATTACHARJEE, 2010). O radical superóxido pode ser produzido nos vegetais através de diversos mecanismos, um que se destaca é o mecanismo de transferência de elétrons da mitocôndria e cloroplastos (Figura 5). Geralmente, causa oxidação de diversas moléculas orgânicas, dentre elas o ascorbato, pode também atuar como redutor de metais como Fe^{3+} , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (BREUSEGEM et al., 2001).

Reação de Fenton ou Haber-Weiss

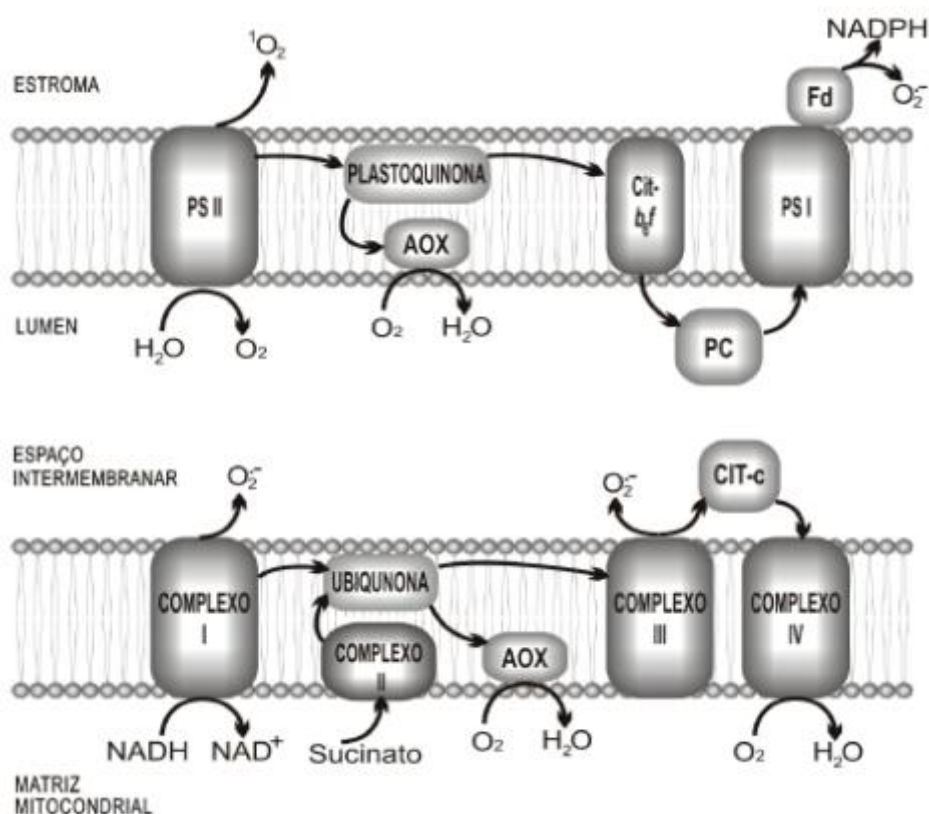
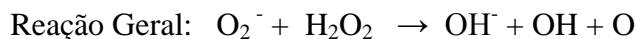
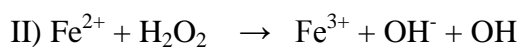
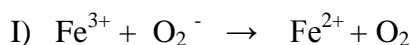


Figura 5: Formação do O_2^- em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III.

Fonte: BARBOSA et al., 2014

A hidroxila (OH^-) é a mais reativa das EROs, sendo formada a partir de O_2^- ou H_2O_2 na reação de Haber-Weiss. Apesar de apresentar meia vida curta (< 1 ms) é potencialmente forte e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e não específicas com diferentes substratos, além disso, ainda é capaz de reagir com todos os tipos de biomoléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Uma vez formado, o radical hidroxila OH^-

pode promover quebra e modificações nas bases de DNA das células, o que acarreta em alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, modificações em proteínas, danos às moléculas de carboidratos e remoção de átomos de hidrogênio dos grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, induzindo à peroxidação lipídica (BARREIROS, 2006).

O peróxido de hidrogênio H_2O_2 é moderadamente reativo, não possui carga, apresenta uma longa meia-vida celular (1 ms) e tem a capacidade de difundir-se livremente através das membranas, migrando para distintos compartimentos. Sendo assim, propaga os danos e atua como mensageiro da condição de estresse. Além disso, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol e também apresenta ação deletéria, pois atua na formação de $OH\cdot$. Grande parte do H_2O_2 celular é resultado da dismutação do O_2^- catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) (APOSTOL et al., 1989; KARUPPANAPANDIAN et al, 2011).

O oxigênio singlete (1O_2) por muito tempo foi considerado uma molécula fortemente tóxica, porém de pouca difusão e, devido a isso, com capacidade apenas de provocar danos próximo ao seu local de produção (FOYER et al., 1994). Semelhante aos radicais hidroxila possui, aproximadamente (< 2 ms) de vida e grande potencial destrutivo, reagindo com várias biomoléculas. Em estudos atuais, têm sido observado que o 1O_2 pode percorrer distâncias significativas a partir do seu sítio de produção, sendo responsável, de modo geral, pela peroxidação lipídica que ocorre nos cloroplastos. (TRANTAPHYLIDES & HAVAUX, 2009).

Na década de 90, acreditava-se que o surgimento de radicais livres nas células das plantas, seria um mecanismo de defesa dos vegetais ao combate de patógenos, entretanto com o avanço das pesquisas, foi demonstrado que diversos fatores abióticos como luz, temperatura, estresse hídrico, fatores bióticos e a presença de aleloquímicos no meio, podem conduzir ao estresse oxidativo nas células vegetais (GNIAZDOWSKA et al., 2014).

Os aleloquímicos afetam a germinação das sementes, pois apresentam influência direta ou indireta no equilíbrio entre produção e eliminação de radicais livres nas células vegetais, induzindo ao estresse oxidativo. Um exemplo de sua interferência é o bloqueio da cadeia de transporte de elétrons da respiração ou da fotossíntese, o que ocasiona a reação destes elétrons com o oxigênio, resultando na formação do radical superóxido e

também de outras EROs. Estas podem prejudicar processos fisiológicos vitais, a germinação e o crescimento inicial (FERREIRA & AQUILA, 2000; ALMEIDA et al., 2008).

Como resposta ao acúmulo de EROs, em especial os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos com potencial para aniquilar a toxicidade das EROs. As enzimas antioxidantes estão presentes em distintos compartimentos celulares e cooperam para o controle das EROs em plantas, o que assegura o equilíbrio redox no sistema. Destacam-se entre as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), peroxidases (POX) e catalase (CAT). Entre os principais componentes antioxidantes não enzimáticos, encontram-se o ácido ascórbico (AsA), a glutatona (GSH), o α -tocoferol e os carotenóides (DINAKAR et al., 2012). Estas moléculas antioxidantes, ocorrem nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos e são capazes de evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação. Dessa forma, evitam ou previnem danos às células vegetais (SERKEDJIEVA, 2011; BARBOSA et al., 2004).

As SODs são metalo-enzimas que atuam primariamente no mecanismo de defesa contra as EROs, tais enzimas são capazes de dismutar dois radicais do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Elas são essenciais na modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002). Sendo assim, a atuação das enzimas influencia diretamente na concentração das duas EROs envolvidas na reação de Haber-Weiss, fazendo parte do mecanismo fundamental de defesa dos organismos, dificultando a formação do radical OH^\cdot (LEÓN et al., 2002). São classificadas conforme seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/ZnSOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL & TUJETA, 2010). A Cu/Zn-SOD é encontrada no estroma dos cloroplastos, a Mn-SOD e a Fe-SOD estão presentes em células procarióticas e eucarióticas na matriz mitocondrial (MALLICK & MOHN, 2000).

A atuação da CAT é primordial na eliminação de H_2O_2 , gerado pelas SODs, β -oxidação dos ácidos graxos e pelo processo da fotorrespiração, principalmente em situações de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão muito elevados. Na sua ação ela converte duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular. Devido a isso, são consideradas indispensáveis na eliminação de EROs (DUBEY, 2011). É principalmente

encontrada nos peroxissomos, podendo estar presente em mitocôndrias e no citoplasma, os cloroplastos não possuem a enzima (MONTAVON et al., 2006).

A POX também está associada à eliminação do H_2O_2 , da mesma forma que a CAT, essa enzima transforma o peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 e age removendo o peróxido de hidrogênio gerado pelas SODs e pelas reações metabólicas (BARBOSA, 2014; GILL & TUTEJA, 2010). Dessa forma, CAT e POX podem atuar de forma sincronizada com as SODs garantindo assim tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007). As peroxidases podem ser encontradas na parede celular e no vacúolo, algumas são continuamente produzidas, enquanto outras, apenas produzidas na ocorrência de estresse ambiental. A baixa atividade da enzima indica sintoma de estresse menos grave, já a alta atividade, sintoma mais grave (BARBOSA, 2014).

A ascorbato peroxidase (APX) propicia a degradação do H_2O_2 utilizando o ascorbato como substrato, a enzima é fundamental na defesa de tecidos fotossintéticos contra o estresse fotooxidativo, ela é encontrada também no citosol das células não fotossintetizantes atuando na redução dos níveis de EROs (ASADA, 1992). Como apresenta alta afinidade com o peróxido de hidrogênio, a APX é uma das principais enzimas envolvidas na eliminação rápida de H_2O_2 , eliminando-o mesmo estando em baixas concentrações. Ao contrário da catalase, que age removendo o excesso de peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002).

A glutathione redutase (GR) atua catalisando a reação de redução da glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH). A enzima pode ser encontrada em cloroplastos e mitocôndrias, sendo que sua síntese ocorre no citoplasma da célula e, logo após a enzima é enviada para as organelas (MULLINEAUX & CREISSEN, 1997). Quando ocorre um aumento das espécies reativas de oxigênio, as plantas, conseqüentemente, aumentam a produção de SOD, CAT, POX e GSH como mecanismos de defesa. No entanto, conforme o tipo de aleloquímico, a atividade enzimática sofrerá inibição, prejudicando o crescimento e desenvolvimento da planta (WEIR et al., 2004).

O ácido ascórbico (AsA), em decorrência de sua capacidade em eliminar EROs, é um dos componentes antioxidantes não enzimáticos mais importantes. Juntamente com a GSH, participa do Ciclo do Ascorbato-Glutathione, no qual o peróxido de hidrogênio é eliminado pela APX devido a peroxidação do ácido ascórbico. A recuperação do AsA

ocorre por meio da oxidação da GSH que torna a ser reduzida pela glutathione redutase (DINAKAR et al 2012).

Os carotenóides funcionam como um filtro da luz visível e UV e diminuem os danos celulares causados pela luz. O oxigênio singlete produzido nas membranas dos tilacóides pelo PS II é eliminado pelo α -tocoferol e carotenóides. Os genes responsáveis pela produção do α -tocoferol foram identificados. Essa molécula apresenta natureza lipossolúvel e apenas os organismos fotossintetizantes são capazes de sintetizá-la. Muitos fatores de estresse abiótico desencadeiam o aumento do teor de α -tocoferol e estudos indicam sua atuação na proteção dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), o que evita a peroxidação dos lipídios de membrana pelas EROs (MAEDA & DELLAPENNA, 2007).

4.6 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae, é representada por diversas espécies de plantas com interesse econômico e medicinal. São cosmopolitas, originárias das regiões mediterrâneas, Oriente Médio e das montanhas subtropicais. Apresenta mais de 300 gêneros com um extenso número de espécies, aproximadamente 7.500. No Brasil há 26 gêneros com cerca de 350 espécies (WATSON & DALLWITZ, 1992)

Morfologicamente apresentam-se como ervas, arbustos ou árvores. Possuem folhas simples, opostas ou verticiladas e sem estípulas, geralmente são serreadas e revestidas por pequenos pelos responsáveis pela secreção de óleos aromáticos e voláteis. Tem como característica principal, seu aroma bastante marcante e fácil de distinguir (WATSON & DALLWITZ, 1992; LORENZI & MATOS, 2002).

O óleo produzido pelos representantes desta família é muito utilizado na indústria de cosméticos devido a seu aroma característico. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso como condimento e algumas por apresentarem propriedades medicinais, sendo utilizado na medicina popular e tendo sua atividade biológica relatada por vários autores (LORENZI & MATOS, 2002; JOLY, 2002).

Algumas espécies da família Lamiaceae já demonstraram potencial alelopático, como por exemplo o hortelã (*Mentha villosa* Becker) que provocou inibição na germinação e no desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) (PARREIRAS et al., 2011) e o falso-

boldo que diminuiu o índice de velocidade de germinação da alface ((PELEGRINI & CRUZ-SILVA, 2012) e impediu a germinação e o desenvolvimento da parte aérea do trigo (*Triticum aestivum* L.) (NEIS & CRUZ-SILVA, 2013).

4.6.1 *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis L., conhecida popularmente como alecrim é uma erva aromática, distribuída na região do mediterrâneo e cultivada em várias partes do mundo, incluindo o Brasil (DUKE, 2000). Várias das espécies introduzidas no Brasil são produtoras de óleos essenciais com propriedades medicinais (BARROSO, 1991). É uma planta com um aroma característico e refrescante, sendo uma erva com grande importância na atualidade por apresentar atividades antioxidantes (PORTE & GODOY, 2001) (Figura 6).

É muito valorizada e largamente utilizada na indústria farmacêutica e também na medicina popular por suas propriedades medicinais (HALOUI et al., 2000). Vários extratos, óleos essenciais e constituintes químicos isolados desta espécie demonstram uma série de atividades biológicas (DORMAN et al., 2003).

Os óleos essenciais extraídos do alecrim são misturas complexas de substâncias voláteis. Eles despertam interesse, pois apresentam efeito antioxidante (BAKIREL et al., 2008), antifúngico (GAUCH et al., 2014), antidepressivo (MACHADO et al., 2013), antibacteriano (OJEDA-SANA et al., 2013) e anti-inflamatório (MELO et al., 2011). Tais propriedades são atribuídas a seus constituintes químicos, conhecidos coletivamente como metabólitos secundários das plantas (ATTI-SANTOS et al., 2005). Sua constituição química pode variar de acordo com vários fatores, tais como clima, solo, sol, procedimento de exposição e extração. No entanto, os quimiotipos mais comumente relatados são cineoliferum, composto principalmente de 1,8-cineol, e ácido canfórico (NAPOLI et al. 2015). Para ROMAGNI et al. (2000), o componente químico 1,8 cineol apresenta atividade fitotóxica e esta pode afetar a germinação e desenvolvimento de sementes de alface, ou seja, possivelmente tal composto tenha ação alelopática.



Figura 6: *Rosmarinus officinalis* L.

4.7 FAMÍLIA FABACEAE

A divisão de Fabaceae em famílias ou subfamílias vem provocando debates e muitas discussões entre os autores. É considerada, habitualmente, uma única família com três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae), apesar de alguns autores serem contrários a esta classificação, dentre eles Cronquist (1981) que prefere considerar três famílias distintas (Fabaceae, Caesalpinaceae e Mimosaceae), ela é a mais aceita, pois essas famílias não constituem grupos monofiléticos, especialmente a Caesalpinaceae. Dessa forma, esse estudo considera as leguminosas distribuídas numa única família com as três subfamílias (SOUZA & LORENZI, 2008).

Fabaceae é terceira maior família dentro do grupo das angiospermas, possui aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, representadas por plantas herbáceas

anuais, arbustivas ou arbóreas, de folhas compostas e com estípulas (LIMA & FORTUNATO 1998; LEWIS et al. 2005). É conhecida como família das leguminosas, pois os membros possuem um fruto em forma de vagem. Era denominada família Leguminosae e, devido a sua popularidade, essa designação ainda é aceita (LAVIN et al., 2001). No Brasil, segundo Lima (2000), foram encontrados cerca de 188 gêneros e 2.100 espécies, com ocorrência em distintos tipos de vegetação, sendo muitas destas espécies exclusivas de ecossistemas brasileiros (BARROSO et al., 1991).

É uma família que apresenta grande potencial econômico. Várias espécies são utilizadas como alimento, forragens, corantes, madeiras, gomas, resinas, óleos, medicinais e ainda como ornamentais (FRANCINO, 2006). Apresentam também grande importância ecológica, pois as leguminosas realizam associação mutualística com bactérias fixadoras do nitrogênio, gênero *Rhizobium*, fertilizando o solo com compostos nitrogenados (LEWIS, 1987).

Além disso, em estudo realizado por OLIVEIRA et. al (2005) com seis espécies arbóreas da família Fabaceae, sendo elas: *Anadenanthera colubrina*, *Acacia bahiensis*, *Albizia blanchetii*, *Chloroleucon tortum*, *Machaerium scleroxylon* e *Copaifera langsdorffii*, sobre a germinação e crescimento inicial de sementes de alface, foi observado inibição de 99 a 100% da germinação, promovidas pelo extratos aquosos de flores e folhas de *C. tortum* e de folhas de *A. blanchetii*, respectivamente. Houve também prejuízo no crescimento das plântulas de alface, pois os extratos foliares aquoso de *M. scleroxylon* e etanólicos de *C. langsdorffii* e *A. bahiensis* provocaram inibição de 100, 85 e 82%, respectivamente.

4.7.1 *Copaifera* spp.

O gênero *Copaifera* spp. pertence à família Fabaceae, são plantas originárias da região tropical da América Latina e África ocidental, sendo conhecidas popularmente como copaíbas, copaibeiras, pau-de-óleo, copaúva e copai (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; CASCON, 2004). O gênero possui 72 espécies, com 16 delas encontradas apenas no Brasil, distribuídas na região Amazônica, Sudeste e Centro-Oeste (DWYER, 1951; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005). Vivem, aproximadamente, 400 anos e alcançam de 25 a 40 metros de altura (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005) (Figura 7).

Dentre as espécies encontradas no Brasil, pode-se citar: *Copaifera officinalis* L. (Norte do Amazonas), *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônia), *Copaifera confertiflora* (Piauí), *Copaifera langsdorffii* (Brasil), *Copaifera cariacea* (Bahia) e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (WOOD ET AL., 1940; MORS & RIZZINI, 1966).

As copaiibeiras são muito procuradas para retirada de madeira, comercializada com regularidade na indústria de marcenaria, carpintaria, construção civil e naval (CARVALHO, 1994; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; CASCON, 2004). E, principalmente para extração do óleo-resina, utilizado tradicionalmente na medicina popular e procurado pelas indústrias farmacêuticas, devido a sua ação terapêutica (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002)

O óleo-resina de copaíba é uma substância natural retirada do caule da copaiibeira, formado por uma parte resinosa não volátil, que representa de 55 a 60% do óleo, diluída na outra parte, composta pelo óleo essencial (CASCON & GILBERT, 2000; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004). De acordo com CASCON (2004), é importante salientar que o óleo apresenta grande diversidade de metabólitos secundários. A parte resinosa é composta, majoritariamente, por diterpenos e a do óleo essencial (volátil) por sesquiterpenos, não havendo alterações nas quantidades e tipos destes compostos no óleo puro (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; VEIGA JUNIOR ET AL., 2005). O óleo essencial retirado das folhas, apresenta constituição química similar à da parte volátil do óleo-resina, contendo sesquiterpenos (SILVA et al, 2006).

Algumas das propriedades biológicas do óleo já foram relatadas, sendo conhecido por atuar como antiinflamatório (CASCON, 2004; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005), cicatrizante (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002), anti-séptico (RIGAMONTE AZEVEDO et. al., 2004), antitumoral (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002), expectorante (FREIRE ET AL., 2006) e analgésico (PACHECO et al., 2006).

Além de todos estes efeitos biológicos, algumas espécies do gênero já foram relatadas por apresentarem influência alelopática. Em trabalho realizado por SOUZA FILHO et al., (2010) , as espécies *Copaifera duckei*, *C. martii* e *C. reticulata*, foram testados sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da raiz das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), ficou demonstrado que o extrato etanólico de folhas e o de galhos de *C. martii* e *C. reticulata* apresentaram

grande potencial para inibir a germinação de sementes, principalmente da espécie malícia. A espécie *C. duckei* mostrou pequeno potencial alelopático inibitório na germinação das duas espécies receptoras. Cascas, folhas e galhos de *C. duckei* apresentaram potencial inibitório mais significativo sobre o desenvolvimento da raiz, especialmente as folhas.



Figura 7: Copaibeira

Fonte: <https://www.beneficiosdasplantas.com.br/copaiba-beneficios>

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLATIF, F.; HASSANI, A. Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. *Journal of Materials and Environmental Science*, v.1, n.6, p. 207-213, 2015

ALMEIDA, F. S. de. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 2, p. 221-223, fev. 1991

ALMEIDA, G.D.A.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M.C.; COELHO, I.; SOBREIR, F.M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. *Revista Facultad Nacional de Agronomia*, v.61, n.1, p.4237- 4247, 2008

ALMEIDA, F. S. A alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p. (Circular, 53).

ABRAHIM, D.; BRAQUINI, W. L.; KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology*, v.26, p. 611-624, 2000.

AHMAD, N.; RAMSCH, R.; LLINÀS, M.; SOLANS, C.; HASHIM, R.; TAJUDDIN, H. A. Influence of nonionic branched-chain alkyl glycosides on a model nano-emulsion for drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Biomedical Journals*, v. 115, p. 267-274, 2014.

ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M.. Estresse Oxidativo em Células Vegetais Mediante Aleloquímicos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, v. 61, p.4237-4247, 2008.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. *Journal of Controlled Release*, v. 27, n. 4, p. 689-757, 2002.

APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F. & LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology*, v. 90, p. 109-116. 1989.

ARAÚJO JÚNIOR, F.A. et al. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20, n.1, p.93-9, 2005.

ATTI-SANTOS, A. C., ROSSATO M., PAULETTI, G. F. ET AL., Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, no. 6, p. 1035–1039, 2005.

BACH, F.T.; SILVA, C.A.T. Efeito alelopático de extrato aquoso de boldo e picão preto sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de alface. *Cultivando o Saber*, v.3, n.2, p.190-198. 2010.

BAKIREL, T., BAKIREL, U., KELES, O. U., ÜLGEN, S. G., & YARDIBI, H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, 64–73. 2008.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; GANEM, F. R. Síntese de novas fitotoxinas derivadas do 8-oxabicyclo [3.2.1]oct-6-en-3-ona. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 444-450, 2005.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, p.379–390, 2014.

BARBOSA, J. A.; FERREIRA, S. D.; SALVALAGGIO, A. C.; COSTA, N. V.; ECHER, M. M. Alelopatia do extrato aquoso de *Pachyrhizus erosus* L. sobre *Euphorbia heterophylla* e *Bidens pilosa*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.48, no.1, 2018.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, v.2, 377p., 1991.

BASTOS, C.N.; ALBUGUERQUE, P.S.B. Efeitos do óleo de *Piper aduncum* no controle e pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. *Fitopatologia brasileira*, 29(5): 555-557, 2004.

BEDIN, A. C. Nanoemulsões contendo benzoilmetronidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação in vitro. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Toledo, Paraná, 2011.

BERG, J.M.T.; LUBERT, J. *Bioquímica*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BORGES, S. R., et al., Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Revista Inflammopharmacology*, v. 26, p. 183-195, 2017.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers, p.1-30, 2010.

CASCON, V. Copaíba - *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. *Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, v.55, n.7, p.773-8, 2000.

CARVALHO, S.I.C. 1993. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris cv. 85 Bandeirante. Dissertação Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 72p.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.

CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química Nova*. v.27, n.1, p.55-57, 2004b.

CHAU, C. F; WU, S. H; YEN, G. C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in food Science & Technology*, 18 (5), p.269-280, 2007.

CHIAPUSIO, G. et al. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J. Chem. Ecol.*, v. 23, n. 11, p. 2445-2453, 1997.

CORREIA, N. M. Palhadas de sorgo associadas ao herbicida imazamox no controle de plantas daninhas e no desenvolvimento da cultura da soja em sucessão. 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002

CHIESA, M.; GARG, J.; KANG, Y. T.; CHEN, G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 326, n. 1-2, p. 67-72, 2008

CHOU, C.; Biochemical interactions among plants: allelopathy as ecosystem regulator. *Physiology and maintenance*, vol. V. *Encyclopedia of Life Support Systems*.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DE VILLIERS, M. N.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. Nanotechnology in drug delivery. Springer & AAPS Press, NY, (eds) (2009),p 663p

DEZOTTI, P.C.; HERNANDEZ-TERRONES, M.G., MELO, G.S. Potencial herbicida do extrato metanólico de sementes de mata-barata. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 23, Gramado, 2002. Resumos, p. 48.

DINAKAR, C. et al. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*, v.182, p.29-41, 2012

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, v.159, p.342-350. 2012.

DORMAN, H.J.D., PELTOKETO, A., HILTUNEN, R., TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* v. 83, p. 255-262, 2003.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. *Enfi eld: Science Publishers*, v..9, p.178-203, 2011.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHIRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemical from nature for weed management. *Weed Science*, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002.

DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, 19, p. 583-589, 2000.

Dwyer, J. D.; *Brittonia* 1951, 7, 143

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

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FORGIARINI A., ESQUENA J., GONZÁLEZ C., SOLANS C. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. *Progress in Colloid and Polymer Science*. v. 115, p. 36-39, 2000.

- FORTES, A.M.T.; MAULI, M.M; ROSA, D.M. PICCOLO, G. MARQUES, D.S.; REFOSCO, R.M.C. Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de picão-preto e soja. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 31, n. 2, p. 241-246, 2009
- FOYER, C.H., LELANDAIA, M. & KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 92, p. 696-717, 1994.
- FRANCINO, D. M. T. Anatomia foliar de espécies de *Chamaecrista* Moench. (Leguminosae/Caesalpinioideae) ocorrentes em campo rupestre. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.
- FREIRE, D.B. et al. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeos, pragas de colméias, (Díptera: Phoridae) na Amazônia central. *Acta Amazônica*, v.36, n.3, p.365-8, 2006.
- GAUCH L. M. R., SILVEIRA-GOMES F., ESTEVES R. A., PEDROSA S. S., GELMINI, G. A.; FILHO, V.; NOVO, R. S.; SALVO, M. C. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. *Bragantia*, v. 60, n.2, p.93-99, 2001.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. *Química Nova*, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.
- GOLDFARB M.; PIMENTEL L. W.; PIMENTEL N. W. Allelopathy: relations in the agrosystems. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, v.3, n.1, p.23-28, 2009.
- GNIAZDOWSKA, A; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 27, n. 3, p. 395–407, 2005.
- GURGEL E. S. C., ARRUDA A. C., MARQUES-DA-SILVA S. H. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Rev Soc Brasil Med Trop*, v. 47(3), p. 389–391. 2014.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, University Press. 1989.

HALOUI, M., LOUEDEC, L., MICHEL, J.B., LYOUSSI, B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J. Ethnopharmacol.*, v.71, p. 465–472, 2000.

HARBORNE J.B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5 ed.: Editora da UFSC, p. 765-791. 2003

INDERJIT, WARDLE, D. A.; KARBAN, R.; CALLAWAY, R. M. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology and Evolution*, v.26, n.12, p.655-662, 2011.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MIRANDA, M.A.F.M.; GUALTIERI, S.C.J. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. *Acta Scientiarum Agronomy. Maringá*, v. 37, n. 2, p. 241-248, Apr.-June, 2015.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, v.5, n.6, p.709-725, 2011

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.60, p.110-116, 2007.

LAVIN, MATT; PENNINGTON, R. TOBY; KLITGAARD, BENTE B.; SPRENT, JANET I.; LIMA, HAROLDO CAVALCANTE; GASSON, PETER E.. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *Am. J. Bot.* v. 88, no. 3, p. 503-533, 2001.

LEE S.J., UMANO K, SHIBAMOTO T, LEE K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, v. 91(1), p. 131-7, 2005

LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F. J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; DEL RIO LA, SANDALIO, L.M.; Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 813-820, 2002.

LEWIS, G.P., SCHRIRE, B., MACKINDER, B. & LOCK, M. *Legumes of the World*. Royal Botanical Gardens, Kew. 2005.

LEWIS, G. P. *Legumes of Bahia*. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 369, 1987.

LIMA, H.C. 2000. *Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro, 141p

LIMA, H.C. & FORTUNATO, R.H. 1998. *Avances en Fabáceas: introducción*. In: *Congreso Latinoamericano de Botánica, 6, 1994. Mar del Plata. Proceedings of the VI Congreso Latinoamericano de Botánica*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, p.101-102.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, Plantarum. 2002. 544p

MAEDA H.; DELLAPENNA, D. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, v.10, p.260-265, 2007

MACHADO D.G.; CUNHA M.P.; NEIS V.B.; BALEN G.O.; COLLA A.; BETTIO L.E.B.; OLIVEIRA A.; PAZINI F.L.; DALMARCO J.B.; SIMIONATTO E.L., PIZZOLATTI M.G., RODRIGUES A.L.S. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem*, v. 136, p.999–1005, 2013.

MACÍAS, F. A.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; OLIVA, R. M.; MOLINILLO, J. M.G. Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. *Phytochemistry*, 48. 1998.

MACÍAS FA, CASTELLANO D, MOLINILLO JMG. Search for standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 2512-2521, 2000.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). Revista da FZVA, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 1-12. 2007.

MALLICK N, MOHN FH. Reactive oxygen species: response of alga cells. Journal of Plant Physiology, v. 57, p. 183-193, 2000.

MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter, v. 8, p. 1719–1729, 2012.

MELO G.A.N., GRESPAN R, FONSECA J.P., FARINHA T.O., SILVA E.L., ROMERO A.L., BERSANI A, CUMAN R.K. Rosmarinus officinalis L. essential oil inhibits in vivo and in vitro leukocyte migration. J Med Food, v. 14(9,) p.944–949, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant in Science, v.9, p.405-410, 2002

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; CARVALHO, M. L. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; NELSON, D. L. N.; OLIVEIRA, C. M.; GOMES, M. S.; ANDRADE, J.; SOUZA, J. A.; ALBUQUERQUE, L. R. M. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. American Journal of Plant Sciences, Irvine, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; CARVALHO, M. L. M.; MACHADO, S. M. F.; ANDRADE, M. A.; OLIVEIRA, C. M. Análise comparativa do potencial alelopático do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e seu constituinte majoritário na germinação e vigor de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Revista E-xacta. Belo Horizonte, v. 8, n.2, p. 45-53. 2015.

MONTAVON P, KUKIC KR, BORTILIK K. A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee. Analytical Biochemistry, v. 360, p. 207-215, 2006

MOURA, G. S.; JARDINETI, V. A.; NOCCHI, P. T. R.; SCHWUAM-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Potencial alelopático do óleo essencial de plantas medicinais

sobre a germinação e desenvolvimento inicial de Picão-preto e Pimentão. *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v.17, n.2, p. 51-62, 2013.

MORI, I.C. AND J.I. SCHROEDER. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* v. 135(2), p. 702–708, 2004.

MORS, W.; RIZZINI, C.T. *Useful plants of Brazil*. San Francisco: Holden-Day Inc., 1966. 45p.

NAPOLI E.M., SIRACUSA L, SAIJA A, SPECIALE A, TROMBETTA D., TUTTOLOMONDO T., LA BELLA S., LICATA M., VIRGA G., LEONE R., LETO C., RUBINO L., RUBERTO G. Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils. *Chem Biodivers*, v. 12, p. 1075–1094, 2015.

NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* v. 1054 (1/2), p. 95-111, 2004.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. "Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea". *Química Nova*, vl. 34, nº408. 2011.

NEIS, J.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Alelopatia de folhas de *Coleus barbatus* sobre o desenvolvimento de sementes de trigo. *Revista Cultivando o Saber*, Cascavel, Paraná, v.6, n.2, p.122-134, 2013

OJEDA-SANA A.M., VAN BAREN C.M., ELECHOSA M.A., JUAREZ M.A., MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of Rosemary essential oil and their main components. *Food Control*, v. 31, p.189–195, 2013.

OLIVEIRA, A. K. de. *Potencial alelopático de espécies arbóreas da Caatinga*. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, A. R. M.F.; JEZLERC. N.; OLIVEIRA R. A.; MIELKE M. S.; COSTA L. C. B. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. *Horticultura brasileira*, v.30, n.1, p.155-159, 2012.

OLIVEIRA, A.K.; Atividade de extratos de espécies arbóreas da caatinga sobre a emergência e desenvolvimento de plântulas de feijão-caupi, melão e milho. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia), (AC: Fitotecnia) Universidade Federal do Semi - Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte ,2014.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju-PA. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, v.8, n.3, 2006.

OLIVEIRA, M. N. S.; SIMÕES, M. O. M.; RIBEIRO, L.M.; LOPES, P. S.; GUSMÃO, E.; DIAS, B. A. S. Efeitos alelopáticos de seis espécies arbóreas da família Fabaceae. *Unimontes Científica*, v.7, n.2. 2005.

OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya/puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids*, v. 41, p. 188-194. 2014.

PACHECO, T.A.R.C. et al. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera* spp) balsams. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.8, p.123-4, 2006.

PARREIRAS, N.S.; GOMES, J.A.O.; BONFIM, F.G.; CASALI; V.W. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de Hortelã na germinação de sementes de alface. *Cadernos de Agroecologia*, Fortaleza, v.6, n.2, 3p., 2011.

PATEL A.R.; VELIKOV K.P. Colloidal delivery systems in foods: a general comparison with oral drug delivery *LWT. Food Sci Technol*, v. 44, p.1958–1964, 2011.

PEDROL, N., GONZÁLEZ, L. & REIGOSA, M. J. Allelopathy and abiotic stress. In: REIGOSA, M. J., PEDROL, N. & GONZÁLEZ, L. (Eds). *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*. Dordrecht: Springer. 637 p, 2006.

PELEGRINI, L.L.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.14, n.2, p.376-382, 2012.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. 2011 Pág. 96, Capítulo 5 Alelopatia.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10. 2004

PERES, M. T. L. P.; SILVA, L. B.; FACHENDA, O.; HESS, S. C. Potencial alelopático de espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). Acta Botanica Brasílica, v. 18, n. 4, p. 723-730, 2004.

PITELLI, R.A. Competição e Controle das Plantas Daninhas em Áreas Agrícolas. Série Técnica IPEF, Piracicaba, v.4, n.12, p.1 – 24, 1987.

PORTE, A. Estudos de óleos essenciais de três plantas condimentares da família Lamiacea. 2000. 216p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PUTNAM, A. R. Weed allelopathy. In: DUKE, S. O. Weed Physiology, 1a.ed. Florida: CRC Press, p. 131-155. 1985.

RICE EL. Allelopathy. 2. ed. New York: Academic Press. 422p. 1984.

RICEALLEM, L. N. Atividade alelopática de extratos triturados de folhas de Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae) sobre crescimento inicial de espécie alvo e identificação de frações ativas através do fracionamento em coluna cromatográfica. Dissertação (Mestrado em Botânica). Brasília/DF: Universidade de Brasília, 2010.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. et al. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 28p. 2004.

ROBERTS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Farmacognosia Biotecnologia. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

ROSADO, L. D. S. et al. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjerição "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, n. 4, p. 422-428, 2009

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado Técnico-Embrapa, Belém, v. 99, n. 1, p. 1-6, 2004

SARTOR, L. R.; ADAMI, P. F.; CHINI, N.; MARTIN, T. N.; MARCHESE, J. A.; SOARES, A. B. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1653 – 1659, 2009.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, v.13, p.275-293. 2011

SHAHIDI F, NACZK M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995

SCHIEDECK, G. Aproveitamento de plantas bioativas: estratégia e alternativa para a agricultura familiar. 2008.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 2, p. 38-43. Brasil. 2000.

SILVA, C.B; OLIVEIRA, M.; DIAS, J.F; ZANIN, S.M.W.; SANTOS, G.O.; CNDIDO, A.C.S.; PERES, M.T.L.P.; SIMIONATTO, E.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Atividade alelopática dos lixiviados de *Asemeia extraaxillaris* (Polygalaceae) sobre o crescimento de *Ipomoea cordifolia*. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.215-222, 2016.

SILVA, C.B. et al. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae). Química Nova, São Paulo, v. 32, 2373-2376, 2009.

SILVA, F.H. et al. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf (Caesalpinaceae) do cerrado e mata atlântica. In: Reunião Nacional da Sociedade Brasileira de Química, 29., 2006.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Editora da UFSC, 2003.

SIQUEIRA, J. O. et al. Significance of phenolic compounds in plant soil microbial systems. *Crit rev Pl Sci*, v. 10, p. 63-121, 1991.

SOUZA, S.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para a avaliação do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais. **Rev Biol Ciênc Terra**, v. 5(1), p. 1-8. 2005.

SOLÉ I.; SOLANS C.; MAESTRO A.; GONZALES C.; GUTIERREZ, J. M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci*, v. 376, p. 133–139. 2012.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 136- 141, 2012.

SOM, C.; BERGES, M.; CHAUDHRY, Q.; DUSINSKA, M.; FERNANDES, T.; OLSEN, S. I.; NOWACK, B. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology*, v. 269, p. 160– 169. 2010.

SONOWA, M.M.; KÖNIG, W.A. Constituents of the essential oil of *Cyperus alopecuroides*. *Phytochemistry*, v.56(4), p. 321-325. 2001.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. *Botânica Sistemática. Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. 2 ed. Editora Plantarum, Nova Odessa. 2008.

SOUZA, S.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para a avaliação do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais. *Rev Biol Ciênc Terra*, v. 5(1), p. 1-8. 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de cipó-d'alho (Bignoniaceae). *Planta Daninha*, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. *Planta Daninha, Viçosa*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GURGEL, E.S.C.; QUEIROZ, M.S.M.; SANTOS, J.U.M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Planta Daninha*. vol.28 no.4, 2010.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K. Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v.30, n.63. 2010.

TADROS T.; IZQUIERDO P.; ESQUENA J.; SOLANS C. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 303, p. 108 –109, 2004.

TAIZ L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TRIANANTAPHYLIDES C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, v.14, n.4, p.219-229, 2009.

VASCONCELOS, C. C. M.; SILVA A. F. A; LIMA S. R. Interferências de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. *Agropecuária Científica do Semiárido, Paraíba*, v. 8, n.1, p. 1-6, 2012.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. *Química nova*, v.25, n.2, p.273-86, 2002

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura? *Química nova*, v.28, n.3, p.519-28, 2005.

VENDRAMIN, J. D. Plantas inseticidas e controle de pragas. *Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, n.2, p.1-5, 2000.

XIA REN, ZHIQIANG YAN, XIAOFENG HE, XIUZHUANG LI, BO QIN. Allelopathic effect of β -cembrenediol and its mode of action: Induced oxidative stress in lettuce seedlings. *Emir. J. Food Agric*, Vol 29, Issue 6, 2017.

YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, Hoboken, v. 37, p. 1–12, 2015.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica moderna da química medicinal. Chapecó: Argos, 2001.

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.

WATSON, L. & DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992.

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p.472 - 479, 2004.

WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agron. J.*, p.860-866, 1996.

WOOD, G. et al. The dispensatory of the United States of America. 22.ed. Londres: J.B. Lippincott Company, 369p. 1940

ZHI-QIANG YA,; DAN-DAN WANG; LAN DING; HAI-YAN; HUI JIN; XIAO-YAN YANG; JIAN-SHE YANG; BO QIN. Mechanism of artemisinin phytotoxicity action: Induction of reactive oxygen species and cell death in lettuce seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.88, p. 53 e 59, 2015.

ZIMDAHL, R.L. Fundamentals of Weed Science. Academic Press Inc., San Diego, USA, 1993.

ARTIGO**Efeito alelopático de nanoemulsões do óleo essencial de
alecrim e óleo-resina de copaíba**

Apresentado nas normas da revista



Vitória, 2019

RESUMO

Nanoemulsões são sistemas de emulsões formados por dois líquidos imiscíveis e emulsificantes. Elas formam dispersões estáveis, o que facilita a dispersão e, por conseguinte, absorção e atividade biológica do composto. Aliar a nanotecnologia aos conceitos da alelopatia, com a finalidade de testar a eficiência dos metabólitos secundários, pode contribuir de forma promissora para um manejo sustentável na agricultura. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial alelopático do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) e óleo-resina de *Copaifera* spp. (Copaíba), sob a forma de nanoemulsões. Essas foram produzidas na concentração de 5% dos óleos de Alecrim e Copaíba e, posteriormente, diluídas com água destilada à 5, 7 e 10 mg/mL. Foram avaliadas a germinação, crescimento inicial, e a atividade enzimática das sementes da espécie *Lactuca sativa* (Alface). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e para cada tratamento foram feitas 5 repetições. Os dados de germinação e de crescimento foram comparados pelo teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões do óleo essencial de alecrim apresentaram influência alelopática negativa na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), comprimento da folha, comprimento da raiz e redução na atividade da enzima peroxidase. O aumento da concentração proporcionou resultados mais pronunciados nas variáveis analisadas. Isso deve-se a atuação específica de seus principais constituintes químicos ou, possivelmente, pela interação entre eles. O monoterpeneo 1,8 cineol é relatado como um potente inibidor e aparece como constituinte majoritário do óleo essencial de alecrim. As nanoemulsões do óleo resina de copaíba demonstraram influência positiva em alguns atributos avaliados. Não houve atividade na %G, comprimento da parte aérea e atividade enzimática. As menores concentrações das nanoemulsões do óleo de copaíba utilizadas neste estudo (5 e 7 mg/mL), apresentaram ação alelopática estimulante no crescimento da raiz. A não interferência alelopática na %G pode ser atribuída à estrutura química do sesquiterpeneo cariofileno, composto encontrado em maior quantidade no óleo de copaíba. Tais resultados indicam que a atividade alelopática está relacionada à constituição e estrutura dos componentes químicos, bem como de sua concentração.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* • *Copaifera* spp • Estresse oxidativo • Enzimas.

ABSTRACT

Allelopathy is defined as the ability of plants to produce chemical compounds that, when released into the environment, can influence, positively or negatively, other plants. Essential oils are secondary metabolites obtained from different parts of the plant, containing volatile compounds that may be associated with biological effects. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) and oil-resin of *Copaifera* spp. (Copaiba), in the form of nanoemulsions, since the efficiency of the compounds can be improved. The nanoemulsions were produced with a concentration of 5% of the oils of Rosemary and Copaiba and, later, diluted with distilled water to 5, 7 and 10 mg / mL. Germination, initial growth, and enzymatic activity of the seeds of the species *Lactuca sativa* (Lettuce) were evaluated. The experimental design was completely randomized and for each treatment, 5 replications were made. The germination and growth data were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test at 5% probability. The results showed that the rosemary essential oil nanoemulsions had a negative allelopathic influence on the germination percentage (% G), germination speed index (GSI), mean germination time (MGT), leaf length, root length and decrease in the activity of the enzyme peroxidase. The increase in concentration led to more pronounced results in the analyzed variables. Such effects are due to the specific action of their main chemical constituents or, possibly, by the interaction between them. The monoterpene 1,8-cineole is reported as a potent inhibitor and appears as the major constituent of the rosemary essential oil. The nanoemulsions of Copaiba oil-resin showed a positive influence on some evaluated attributes. There was no influence on %G, shoot length and enzyme activity. The lowest concentrations of the copaiba oil nanoemulsions used in this study (5 and 7 mg / mL) showed stimulatory allelopathic effect on root growth. The non-allelopathic influence on the %G can be attributed to the chemical structure of the sesquiterpene caryophyllene, a compound found in greater quantity in the copaiba oil. These results indicate that the allelopathic influence is related to the constitution and structure of the chemical components, as well as their concentration.

Key words: *Rosmarinus officinalis* • *Copaifera* spp • Oxidative stress • Enzymes.

Efeito alelopático de nanoemulsões do óleo essencial de alecrim e óleo-resina de copaíba

Luciana Barbosa Soares Chamoun^I Hildegarde Seibert França^{III} Caio Pinho

Fernandes^{IV}, Rodrigo Cruz^V Viviana Borges Corte^{II}

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência emergente com grandes variedades de aplicações, em diversos setores industriais e de consumo, pode oferecer um desempenho melhorado, reduzir o uso de substâncias químicas perigosas, o consumo de energia e materiais e a geração de resíduos (SOM et al, 2010). Sua aplicação na agricultura é recente se comparada à área farmacêutica e de cosméticos. No entanto, está sendo considerada como uma revolução no setor, com investimentos de bilhões de dólares (CHAU et al., 2007).

A aplicação da nanotecnologia para produção de nanoemulsões através da utilização de bioativos naturais, como por exemplo, os óleos essenciais, pode ser promissora para a agricultura.

I Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (UFES) - Goiabeiras, Vitória-ES, Brasil. E-mail: luchamoun@gmail.com - Autor para correspondência

II Prof. Dra. do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (UFES)

III Prof. Dr. do Departamento de química - Instituto Federal do Espírito Santo - IFES

IV Prof. Dr. do Departamento de Farmácia - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ (UNIFAP)

V Rodrigo Cruz - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ (UNIFAP)

Aliar essa tecnologia com os conhecimentos provenientes dos conceitos alelopáticos, que trata a interação positiva ou negativa entre plantas vizinhas (INDERJIT et al., 2011), poderia contribuir para a descoberta de componentes químicos que atuariam como herbicidas naturais. Inclusive, o óleo essencial de plantas aplicado em sementes de diversas espécies agrícolas vem sendo pesquisado pelo seu possível uso como inseticida, bactericida, fungicida e bioerbicida (MIRANDA et al., 2015).

A ação alelopática dos óleos essenciais pode afetar a fisiologia da planta e a composição e quantidade de enzimas específicas, influenciando nos estágios de desenvolvimento e crescimento (DUKE et al., 2000). No entanto, eles possuem natureza lipofílica e hidrofóbica, o que dificulta sua dispersão em produtos à base de água (DONSI et al., 2012). Uma alternativa viável de uso é sob a forma de nanoemulsão, a pequena dimensão da gotícula é vantajosa, porque pode melhorar a atividade biológica do composto, por aumentar a superfície de contato facilitando a absorção (SOLÉ et al., 2012; AHMAD. et al., 2014; YUKUYAMA et al., 2015).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) e plantas do gênero *Copaífera* spp (Fabaceae), são conhecidas popularmente como plantas medicinais e produtoras de óleos-essenciais e óleo-resina, que apresentam atividades biológicas, pois possuem em sua composição componentes químicos com princípios terapêuticos, aromatizantes, bactericidas, fungicidas, anti-inflamatórios e analgésicos (MELO et al., 2011; SANTOS, et al., 2013, BORGES, et al. 2017). Plantas com essas características, vêm despertando interesse por suas potencialidades alelopáticas, pois segundo SOUZA (2005), os constituintes químicos presentes no óleo, responsáveis pelas propriedades medicinais, têm também capacidade de influenciar o crescimento de outros vegetais.

Diante disso, o interesse desse estudo foi avaliar o potencial alelopático do óleo de alecrim e copaíba na forma de nanoemulsões, na germinação das sementes e crescimento inicial de *Lactuca sativa* (alface).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes e Ecofisiologia Florestal (LASEF) no Setor de Botânica, localizado no Campus Universitário de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, no Laboratório de Química, do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Campus Vila Velha, ES, e no Laboratório de Farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

2.1 Preparo das Nanoemulsões

A nanoemulsão do óleo essencial de alecrim foi obtida através de um método de baixo aporte de energia (OSTERTAG et al., 2012; DUARTE et al., 2015), composta por 5% (p/p) de polissorbato 20, 5% (p/p) de óleo essencial extraído das folhas por hidrodestilação e 90% (p/p) de água, para uma massa final de 50 g. O óleo essencial e o polissorbato 20 foram misturados sob agitação magnética por 30 minutos e em seguida a água foi adicionada e a mistura permaneceu sob agitação por mais 60 min. O tamanho da gotícula e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons. A nanoemulsão foi diluída com água ultrapura (1:25) e as medidas foram realizadas em triplicata. Para a nanoemulsão do óleo-resina de copaíba a formulação foi composta por 5% (p/p) de óleo-resina de copaíba, 5% (p/p) de tensoativo (tween 80) e 90% de água, para uma massa final de 10 g. Foi utilizado um método de baixo aporte de energia onde 0,05 g do óleo de copaíba e 0,05 g de tensoativo (Tween 80) foram pesados em um frasco com tampa e homogeneizados e em

seguida 9,9 g de água foi adicionada a mistura gota a gota. A mistura foi feita em um agitador do tipo vortex (OSTERTAG et al., 2012; DUARTE et al, 2015).

2.2 Identificação química dos óleos

Os óleos essenciais do alecrim e da copaíba foram submetidos à análises químicas utilizando cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-plus 2010 com detector de espectrometria de massa com impacto de elétrons de 70eV, coluna DB-5MS de 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm e o hélio como gás carreador no modo split na razão de 1:20 nos seguintes parâmetros: o óleo essencial de alecrim o injetor estava numa temperatura de 250°C, assim como o detector nessa mesma condição. As condições de aquecimento do forno do cromatógrafo foi inicialmente a 50°C por 1 minuto com rampa de aquecimento variando a 5°C por min até temperatura final de 250°C. Já o óleo-resina de copaíba o injetor e o detector foram mantidos a 270 e 290°C, respectivamente com temperatura inicial de aquecimento do forno de 120°C por 2 minutos seguido pelo aumento de 3°C por minuto até 160°C por mais 2 minutos. Após esse tempo houve aumento de 8°C por minuto do forno até temperatura final de análise de 290°C na qual foi mantida por 5 minutos. A identificação dos componentes químicos dos óleos deu-se através da comparação com o banco de dados NIST 5.0 (SILVÉRIO et al., 2008).

2.3 Bioensaio de germinação

Foram utilizados para o bioensaio de germinação sementes de alface (*Lactuca sativa*), variedade americana grandes lagos 659 - *Lechuga mesa* 659, adquiridas comercialmente. A espécie é amplamente utilizada em bioensaios de alelopatia por ser muito sensível aos aleloquímios (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

O experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de BRASIL (2009) e GOMES (2016). A verificação do potencial biológico das nanoemulsões de cada óleo,

nas diversas concentrações, foi realizada por avaliação da germinação e crescimento inicial das plântulas. Foram realizados experimentos pilotos que serviram de base para a escolha das concentrações utilizadas neste estudo.

Para o teste de germinação, cinco repetições de 20 sementes cada foram semeadas em placas de Petri tendo como substrato dupla camada de papel filtro e umedecidas com 2,5 mL de cada nanoemulsão nas concentrações de 5 mg/mL, 7 mg/mL e 10 mg/mL.

Foram usadas duas formas de nanoemulsões: uma com o óleo e outra sem o óleo, nas mesmas concentrações. A nanoemulsão sem óleo foi utilizada para comprovar se o efeito biológico é proveniente do óleo ou dos outros constituintes da nanoemulsão. Amostras contendo apenas água destilada atuaram como controle negativo. As placas foram mantidas em câmara de germinação (BOD) sob luz constante a 20°C por sete dias. As contagens foram realizadas a cada 24 horas.

2.4 Extração das enzimas Catalase, Peroxidase e Superóxido dismutase

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades da catalase (CAT), da peroxidase (POX) e da superóxido dismutase (SOD) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de sementes de alface, previamente submetidas à germinação em nanoemulsão de alecrim por 24 horas à 20°C de sementes em N₂ líquido, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999). Seguiu-se centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos, a 4° C, obtendo-se um extrato enzimático bruto. A reação mede produto consumido (H₂O₂).

2.5. Determinação da atividade enzimática

2.5.1. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8 e H_2O_2 12,5 mM (HAVIR & MCHALE, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Foram utilizadas quatro repetições com duplicatas.

2.5.2. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pelo método de KAR & MISHRA (1976). Aliquotas de 50 μL do extrato enzimático foram adicionados a 2,95 mL de uma mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 100mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante dois minutos de reação pela produção de purpurogalina, sendo, a atividade da POX determinada com base na inclinação da reta, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm^{-1} (CHANCE & MAEHLEY, 1955) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Foram utilizadas quatro repetições com duplicatas. O pirogalol incolor age como doador de elétrons para reduzir o H_2O_2 a H_2O e forma um composto oxidado colorido (purpurogalina). A reação mede quantidade de produto formado.

2.5.3. Determinação da atividade das superóxidos dismutases (SODs, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, contendo metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1

mM, EDTA 5 mM e riboflavina 10 mM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A absorvância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971). Foram utilizadas quatro repetições com duplicatas.

2.6. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os efeitos de tratamentos apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$), as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos componentes do óleo essencial de alecrim

Diversos autores relatam a presença de terpenóides, monoterpenóides e sesquiterpenóides nos óleos essenciais vegetais, e atribuem a estes metabólitos alta atividade biológica, entre elas a atividade alelopática (MULLER 1964; SOUZA FILHO 2009; MORAES 2009). Corroborando tal informação, os constituintes encontrados em maior quantidade no óleo essencial de alecrim foram os monoterpenos: 1,8 cineol (46,47%), Thujanol (18,21%) e α -pineno (12,42%) (Tabela 1). Dentre estes, o

monoterpeno 1,8 – cineol é relatado como um potente aleloquímico causador de toxicidade (HALLIGAN 1975; KUMAR E MOTTO 1986; MIRANDA et al. 2015).

Outros testes químicos em óleo essencial de alecrim também encontraram o 1,8 cineol em maior proporção (MAIA et al. 2014, MACHADO et al. 2012 e KABOUCHE et al., 2005) ou em proporção intermediária em relação aos demais componentes (RIBEIRO et al 2012, BOIX et al. (2010). Outros autores encontraram quantidade maior de α -pineno (39,72%), seguido pelo 1,8 cineol (20,20%) (STEFFENS 2010). Essas variações químicas indicam que os óleos essenciais, enquanto metabólitos secundários, tem sua constituição e quantidade de compostos ativos influenciados por diversos fatores ambientais, pela sazonalidade, condições de coleta, estabilização e estocagem (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Tais interferências justificam as diferenças na composição do óleo. Além disso, sabe-se que os constituintes do óleo podem interferir na germinação e desenvolvimento das plantas, e para isso é necessário concentração adequada e não apenas a presença do óleo (WEIR et al., 2004). Por tudo isso, há a necessidade da identificação química.

Tabela 1: Quantificação e identificação da composição química em óleo essencial de Alecrim.

Sinal	TR*	Substância identificada	Concentração (%)
1	5,025	Pineno <alpha>	12,42
2	5,394	Fencheno <alpha>	1,78
3	6,124	Pineno <beta>	7,63
4	6,454	Mirceno	0,52
5	7,507	Cimeno <Orto>	0,97
6	7,645	Limoneno	3,02
7	7,752	Cineol <1,8>	46,47
8	8,644	Terpineno <Gamma>	0,22
9	10,100	Linalol	1,01
10	11,870	Thujanol <Neo-isso-3>	18,21
11	12,730	Borneol	1,43
12	13,184	Terpin-4-OL	0,27

13	13,738	Terpineol <Alpha>	1,01
14	17,714	-	0,33
15	23,226	Santalene <Alpha>	4,71

*TR=Tempo de retenção

3.2 Identificação dos componentes do óleo-resina de copaíba

O óleo resina de copaíba é formado por uma parte resinosa não volátil, que está diluída na outra parte, formada por óleo essencial (VEIGA-JUNIOR et al., 2005; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004). A parte resinosa equivale, em média, 55 a 60% do óleo, sendo que fatores ambientais e sazonais podem influenciar nessa composição (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2006). Em trabalhos com diferentes espécies do gênero *Copaifera* spp., sesquiterpenos e diterpenos foram encontrados como componentes majoritários (VEIGA-JUNIOR et al., 1997, CASCON, 2000; MAIA et al. 2000;), dentre eles o cariofileno aparece em maior proporção (CASCON, 2000; VEIGA-JUNIOR et al., 2005; RODRIGUES et al., 2014; GALÚCIO et al., 2016). Confirmando esses resultados, dos 20 constituintes encontrados nesse estudo, aparecem em maior quantidade os sesquiterpenos: cariofileno (37%), gamma-lemene (10%) e α -Bergamotene (8,03%) (Tabela 2). A análise química do óleo de copaíba é indispensável, pois é através dela que se faz uma relação entre o componente químico e a atividade biológica, lembrando que pode ocorrer sinergismo entre os componentes do óleo e a ação biológica pode resultar dessa interação (GILBERT et. al., 1997, VALERIANO et al., 2012). O sesquiterpeno cariofileno é conhecido por apresentar diversas atividades biológicas, tais como: antiinflamatório, espasmolítico, anestésico local e antifúngica (SHIMIZU, 1990; ZHENG et al., 1992; MARTIN et al., 1993).

Tabela 2 - Quantificação e identificação da composição química em óleo-resina de copaíba.

Sinal	TR*	Substância identificada	Concentração (%)
1	39,599	-	0,920
2	42,019	α -Copaene	5,820
3	43,163	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, (1 α ,2 β ,4 β)-	4,320
4	44,714	Caryophyllene	37,400
5	45,805	-	1,610
6	45,970	α -Bergamotene	8,030
7	46,848	alpha.-Humulene	5,670
8	48,429	γ -Muurolene	2,150
9	48,930	Germacrene	6,590
10	48,930	-	0,970
11	49,912	-	0,830
12	50,502	β -Bisabolene	3,320
13	50,646	-	0,790
14	51,310	delta-Cadinene	3,550
15	53,059	Gamma-Elemene	10,140
16	54,548	-	4,560
17	56,500	-	0,870
18	58,307	-	0,700
19	58,705	-	1,050
20	94,260	-	0,700

* TR=Tempo de retenção

3.3 Efeito das Nanoemulsões de Alecrim

Através dos bioensaios de germinação observou-se influência da nanoemulsão do óleo essencial de alecrim em todos os atributos analisados. Houve redução significativa da porcentagem de germinação (%G) das sementes de alface a partir da concentração de 7 mg/mL, não tendo a concentração mais baixa variado significativamente quando comparada com o controle. Associado a isto, o índice alelopático (IA) aumentou à medida que houve redução na porcentagem de germinação. Este resultado indica que a nanoemulsão do óleo essencial de alecrim apresenta atividade alelopática e a mesma é potencializada pelo aumento da concentração, aumentando os danos biológicos e

fisiológicos à medida que se aumenta a concentração. De acordo com BALSALOBRE et al., 2006, valores de IA superiores a 50% podem indicar influência alelopática significativa, o que somente foi observado na dose de 10 mg/mL (Tabela 3), evidenciando o potencial alelopático da nanoemulsão de alecrim. Resultados semelhantes foram observados na germinação de sementes de milho, soja, feijão (HILLEN et al. 2012), e *Portulaca oleracea* (RAHIMI et al. 2015). Esses resultados corroboram a afirmação de alguns autores que consideram os óleos essenciais vegetais potenciais bioerbicidas (Duke et al. 2000), pois são eficazes na inibição da germinação de sementes e desenvolvimento de outras espécies vegetais (ROMAGNI et al. 2000; SOUZA FILHO et al., 2009).

Nanoemulsão Alecrim	Concentração mg/mL	IG (%)	IA (%)	IVG	TMG
C	-	83 a	-	25,5 b	3,56 b
Branco	5	86 a	-3,61	63,51 a	1,90 c
	7	84 a	-1,20	71,36 a	1,28 c
	10	84 a	-1,20	65,7 a	1,45 c
Nano	5	69 a	16,87	20,42 b	3,75 b
	7	60 b	27,71	13,45 b	4,40 b
	10	39 b	53	7,21 c	5,59 a

Tabela 3: Índices de Germinação (IG), Alelopátia (IA), de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo médio de Germinação (TMG) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações da nanoemulsão de alecrim comparados com o controle água destilada (C). Sendo, Branco: nanoemulsão sem o óleo essencial, Nano: nanoemulsão com o óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A variável índice de velocidade de germinação (IVG) reduziu na dose de 10 mg/mL da nanoemulsão com óleo e aumentou na sem óleo (Branco) em todas as concentrações (Tabela 3). Esse aumento do IVG provocado pelo Branco, possivelmente seja em decorrência do polissorbato, pois ele pode atuar diminuindo a tensão superficial da água e assim facilitar sua absorção pela semente. Isso também demonstra que o efeito

alelopático verificado pela redução do IVG na dose de 10 mg/mL da nanoemulsão de alecrim não se deve aos componentes presentes na nanoemulsão, mas sim aos aleloquímicos presentes no óleo essencial. Em contrapartida, o tempo médio de germinação (TMG) aumentou na nanoemulsão com óleo de alecrim, também a partir da concentração de 10 mg/mL e, diminuiu no Branco em todas as concentrações (Tabela 3). Houve redução significativa do crescimento da parte aérea e ainda mais pronunciada no da raiz das plântulas de alface submetidas a todas as concentrações das nanoemulsões de alecrim testadas (Figura 1 A e B).

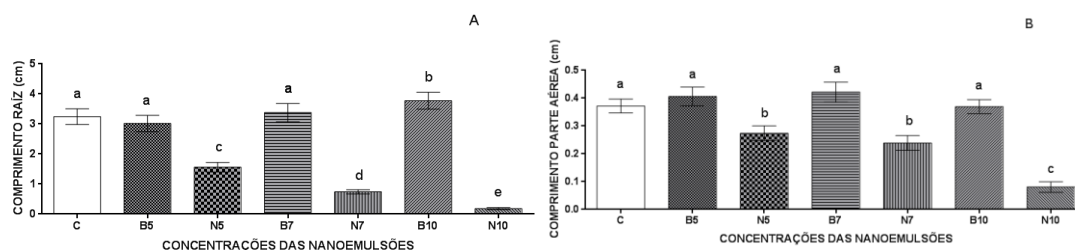


Figura 1: Comprimento raiz (A) e Comprimento parte aérea (B) de plântulas de alface, submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões de óleo essencial de alecrim. C = Controle: água destilada; B = Branco: nanoemulsão sem o óleo essencial (5, 7 e 10 mg/mL), N = nanoemulsão com o óleo essencial (5, 7 e 10 mg/mL).

Tais efeitos podem ser atribuídos a ação específica de seus principais constituintes químicos ou, possivelmente, pela interação entre eles (SOUZA FILHO et al., 2009). Os monoterpenos, principais componentes químicos presentes na nanoemulsão de alecrim (Tabela 1) apresentam grande potencial inibitório, pois são capazes de provocar alterações morfológicas e fisiológicas, interferindo na atividade enzimática, permeabilidade das membranas, divisão celular, fotossíntese, respiração, aumento da transpiração das células, prejuízos aos microtúbulos e redução da mitose; afetando o crescimento e a atividade celular (RODRIGUES et al., 1999; ROSADO et al., 2009;

MIRANDA et al., 2014). Para ROMAGNI et al. (2000), a atividade fitotóxica do 1,8 cineol poderia afetar a germinação e desenvolvimento de sementes de alface. Essas informações confirmam os dados encontrados neste trabalho, uma vez que, o 1-8 cineol aparece como componente majoritário no óleo essencial de alecrim utilizado para produção das nanoemulsões.

3.4 Efeito das Nanoemulsões de Copaíba

As nanoemulsões de copaíba apresentaram influência positiva em alguns atributos avaliados (tabela 4; Figura 2). Não houve influência na %G e comprimento da parte aérea. O crescimento da raiz foi estimulado pelas nanoemulsões com o óleo nas concentrações de 5 e 7 mg/mL e as sem o óleo (Branco) não influenciaram significativamente (Figura 2). O IVG aumentou e o tempo de germinação diminuiu em todas as concentrações das nanoemulsões com óleo e sem o óleo. O aumento do IVG pode ser em decorrência do polissorbato, pois como foi visto tal influência também foi observada na ação das nanoemulsões de alecrim sem o óleo (Branco).

Nanoemulsão Copaíba	Concentração mg/mL	IG (%)	IA (%)	IVG	TMG
C	-	83 a	-	25,5 b	3,56 a
Branco	5	87 a	-4,82	62,25 a	1,58 b
	7	87 a	-4,82	62,66 a	1,57 b
	10	88 a	-6	60,12 a	1,69 b
Nano	5	87 a	-4,82	49,45 a	1,95 b
	7	86 a	-3,61	48,25 a	1,97 b
	10	82 a	1,20	44,16 a	1,93 b

Tabela 4: Índices de Germinação (IG), Alelopatia (IA), Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo médio de Germinação (TMG) para as sementes de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões de copaíba comparadas com o controle água destilada (C). Sendo, B = Branco: nanoemulsão sem o óleo essencial, Nano = nanoemulsão com o óleo essencial. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os efeitos de constituintes químicos (aleloquímicos), influenciados pela concentração, podem ser inibitórios ou estimulantes. Em baixa concentração, há possibilidade da atuação do aleloquímico ser não inibitória para determinada espécie e estimulante em certas situações (RICE, 1984). Corroborando a informação, as menores concentrações das nanoemulsões do óleo de copaíba utilizadas neste estudo (5 e 7 mg/mL), apresentaram efeito alelopático estimulante no crescimento inicial da raiz (Figura 2). A não influência alelopática na %G pode ser explicada pela estrutura química do sesquiterpeno cariophileno, composto encontrado em maior quantidade (Tabela 2). Determinadas fitotoxinas podem apresentar diferentes efeitos, que serão influenciados pelo tipo, grupo funcional, propriedade química e concentração no meio que está agindo (BARBOSA et. al. 2005). Além disso, de acordo com Weidenhamer et al. (1993), óleos essenciais compostos por monoterpenos e monoterpenos oxigenados são mais atuantes como fitotóxicos alelopáticos. Como demonstrado, os constituintes encontrados como compostos majoritários no óleo de copaíba são sesquiterpenos. Sendo assim, pode-se considerar que a ação dos óleos essenciais na germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas não pode ser generalizado, deve-se, primariamente ser feito estudo específico de seus principais constituintes (SOUZA FILHO et al., 2009).

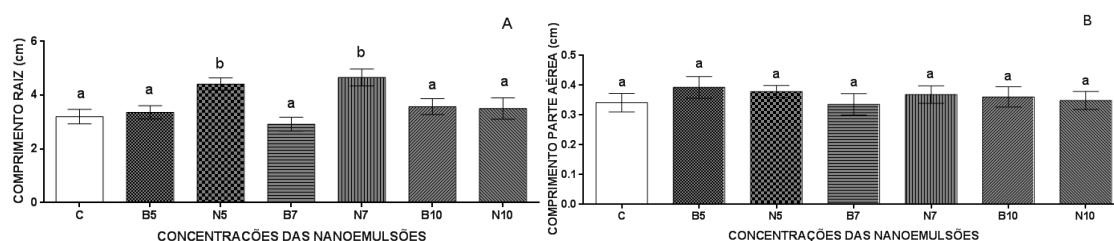


Figura 2: Comprimento raiz (A) e Comprimento parte aérea (B) de plântulas de alface, cujas sementes foram submetidas a diferentes concentrações de nanoemulsões do óleo-resina de copaíba. C = Controle: água destilada; B = Branco: nanoemulsão sem o óleo essencial (5, 7 e 10 mg/mL), N = nanoemulsão com o óleo essencial (5, 7 e 10 mg/mL).

3.5 Influências dos aleloquímicos no estresse oxidativo

Os aleloquímicos afetam a germinação das sementes, pois induzem ao estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas podem exercer ação direta ou agir como sinalizadores nas vias de degradação celular, prejudicando processos fisiológicos vitais, a germinação e o crescimento inicial (ALMEIDA et al., 2008).

As plantas respondem ao estresse oxidativo através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (MITTLER, 2002). Assim, alterações na atividade das enzimas antioxidantes poderão refletir prejuízos a tolerância contra o estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2014). Dentre as enzimas envolvidas nesses processos, pode-se destacar o papel das dismutases do íon superóxido, e das enzimas removedoras do peróxido de hidrogênio. As Superóxidos dismutases (SODs) são metalo-enzimas que atuam primariamente na defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a dismutação do íon superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (MITTLER, 2002). A catalase (CAT) e peroxidases (POX) agem removendo o peróxido de hidrogênio gerado pelas SODs e pelas reações metabólicas (AOUAD et al., 1998; BREUSEGEM et al., 2001; S.S GILL & TUTEJA, 2010). Tais enzimas podem atuar de forma sincronizada com as SODs garantindo assim tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL ET AL., 2007).

3.6 Influências das nanoemulsões de alecrim e copaíba na atividade enzimática

Não houve alteração significativa na atividade das enzimas SOD, CAT e POX das sementes da alface submetidas aos tratamentos com as nanoemulsões do óleo de copaíba e das sem o óleo (Branco), em consonância com o observado nos bioensaios de germinação, onde não houve efeito inibitório (estresse) que justificasse a modificação na atividade enzimática (Figuras 4 A, B e C).

Nos tratamentos com nanoemulsões de alecrim, não houve alteração significativa na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nas sementes da alface (Figuras 3A e C, respectivamente). Entretanto, a atividade da enzima peroxidase (POX) foi reduzida nas sementes da alface submetidas as nanoemulsões de alecrim a partir da concentração de 7 mg/mL (Figura 3B). Possivelmente, algum componente químico presente no óleo ou a interação entre eles esteja relacionada a inibição na atividade da enzima POX, o que pode estar correlacionado a redução no crescimento da radícula, como demonstrado na Figura (1A), pela redução no crescimento inicial. A POX, além de seu papel na proteção celular contra danos oxidativos, pode atuar também como sinalizadora no desenvolvimento das plantas modulando o crescimento do hipocótilo, ou seja, o aumento de sua atividade pode estar relacionado ao desenvolvimento do tecido (AOUAD et al., 1998). Neste caso, a redução na atividade da POX pode ter refletido na redução do crescimento inicial da radícula. A mesma correlação também foi observada para sementes de alface submetidas a extratos de bulbo de tiririca (Muniz et al. 2007). Fica claro a influência da atividade da peroxidase no crescimento da radícula e o prejuízo na defesa contra o estresse oxidativo, provocado pela redução de sua atividade.

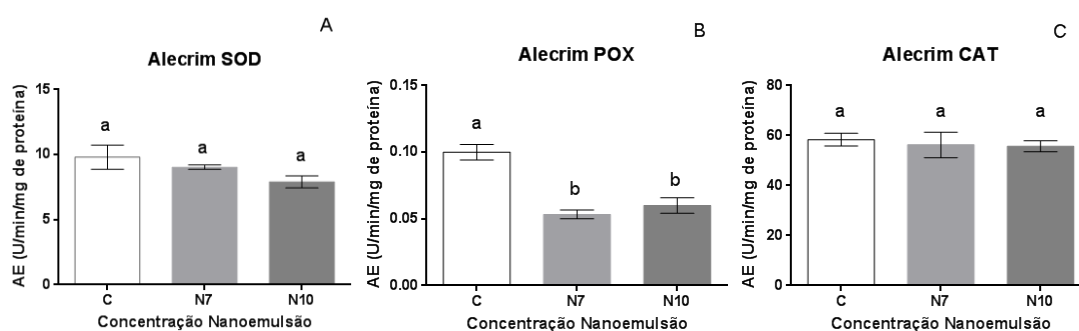


Figura 3: Efeitos das nanoemulsões do óleo essencial de alecrim na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), representados pelos gráficos A, B e C, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

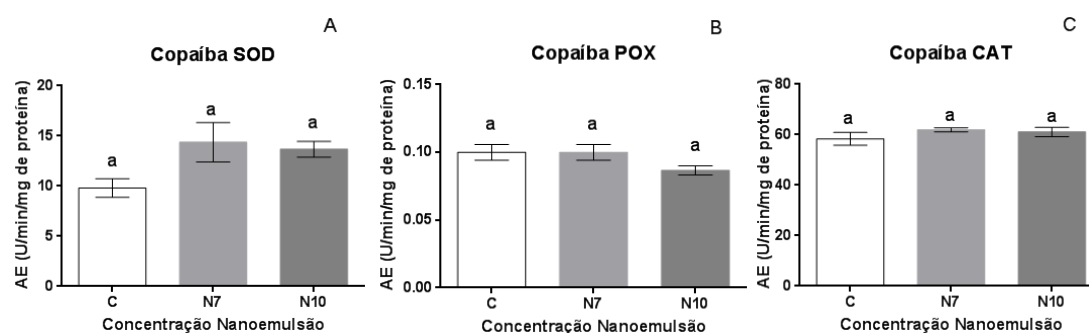


Figura 4: Efeitos das nanoemulsões do óleo-resina de copaíba na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), representados pelos gráficos A, B e C, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de alecrim apresentou efeito alelopático negativo na germinação das sementes da alface, influenciado pela concentração e constituintes químicos. Enquanto, o óleo resina de copaíba apresentou ação alelopática positiva no crescimento das raízes. Ficou evidente, que a influência alelopática está relacionada a constituição e estrutura dos componentes químicos, bem como de sua concentração.

AGRADECIMENTOS

A FAPES pela bolsa concedida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N. et al. Influence of nonionic branched-chain alkyl glycosides on a model nano-emulsion for drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Biomedical Journals*. Amsterdam, v. 115, p. 267-274, 2014
- ALMEIDA, G. D. et al. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, v. 61, nº 1, p. 4237-4247, 2008

ANDERSON M. D. et al. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**. v.109, p.1247-1257, 1995.

AOUAD, A. et al. Quantitative aspects of peroxidases in some moroccan cereal varieties. In: AUTORES? Analytical Biochemistry Actes des Premieres Journees de l'Arbre. Morocco: **Laboratoire de Biochimie Amélioration des Plantes/Université Cadi Ayyad**, 1998. 7p

BALSALOBRE, L. C. et al. Ação alelopática do arilo das sementes de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Dryand. In: 19a RAIB, v.68, suplemento 2, 2006.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BEAUCHAMP, C. AND FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels., 44, 276-287, 1971.

BORGES, S. R., et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Revista Inflammopharmacology**, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399p. 2009.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, p. 773-778. 2000.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v.2, p.764-775, 1955.

CHAU, C. F. et al. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in food Science & Technology**, 18 (5), p.269-280, 2007.

DONSI, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v.159, p.342-350. 2012.

DUARTE, J.L. et al. Evaluation of larvi-cidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev. Bras.Farmacogn.* v. 25, p.189–192, 2015.

DUKE, S.O. et al. Natural products as source from new mechanisms of herbicidal action. **Crop Products**, v.19(8), p. 583-589, 2000.

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.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

GALÍCIO et al. Recuperação De Sesquiterpenos Do Óleo-resina De Copaíba A Partir Da Destilação Molecular. **Quim. Nova**, Vol. 39, No. 7, 795-800, 2016.

GIANNOPOLITIS CN, RIES SK. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59:309-314, 1997.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. **Química Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOMES, A. B. Potencial alelopático de extratos de folhas de *Geonoma schottiana* (Arecaceae). 84 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

HALLIGAN J.P. Toxic terpenes from *Artemisia californica*. **Ecology**, v.56, p.999–1003. 1975

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Handbook of vigour test methods. 3.ed. Zürich: ISTA, 116p. 1995.

KABOUCHE, Z.; et al. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **International Journal Aromatherapy**, v. 3, n. 15, p. 129-133, 2005

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, 57, 315-319, 1976

KUMAR N., MOTTO M.G. Volatile constituents of peony flowers. **Phytochemistry**. v. 3, p. 663–671. 1986.

KRZYZANOWSKI FC et al. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**. 218p. 1999.

JALEEL, C.A. et al. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.110-116, 2007.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v.136, p. 999–1005, 2013.

MAGUIRE J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MAIA, J.G.S. et. al. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belem, p. 73, 2000.

MAIA, A. J. et al. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.49, n.5, p.330-339, 2014.

MARTIN, S. et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta Medica**. V. 59(6), p. 533-6, 1993.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, p.405-410, 2002.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Chemical composition and allelopathic activity of Parthenium hysterophorus and Ambrosia polystachya weeds essential oils. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, 2014.

MIRANDA C. A. S. F. et al. Chemical characterisation and allelopathic potential of essential oils from leaves and rhizomes of white ginger. **Revista Ciência Agrônômica**. v.46 no.3, 2015.

MORAES, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **EMBRAPA Meio Ambiente**, p. 139-152, 2009.

MULLER W.H., MULLER C.H. Volatile growth inhibitors produced by Salvia species. **Bull Torrey Bot Club**. v. 91, p. 327–330, 1964.

MUNIZ, F. R. et al. Qualidade Fisiológica De Sementes De Milho, Feijão, Soja E Alface Na Presença De Extrato De Tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, nº 2, p.195-204, 2007.

OLIVEIRA, E. C. P. et al. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (Copaifera spp.) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.3, 2006.

OSTERTAG, F. et al. Low-energy formation of ediblenanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phaseinversion. **J. Colloid Interface Sci**, v. 388, p. 95–112, 2012.

PEIXOTO PHP et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 11:137-143, 1999.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. et al. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 2004. 28p.

RAHIMI, M. et al. Effects of Allelopathic three Medicinal Plants on Germination and Seeding Growth of Portulaca oleracea. **Biological Forum – An International Journal**, v. 7, n. 1, p. 1520-1523, 2015.

RIBEIRO, D.S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.

RODRIGUES, L.R.A. et al. Alelopatia em plantas forrageiras. Guaíba: FUNEP/Jaboticabal, 1999. 18p.

RODRIGUES et al., 2014. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Rev Bras Farmacogn**, v. 24, p. 699-705, 2014.

ROMAGNI, J.G. et al. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineol. **Plant Physiology**, v. 123(2), p. 725-732, 2000.

ROSADO, L. D. S. et al. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjericão "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 422-428, 2009.

SANTOS, E. C . G. et al. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. **Journal of Medical Microbiology** , v. 62, p. 1032–1037. 2013.

SHIMIZU, M. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. **Chem Pharm Bull**, v.38, p. 2283-2287, 1990.

SILVÉRIO, F.O. et al. Effect of storage time on the composition and content of wood extractives in eucalyptus cultivated in Brazil. **Bioresource Technology, Barking**, v.99, n.11, p.4878-4886, 2008.

SOLÉ I. et al. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **J. Colloid Interface Sci**, v. 376, p. 133–139. 2012.

SOM, C. et al. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. **Toxicology**, v. 269, p. 160– 169. 2010.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de cipó-d'alho (*Bignoniaceae*). **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009.

SOUZA, S. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para a avaliação do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais. **Rev Biol Ciênc Terra**, v. 5(1), p. 1-8. 2005.

STEFFENS, A. H.; Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais Obtidos por Destilação por Arraste a Vapor em Escala Laboratorial e Industrial. **Tese de Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais**, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010. 56p.

TANJIDI, F. et al., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovate Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 29-43, 2013.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, Hoboken, v. 37, p. 1-12, 2015.

VALERIANO, et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.14 no.1, 2012.

VEIGA-JUNIOR, V.F. et al. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.20, n.6, p.612-615, 1997.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005.

WEIR, T. L. et al. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004

ZHENG, G.Q. et al. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v.55 (7): p. 999-1003, 1992.