

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS

**Busca de extratos e compostos ativos com potencial  
herbicida e inseticida nas espécies *Davilla elliptica*  
St. Hill e *Ocotea pulchella* Nees & Mart.**

**Lafayette Pereira Candido**

São Carlos-SP  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS

**Busca de extratos e compostos ativos com potencial  
herbicida e inseticida nas espécies *Davilla elliptica* St.  
Hill e *Ocotea pulchella* Nees & Mart.**

**Lafayette Pereira Candido**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Cristina Juliano Gualtieri**

São Carlos-SP  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C217be Candido, Lafayette Pereira  
Busca de extratos e compostos ativos com  
potencial herbicida e inseticida nas espécies  
Davilla elliptica St. Hill e Ocotea pulchella Nees &  
Mart. / Lafayette Pereira Candido. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
179 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2016.

1. Cerrado. 2. Aleloquímicos. 3. Ocotea  
pulchella. 4. Davilla elliptica. 5. Aedes aegypti.  
I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Lafayette Pereira Candido, realizada em 16/03/2016:

*Sonia Gualtieri*

---

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri  
UFSCar

*Moacir Rossi Forim*

---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar

*Maristela Imatomi*

---

Profa. Dra. Maristela Imatomi  
UFSCar

*Silmara Cristina Fanti*

---

Profa. Dra. Silmara Cristina Fanti  
UNICEP

*Simoni Anese*

---

Profa. Dra. Simoni Anese  
IFMT

*Dedico esse trabalho a minha mãe, Maria do Carmo Pereira por toda força, fé e apoio nos momentos mais difíceis. Obrigado por suas orações e pelo amor a mim dedicado.*

## AGRADECIMENTOS

Seja qual for o nome, agradeço a esse ser divino pelas oportunidades que surgiram no meu caminho, pela perseverança que me concede para enfrentar os obstáculos, pela fé, humildade e companheirismo.

A minha MÃE, por ser a pessoa mais especial na minha vida, que sempre me apoiou em todos os momentos e é indubitavelmente a grande responsável por essa vitória.

A todos meus irmãos: Ana Carolina, Anibale Carracce, Marinalva, Luiz e a Suzana pelo apoio, incentivo, carinho e torcida para que eu pudesse chegar ao fim de mais uma etapa na minha vida profissional.

A minha orientadora a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Cristina Juliano Gualtieri pela oportunidade, pelos conhecimentos, pela confiança e pelo carinho e amizade.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Varela, Dr<sup>a</sup> Ascención Torres, Dr. Francisco M. Macias e Dr. José M. G. Molinillo do Instituto de Biomoléculas da Universidade de Cádiz-Espanha pela oportunidade, coorientação, paciência, espaço físico e por todo o conhecimento sobre o isolamento e atividade de compostos vegetais.

Aos meus colegas do laboratório de ecofisiologia de sementes: Simoni Anese, Patricia Umeda, Viviane Pereira, Maria Augusta, Sadao Matsumoto, Leandro Takao e Luciana Jatobá pelo coleguismo, respeito, conhecimentos e pelos momentos de descontração.

As técnicas de laboratório Maristela Imatomi (UFSCar) e Renata Leandro (UEPB), pela amizade, carinho e por toda contribuição nesse trabalho de pesquisa.

A minha amiga Maria Augusta Machado pelo apoio, ajuda e companheirismo nos momentos de solidão e dificuldades durante nossa estadia na Espanha.

A minha amiga Wanessa Porto Tito pelo carinho, incentivo, ajuda e pela força nos momentos difíceis.

Ao professor Eduardo Barbosa Bezerra da Universidade Estadual da Paraíba pela coorientação, espaço físico, amizade e por toda contribuição nesse trabalho de pesquisa.

Aos meus grandes amigos: Wallyson, Genaildo, Celina e em especial a Advaldo Araujo pela força, pela fé e pelo carinho a me concedido sempre nos momentos de desânimo e solidão.

A Universidade Federal de São Carlos e a todo corpo docente do programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais pelos ensinamentos repassados e experiências compartilhadas.

A minha família de São Carlos; Andreia Nasser, Maria Clara, Renata Vilar, Aline Zafani, Cássia Villela, Lucas Marcon e a Tainá pelo companheirismo, amizade, descontração, pelo apoio e pela força em todos os momentos. E claro a uma pessoa de quatro patas; a Bela ou Belinha, um cão pessoa, por seu carinho e companhia.

A Banca examinadora: Maristela Imatomi, Simoni Anese, Silmara Fanti e o Moacir Rossi por terem aceitado o convite, e pelas contribuições na melhoria desse trabalho de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de estudo e ao CNPq pelo suporte financeiro na compra de materiais.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse sonho.

*Muito Obrigado!!!!*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS.....	9
SUMÁRIO DE TABELAS.....	14
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	16
RESUMO GERAL.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO GERAL.....	19
REFERENCIAS.....	35
CAPÍTULO 1.....	47
Fitotoxicidade de extratos de <i>Davilla elliptica</i> St. Hill (DILLENACEAE) e <i>Ocotea pulchella</i> Nees & Mart. (LAURACEAE) sobre espécies infestantes	
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Coleta e produção dos extratos.....	52
2.2 Bioensaios de fitotoxicidade.....	53
2.2.1 Bioensaios com coleóptilos de trigo.....	53
2.2.2 Bioensaios de germinação.....	54
2.2.3 Bioensaios de crescimento.....	54
2.2.4 Bioensaios de anatomia em raízes de <i>Euphorbia heterophylla</i> .....	55
2.3 Análises estatísticas.....	56
3. RESULTADOS.....	56
4. DISCUSSÃO.....	70
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERENCIAS.....	75
CAPÍTULO 2.....	82
Evaluation of the phytotoxic potential of leaf, stem and root extracts of <i>Ocotea pulchella</i> Nees et Mart	
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	83



1. INTRODUCTION .....	84
2. MATERIAL AND METHODS .....	86
2.1 General Experimental Procedures .....	86
2.2 Chemicals .....	87
2.3 Preparation of extracts and isolation of compounds .....	87
2.4 Coleoptile Bioassay .....	89
2.5 Germination and growth bioassay .....	90
2.6 Statistical analysis .....	91
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	91
4. CONCLUSIONS .....	101
5. REFERENCES .....	102
CAPÍTULO 3 .....	107
Efeito dos extratos de <i>Davilla elliptica</i> St. Hill (DILLENACEAE) na germinação e no crescimento de <i>Euphorbia heterophylla</i> L. e <i>Panicum maximum</i> Jacq CV.	
RESUMO .....	108
ABSTRACT .....	109
1. INTRODUÇÃO .....	110
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	110
2.1 Coleta e produção dos extratos .....	110
2.2 Bioensaios de fitotoxicidade .....	112
2.2.1 Bioensaio de germinação .....	112
2.2.2 Bioensaio de crescimento .....	113
2.2.3 Bioensaio de anatomia em raízes de <i>Euphorbia heterophylla</i> .....	113
2.3 Análises estatísticas .....	114
3. RESULTADOS .....	115
4. DISCUSSÕES .....	128
5. CONCLUSÕES .....	132
6. REFERENCIAS .....	132
CAPÍTULO 4 .....	139
Atividade larvicida e ovicida de extratos de <i>Ocotea pulchella</i> Nees & Mart. e <i>Davilla elliptica</i> St. Hill sobre o <i>Aedes aegypti</i> L.	
RESUMO .....	139

ABSTRACT .....	141
1. INTRODUÇÃO .....	142
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	144
2.1 Coleta da população de <i>Aedes aegypti</i> .....	144
2.2 Criação e manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório.....	145
2.3 Obtenção e preparo dos extratos .....	145
2.4 Bioensaios .....	146
2.4.1 Bioensaios com larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	146
2.4.2 Bioensaios com ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....	147
2.5 Análises estatísticas.....	147
3.RESULTADOS.....	148
4. DISCUSSÃO .....	158
5. CONCLUSÕES .....	162
6. REFERENCIAS.....	163
INFORMAÇÕES SUPLEMENTAR-ANEXOS .....	171
CONCLUSÃO GERAL .....	179

## SUMÁRIO DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
Figura 1. Imagens de <i>Ocotea pulchella</i> ; (A) arbusto, (B) inflorescências e (C) frutos. Encontrada na área de reserva de Cerrado “sensu strictu” da Universidade Federal de São Carlos.....	28
Figura 2. Imagens de <i>Davilla elliptica</i> ; (A) arbusto, (B) flores e (C) folhas. Encontrada na área de reserva de Cerrado “sensu strictu” da Universidade Federal de São Carlos. ....	27
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> . (A) ovo, (B) larva, (C) pupa e (D) adulto.....	31
CAPITULO 1 .....	47
Figura 1 Efeito dos extratos brutos obtidos a partir da folha, caule e raiz de <i>O. pulchella</i> e <i>D. elliptica</i> e do herbicida GOAL® sobre o crescimento de coleóptilos de trigo. Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância. ....	58
Figura 2. Análise conjunta do comprimento de coleóptilos estiolados de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.), sob a ação dos extratos de <i>Ocotea pulchella</i> e <i>Davilla elliptica</i> . Relação de atividade entre os diferentes extratos (A), entre os diferentes órgãos vegetais (B) e entre as espécies (C). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas comparam as espécies e minúsculas para extratos, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade.....	59
Figura 3. Germinação, tempo médio e velocidade média de sementes de amendoim-bravo ( $\Delta$ ; $-y$ ) e capim-colonião ( $\bullet$ ; $---y$ ) submetidas ao efeito dos extratos de AcOEt (A); (B) e (C), de acetona (D) e (E), de MeOH (F) e aquoso (G); (H) e (I) de folhas de <i>O. pulchella</i> , em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A) $y = -6,8x + 81,7$ , $R^2 = 0,75$ ; (B) $y = 0,287x + 2,1308$ , $R^2 = 0,95$ ; $y' = 0,343x + 1,4488$ , $R^2 = 0,90$ ; (C) $y = -0,101x + 0,6838$ , $R^2 = 0,86$ ; $y' = -0,049x + 0,4628$ , $R^2 = 0,92$ ; (D) $y = -10,6x + 54,95$ , $R^2 = 0,84$ ; (E) $y = -0,3609x^2 + 0,9863x + 2,2237$ , $R^2 = 0,74$ ; (F) $y = 0,059x^2 - 0,1986x + 0,6643$ , $R^2 = 0,95$ ; (G) $y = -7,7x + 84,575$ , $R^2 = 0,95$ ; (H) $y = -0,1495x^2 + 0,6333x + 2,1558$ , $R^2 = 0,84$ ; $y' = 0,2791x^2 - 0,2377x + 1,4617$ , $R^2 = 0,97$ ; (I) $y = 0,2791x^2 - 0,2377x + 1,4617$ , $R^2 = 0,97$ ; $y' = 0,0568x^2 - 0,1631x + 0,462$ , $R^2 = 0,86$ . ....	62

Figura 4. Efeito do herbicida Goal e dos extratos de folha de <i>Ocotea pulchella</i> sobre o crescimento de plântulas de <i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo) e <i>Panicum maximum</i> (capim-colonião). Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância. ....	64
Figura 5. Percentagem total das anomalias identificadas em plântulas de amendoim-bravo ( <i>E. heterophylla</i> ) e capim-colonião ( <i>P. maximum</i> ) crescidas em extratos foliares de <i>Ocotea pulchella</i> . Necrose (N), enrolamento do hipocótilo (EH), inversão gravitópica (IG), raízes seminais pouco desenvolvidas (RF), raízes enroladas (RE), sem raiz pivotante (SR), sem raízes seminais laterais (sRS), atrofia (A), controle (C). ....	67
Figura 6. Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas em diferentes concentrações do extrato foliar de <i>O. pulchella</i> extraídas com AcOEt, e do controle (água). (*) média difere significativamente do controle pelo teste de Dunnet, a 0.05 de probabilidade.....	68
Figura 7. Histograma e fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de <i>E. heterophylla</i> crescidas no controle (A), e na presença das concentrações de 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> (B), 1 mg.mL <sup>-1</sup> (C) e 2 mg.mL <sup>-1</sup> (D), do extrato de AcOEt das folhas de <i>O. pulchella</i> . O comprimento de cada barra é a frequência absoluta (fi), (número de vezes em que uma determinada variável assume um valor). Sobre as colunas a frequência percentual de classe. Escala=100µm. ....	69
 CAPITULO 2.....	 82
Figure 1. Effects of leaf, stem and root extracts from <i>Ocotea pulchella</i> and the herbicide Logran® on the elongation of etiolated wheat coleoptiles. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at p<0.01 (a) and 0.01<p<0.05 (b), according to Welch's test compared to control.....	92
Figure 2. Effects of the herbicide Logran and ethyl acetate leaf extract (EtOAc), of <i>Ocotea pulchella</i> on standard target species growth. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at 0.01 <p <0.05 (b) or p <0.01 (a) according to Welch's test compared to control.....	94
Figure 3. Compounds isolated from leaves of canelinha ( <i>Ocotea pulchella</i> )......	97
Figure 4. Effects of the compounds 1-5, 7, 10, 11 and herbicide Logran® isolated from <i>Ocotea pulchella</i> on the elongation of etiolated wheat coleoptiles.	

Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $0.01 < p < 0.05$  (b) or  $p < 0.01$  (a) according to Welch's test compared to control. ....99

- Figure 5. Effects of the compounds spathulenol (5), benzyl salicylate (10) and benzyl benzoate (11) from *Ocotea pulchella* on *L. esculentum* growth. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $0,01 < p < 0,05$  (b) or  $p < 0,01$  (a) according to Welch's test compared to control.....101
- Figura 1A. Esquema das extrações do material vegetal de *Ocotea pulchella* e seus respectivos redimentos referente ao trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....172
- Figura 2A. Fluxograma de obtenção dos extratos vegetais de *Ocotea pulchella* referente ao trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.. ....172
- Figura 3A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (B) 60% e 40% metanol para o isolamento dos compostos 1 e 4 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....173
- Figura 4A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (C) 80% metanol para o isolamento dos compostos 2, 3, 5, 6, 10 e 11 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....173
- Figura 5A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (A) 20% metanol para o isolamento dos compostos 7, 8, e 9 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....174
- Figura 6A. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto Benzoato de benzilo isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2. ....174
- Figura 7A. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto Salicilato de benzilo isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....175
- Figura 8A. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto Spathulenol isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....175
- Figura 9A. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....176

Figura 10A. Espectro de carbono do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de <i>Ocotea pulchella</i> . Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....	176
Figura 11A. COSY do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de <i>Ocotea pulchella</i> . Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2. ....	177
Figura 12A. HSQC do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de <i>Ocotea pulchella</i> . Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....	177
Figura 13A. HMBC do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de <i>Ocotea pulchella</i> . Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.....	178
 CAPITULO 3 .....	 107
Figura 1. Germinação, tempo médio e velocidade média de sementes de capim-colonião ( <i>Panicum maximum</i> ) submetidas ao efeito dos extratos brutos de folhas de <i>Davilla elliptica</i> extraídos com metanol (MeOH) e água (H <sub>2</sub> O), nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	118
Figura 2. Germinação, tempo médio e velocidade média de sementes de capim-colonião ( <i>Panicum maximum</i> ) submetidas ao efeito dos extratos brutos de folhas de <i>Davilla elliptica</i> extraídos com metanol (MeOH) e água (H <sub>2</sub> O), nas concentrações de 0,25;0,5;1 e 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	119
Figura 3. Efeito do herbicida GOAL e dos extratos de folha de <i>Davilla elliptica</i> sobre o crescimento de plântulas de <i>Euphorbia heterophylla</i> (amendoim-bravo) e <i>Panicum maximum</i> (capim-colonião). Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância. ....	121
Figura 4. Principais anomalias encontradas nas plântulas anormais de amendoim-bravo ( <i>E. heterophylla</i> ) e capim-colonião ( <i>P. maximum</i> ) submetidas ação dos extratos de folha de <i>Davilla elliptica</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as anomalias e minúsculas para os extratos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. Escala= 1,0 cm.....	125
Figura 5. Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo ( <i>E. heterophylla</i> ) crescidas em diferentes concentrações do extrato de MeOH de folhas de <i>Davilla elliptica</i> , e do controle (água).	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. ....	126
Figura 6. Histograma e fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de <i>E. heterophylla</i> crescidas no controle e na presença das concentrações de 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> , 1 mg.mL <sup>-1</sup> e 2 mg.mL <sup>-1</sup> , do extrato de MeOH das folhas de <i>D. elliptica</i> . O comprimento de cada barra é a frequência absoluta (fi), (número de vezes em que uma determinada variável assume um valor). Sobre as colunas a frequência percentual de classe. Escala=100µm. ....	127
CAPITULO 4 .....	139
Figura 1. Armadilha para coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i> em campo.....	144
Figura 2. Efeito dos extratos de <i>Ocotea pulchella</i> (OP) e <i>Davilla elliptica</i> (DE), na concentração de 3 mg.mL <sup>-1</sup> na mortalidade de larvas de terceiro instar de <i>Aedes aegypti</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para os órgãos vegetais e minúsculas para os extratos, não diferem entre si, pelo teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis a 0,05 de probabilidade.....	149
Figura 3. Mortalidade acumulada em larvas (L3) de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a concentração de 3mg.mL <sup>-1</sup> dos extratos de folha hexanico (A), diclorometanico (B) e acetato de etila (C); caule hexanico (D) e diroclometanico (E) e raiz acetato de etila (F) e acetônico (G) de <i>Ocotea pulchella</i> .....	152
Figura 4. Mortalidade acumulada em larvas (L <sub>3</sub> ) de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a concentração de 3 mg.mL <sup>-1</sup> dos extratos de folha hexanico (A) e caule hexanico (B) de <i>Davilla elliptica</i> .....	153
Figura 5. Resposta dos extratos de caule diclorometânico (A) e acetônico (B) e de raiz acetato de etila (C) e acetônico (D) de <i>Ocotea pulchella</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a diferentes concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> ) e tempos de exposição. ....	154

## SUMÁRIO DE TABELAS

CAPÍTULO 1.....	47
Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos de 200 g de pó de folha, caule e raiz de <i>O. pulchella</i> e <i>D. elliptica</i> por meio da utilização de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O extrato aquoso foi obtido por partição líquido-líquido utilizando 100 g de pó.....	57
Tabela 2. Germinação de amendoim-bravo ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ), submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de <i>Ocotea pulchella</i> , em diferentes concentrações.....	59
Tabela 3. Germinação de capim-colonião ( <i>Panicum maximum</i> ) submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de <i>Ocotea pulchella</i> , em diferentes concentrações.....	61
Tabela 4. Percentagem de plântulas anormais de amendoim-bravo ( <i>E. heterophylla</i> ) e capim-colonião ( <i>P. maximum</i> ) e tipos de anomalias identificados em cada concentração dos extratos foliares de <i>Ocotea pulchella</i> . Necrose (N), enrolamento do hipocótilo (EH), inversão gravitrópica (IG), raízes seminais pouco desenvolvidas (RF), raízes enroladas (RE), sem raiz principal (SR), sem raízes seminais laterais (sRS), atrofia (A).....	65
CAPÍTULO 2.....	82
Table 1. <sup>1</sup> H-NMR (600 MHz), and <sup>13</sup> C (125 MHz) Spectroscopic Data for Compound 9 in CDCl <sub>3</sub> .....	98
Table 2. IC <sub>50</sub> values calculated from compounds 1–5, 7, 10 and 11 and Logran in the wheat coleoptile bioassay, using a sigmoidal dose-response variable slope models.....	100
CAPÍTULO 3.....	107
Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos de 200 g de pó de folha, caule e raiz de <i>D. elliptica</i> por meio da utilização de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O extrato aquoso foi obtido por partição líquido-líquido utilizando 100 g de pó. ....	115
Tabela 2. Germinação de amendoim-bravo ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ), submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de <i>Davilla elliptica</i> , em diferentes concentrações. ....	116
Tabela 3. Germinação de capim-colonião ( <i>Panicum maximum</i> ), submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de <i>Davilla elliptica</i> , em diferentes concentrações. ....	117



Tabela 4. Percentagem de plântulas anormais de amendoim-bravo ( <i>E. heterophylla</i> ) e capim-colonião ( <i>P. maximum</i> ) submetidas às concentrações dos extratos de folha de <i>Davilla elliptica</i> e tipos de anomalias identificados.....	122
CAPÍTULO 4.....	139
Tabela 1. Larvas (L3) de <i>Aedes aegypti</i> submetidas á ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha, caule e raiz de <i>Ocotea pulchella</i> em diferentes concentrações.....	155
Tabela 2. Concentrações letais em mg.mL <sup>-1</sup> obtidas no teste larvicida utilizando os extratos de folha, caule e raiz de <i>Ocotea pulchella</i> sobre <i>Aedes aegypti</i> durante 24 e 48 horas de exposição aos extratos vegetais. ....	157
Tabela 3. Ovos de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas á ação dos extratos da raiz de <i>Ocotea pulchella</i> extraído com hexano e diclorometano nas concentrações letais (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ). ....	158

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ac – Acetona

AcOEt – Acetato de etila

ACN – Acetonitrila

B.O.D. – Biochemical oxygen demand

CCD – Cromatografia de camada delgada

CDCl<sub>3</sub> – Cloroformio deuterado

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Diclorometano

CH<sub>3</sub>OH – Metanol

COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H – Correlation spectroscopy

CL<sub>50</sub> – Concentração letal 50% mortalidade

CL<sub>90</sub> – Concentração letal 90% mortalidade

DMSO – Dimetilsulfoxido

DCM – Diclorometano

EM – Espectrometria de massa

HMBC – Heteronuclear multiple-bond correlation

HSQC – Heteronuclear single quantum coherence

HPLC – High performance liquid chromatography

Hz – Hertz

Hx – Hexano

KBr – Brometo de potássio

LC – Cromatografia líquida

L<sub>3</sub> – Larvas de terceiro ínstar

MeOH – Metanol

MES – Ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico

MHz – Mega Hertz

MS – Massa espectrometry

NMR – Ressonância magnética nuclear

RMN-H<sup>1</sup> – Ressonancia magnética nuclear do hidrogênio

RMN-<sup>13</sup>C – Ressonancia magnética nuclear do hidrogênio

STS – Espécie alvo padrão

TLC - Thin layer chromatography

UPLC - Ultra performance liquid chromatography

## RESUMO GERAL

O Brasil, por apresentar uma grande biodiversidade, torna-se um campo de estudo promissor na busca de novos fitoquímicos extraídos de plantas nativas, com atividades biológicas sobre plantas infestantes e insetos de importância médica. As espécies da família Lauraceae e Dillineaceae possuem potencial na produção de compostos secundários com propriedades herbicida e inseticida. Sendo assim, o presente estudo objetivou esclarecer os seguintes questionamentos: os extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* interferirem no crescimento e desenvolvimento de *Triticum aestivum*, *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum* possibilitando, assim, uma nova alternativa no controle de plantas infestantes? Entre as espécies doadoras, qual o mais promissor para se iniciar uma bioprospecção, permitindo isolar e identificar os compostos presentes? Os extratos brutos de ambas as espécies apresentam atividade inseticida sobre ovos e larvas de *Aedes aegypti*? Para tanto, foram realizados bioensaios de coleóptilos de trigo utilizando os extratos hexânicos, diclorometânicos, acetoetílicos, acetônicos, metanólicos e aquosos de folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica* a 0,2, 0,4 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos mais ativos foram avaliados sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *E. heterophylla* e *P. maximum* utilizando as doses de 0,25, 0,5, 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Para os compostos puros foi utilizado as doses de 10<sup>-3</sup>, 3x10<sup>-4</sup>, 10<sup>-4</sup>, 3x10<sup>-5</sup> e 10<sup>-5</sup>. A atividade larvicida foi avaliada nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 3 mg.mL<sup>-1</sup> e o efeito ovicida por meio das concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, estimadas no teste com larvas de *A. aegypti*. Os extratos foliares de *O. pulchella* inibiram o crescimento de coleóptilos de trigo, a germinação e o crescimento das plântulas das espécies daninhas e das espécies padrão. Em geral, o extrato de acetato de etila extraído de folha de *O. pulchella* apresentou maior atividade fitotóxica. Onze compostos do extrato de acetato de etila foram isolados e caracterizados. Os compostos dihidroxi-eudesma, hidroxieudesma, loliolide e ácido dimorfecólico não foram descritos antes em *O. pulchella* e o Ocoteol foi descrito pela primeira vez na literatura. Os compostos espatulenol, benzil salicilate e benzil benzoate foram os mais ativos, com valores de inibição superior a 90% nas espécies padrão. *P. maximum* foi a espécie alvo mais afetada pelos extratos de folha de *O. pulchella* e *D. elliptica* em todos os parâmetros avaliados. A redução no crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema submetidas ao extrato de acetato de etila (*O. pulchella*) e metanólico (*D. elliptica*). Os extratos hexânico e diclorometânico de raiz de *O. pulchella*, na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> produziram maior efeito larvicida. Os menores valores das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram estimados para larvas submetidas ao extrato de raiz de *O. pulchella* extraído com diclorometano. A taxa de eclosão, tempo médio e velocidade média de eclosão foram afetados pelos extratos diclorometano e hexano de raiz de *O. pulchella*. A espécie *O. pulchella* apresentou maior potencial como herbicida sobre a germinação e o crescimento de espécies padrão e infestantes e atividade inseticida sobre larvas e ovos de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** Cerrado, fitotoxinas, aleloquímicos, controle, herbicida, inseticida.

## ABSTRACT

Brazil by presenting incomparable biodiversity, distributed in mosaic wonderfully distinct biomes becomes a promising the field of study in seeks of new phytochemicals extracted from native plants with biological activity on weeds and insects of medical importance. Species of Lauraceae and Dilleniaceae family have an immense potential in the production of secondary compounds with herbicide and insecticide properties. Thus, this study objective was to clarify the following questions: leaf extracts the stem and root *Ocotea pulchella* and *Davilla elliptica* could interfere with the growth and development of *Triticum aestivum*, *Euphorbia heterophylla* and *Panicum maximum* and thus make a new alternative for the control of weeds? Amongst the donor species and crude extracts which more promising to start a bioprospecting, allowing isolate and identify the present compounds? The extracts show insecticidal activity against eggs and larvae of *Aedes aegypti*? Coleoptile bioassays were performed using hexane extracts, dichloromethanic, acetoeticos, methanolic and aqueous leaf, stem and root of *O. pulchella* and *D. elliptica* 0.2, 0.5 and 0.8 mg.mL<sup>-1</sup>. Most active extracts have been evaluated on the germination and early seedling growth of *E. heterophylla* and *P. maximum* using doses of 0.25, 0.5, 1 and 2 mg.mL<sup>-1</sup>. The larvicidal activity was evaluated at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2 and 3 mg.mL<sup>-1</sup> and ovicidal effect with the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> lethal concentrations estimated in test *A. aegypti* larvae. The leaf extracts *O. pulchella* inhibit coleoptile growth of wheat and seed germination and seedling growth of weeds and standard species. In general, the ethyl acetate extract *O. pulchella* showed higher phytotoxic activity. Eleven compounds were isolated and characterized. Compounds 1, 2, 4 and 6 have not been identified before in *O. pulchella* and Ocoteol was first described in the literature. The compounds 5, 10 and 11 were most active with superior inhibition values of 90% in the standard species. *P. maximum* has been the target species most affected by *O. pulchella* and *D. elliptica* leaf extracts in all evaluated parameters. The reduction in root growth of wild poinsettia seedlings can be related to the decrease in the elongation of metaxylem cells submitted at the ethyl acetate extract (*O. pulchella*) and methanol (*D. elliptica*). The extracts from root hexane and dichloromethane *O. pulchella* at a concentration 3 mg.mL<sup>-1</sup> have produced bigger effect larvicide. Lower values of CL<sub>50</sub> and CL<sub>90</sub> were estimated for larvae subjected to the root extract from *O. pulchella* dichloromethane. Hatching rate, TME and VME have been affected by DCM and hexane root extracts from *O. pulchella*. Specie *O. pulchella* showed higher potential herbicide on the germination and the growth pattern and weed species and insecticide on larvae and eggs of *A. aegypti*.

**Keywords:** Cerrado, phytotoxins, allelochemicals, control, herbicide, insecticide.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---

Entre os diversos grupos de seres vivos que constituem a biosfera atual, as plantas são bons representantes dos processos evolutivos responsáveis pela diversidade biológica. Seu comportamento ubiquista está relacionado à resistência a diversos fatores bióticos e abióticos, tais como patógenos, herbívoros, plantas competidoras, temperaturas extremas, seca, luz ultravioleta entre outros, os quais exercem pressões seletivas que resultam numa impressionante variedade de adaptações e interações (Candido, 2011). Esses fatores desencadearam uma série de mecanismos de defesa que possibilitou a sobrevivência dos vegetais nos mais diversos ecossistemas (Silva, 2004).

No ambiente natural, os vegetais estão susceptíveis a fatores bióticos e abióticos com os quais tiveram que evoluir para garantir a sua sobrevivência (Callaway, 2002). Nas últimas décadas do século XX alguns estudos voltaram a atenção para o papel das interações entre diferentes organismos, como um importante evento na dinâmica da sucessão ecológica entre os vegetais (Michalet et al. 2006). Compreender as interações planta-animal e planta-planta é importante para a produção de certos serviços à humanidade, além de entender o papel relevante dessas relações para a manutenção da integridade das comunidades onde ocorrem (De Marco Jr.; Coelho, 2004). A relação entre plantas-organismos em alguns casos é tão intrínseca que a falta de um implica na extinção do outro. Essas interações podem ser benéficas ou maléficas de um indivíduo, planta ou microrganismo, sobre outro, muitas vezes mediadas por compostos químicos (Rinaldo et al., 1992). Estas substâncias são produtos do processo evolutivo das plantas as quais desenvolveram rotas de biossíntese, em que sintetizam e acumulam uma ampla variedade de metabólitos secundários com diferentes funções ecológicas (Callaway, 2002), como, por exemplo atrativos para polinizadores ou dispersores de sementes, na defesa contra inimigos naturais, ou agem como aleloquímicos na competição com outras plantas (Kroymann, 2011).

### **Relação planta-planta**

O convívio entre plantas na comunidade determina a competição ao qual a espécie está submetida, com reflexo no processo de perpetuação e sucessão ecológica

(Monquero, 2014). Tal relação resulta da presença de mediadores químicos ou aleloquímicos com efeitos inibitórios ou estimulatórios de uma planta sobre a outra (Rice, 1984; Gatti et al, 2010). A influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, em que há o envolvimento de biomoléculas produzidas por uma planta e liberadas no ambiente, seja na fase aquosa ou por substâncias gasosas volatilizadas no ar define o fenômeno da alelopatia (Rinaldo et al., 1992), que significa do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer (Molisch, 1937; Monquero, 2014). Entretanto, a ausência ou redução de um fator ambiental tal como água, minerais, luz, entre outros, também influencia na dinâmica da comunidade vegetal como resultado da competição (Rice, 1974). Sendo assim, competição e alelopatia operam juntas e em alguns casos seria quase impossível, separá-las (Dakshini et al., 1999). Weidenhamer et al. (1989) observaram que para uma certa quantidade de aleloquímico, o aumento da densidade de plantas diminuía o efeito alelopático, embora tenha aumentado o efeito de competição, uma vez que cada planta dividiu com suas companheiras os efeitos fitotóxicos.

As interações entre plantas cultivadas e plantas daninhas são de extremo interesse para a humanidade, uma vez que grande parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais, as quais podem sofrer sérios danos em virtude da competição em agroecossistemas (Monquero, 2014). Esse tipo de relação é determinada pela ecofisiologia que estuda a adaptação e o comportamento de plantas ou espécies em relação ao ambiente onde vivem, englobando a germinação, dormência, banco de sementes, características reprodutivas, etc, além da sinecologia que estuda as comunidades vegetais como um todo incluindo todas as espécies presentes em um dado ambiente. Assim, a espécie mais adaptada ao ambiente tende a se perpetuar e distribuir-se nos ecossistemas agrícolas (Barbour et al., 1998).

Durante a evolução das plantas daninhas desenvolveram mecanismos agressivos sobre outras plantas e aprimoraram mecanismos de sobrevivência que garantiram a persistência mesmo em situações adversas. A dispersão das sementes define bem a agressividade da planta em termos de ocupação de novos territórios. Ademais, a adaptação aos estresses climáticos, fisiográficos e bióticos também estão relacionados ao sucesso na competitividade por recursos (National Academy of Science, 1971). Tais fatores somados a ecologia química definem as relações alelopáticas e a competição presentes nos ecossistemas vegetais (Monquero, 2014).

## **Interações entre plantas e insetos**

Há cerca de 300 milhões de anos insetos e plantas compartilham associações que datam do Carbonífero. Esta associação é evidente com base nas partes de plantas fossilizadas que apresentam danos originários da alimentação de insetos. Durante o Cretáceo há cerca de 65 milhões de anos, período em que houve a disseminação das angiospermas, ocorreu a diversificação dos insetos (Gullan; Cranston, 2007).

A coevolução foi o termo usado por Erlich e Raven (1964), para designar adaptações recíprocas entre plantas e borboletas, levando à sua interdependência. A coevolução ocorre quando uma interação entre dois ou mais organismos produz uma resposta evolutiva em cada um deles. Atualmente reconhece-se que a relação entre insetos e plantas tem uma importância crucial para o conhecimento fundamental da biodiversidade terrestre (Schoonhoven, et al., 1998; Holtz et al., 2004). Tanto as plantas quanto os insetos representam dois dos maiores percentuais de organismos vivos, tanto no percentual de espécies quanto na biomassa total. A biomassa de todos os insetos na Amazônia brasileira, por exemplo, supera a de todos os vertebrados terrestre em pelo menos nove vezes (Holden, 1989; Schoonhoven et al., 2005).

As plantas e os insetos estão unidos por intrincados relacionamentos, a vida animal, incluindo os insetos, não poderia existir na ausência dos vegetais, que serve de fonte primária de energia, além, de ser rico em compostos essenciais para os organismos heterotróficos. Por outro lado, a exposição das plantas a um número extremamente grande de predadores supostamente tem sido uma das principais causas do desenvolvimento da imensa diversidade de vegetais no mundo (Schoonhoven et al., 2005).

Embora, os insetos sejam polinizadores fundamentais de várias espécies de plantas, também constituem um dos inimigos mais comuns dos vegetais. Eles não só parasitam como destroem grandes plantações. Por essa e outras razões, as plantas desenvolveram mecanismos para coabitar com estes artrópodes (Schoonhoven et al., 2005). Contra os insetos, as plantas desenvolveram dois tipos de defesa, a direta e a indireta. Na defesa direta estão envolvidos substâncias como sílica, metabólitos secundários não voláteis, enzimas e proteínas, além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente o desempenho do inseto. Na defesa indireta estão envolvidas substâncias emitidas pela planta, que atraem parasitas e predadores do inseto fitófago. Terpenos e fenilpropanóides, voláteis sintetizados por espécies

vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) ou inseticidas (Simas et al., 2004).

### **Alelopatia**

Diferentes mecanismos podem atuar negativamente entre as plantas caracterizando sua distribuição no espaço, como a alelopatia (San Emeterio et al., 2007). A alelopatia é um tipo de relação bioquímica entre vegetais que nos últimos anos tem sido foco de diversos estudos devido a sua importância nos ecossistemas (Silva, 2004). Os aleloquímicos estão envolvidos nessa relação produzindo efeitos direto ou indireto em outra planta ou microrganismo (Novaes, 2011). Os aleloquímicos podem ter efeitos positivos ou negativos, dependendo da concentração, dinâmica, persistência e destino dos mesmos no ambiente, bem como a sensibilidade de espécies alvo (Callaway; Ridenour, 2004). As substâncias com propriedades alelopáticas podem estar presentes em diversos órgãos dos vegetais como folhas, raízes, caules, flores e frutos (Weir et al., 2003 citado por Novaes, 2011). Assim, todos os órgãos vegetais têm potencial para armazenar aleloquímicos, porém, o acúmulo de metabólitos secundários em estruturas especializadas evita que a planta produtora seja prejudicada pela toxidez que muitas destas substâncias apresentam (Friedman, 1995 citado por Oliveira, 2009).

Diferentes fatores afetam direta ou indiretamente a produção de aleloquímicos pelas plantas, entre eles, pode-se citar: qualidade e intensidade da luz; comprimento do dia; condições de fertilidade dos solos; temperatura; agentes alelopáticos; idade dos órgãos da planta e fatores genéticos (Souza Filho; Alves, 2002a). A distribuição dessas substâncias na planta não é uniforme, tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, no espaço e no tempo (Gobbo-Neto; Lopes, 2007). Por diferentes rotas essas substâncias são liberadas para o ambiente, incluindo: lixiviação de material vegetal vivo ou morto, volatilização, exsudação radicular e decomposição de tecidos ou restos de culturas. Ademais, do local de síntese até a planta-alvo esses compostos podem estar sujeitos à ação de três fatores: transformação (biótica ou abiótica), degradação pelos microrganismos e retenção (imobilização da substância pelos colóides do solo) (Cheng, 1992).

Quando absorvidos pela planta-alvo em conjunto, ou individualmente, passam a provocar alterações metabólicas e fisiológicas em graus de intensidade dependentes



da concentração do aleloquímico (Einhellig, 1986; Novaes, 2011). As alterações compreendem a permeabilidade da membrana, absorção de nutrientes, fotossíntese, respiração entre outros, resultando em deficiência no desenvolvimento e no crescimento das plantas (Morrissey, 2009). Estes fatores não só desempenham importantes funções nas interações ecológicas entre plantas como também interferem nos ecossistemas agrícolas podendo ser utilizado como pesticidas naturais (Ridenour, 2004).

### **Metabólitos secundários**

O metabolismo é conjunto de transformações de moléculas orgânicas que são catalisadas por enzimas nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a homeostase (Marzzoco; Torres, 2007). Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (Champeet et al., 2008). Os metabólitos secundários diferem dos primários, por estarem em baixas concentrações, por serem seletivos para determinados grupos de plantas (Berg; Lubert, 2008), onde desempenham diferentes funções ecológicas (Taiz; Zeiger, 2009). Nas plantas interferem na respiração, fotossíntese, atividade enzimática, abertura dos estômatos, no equilíbrio de fitohormônios, divisão e alongação celular, etc, provocando desequilíbrios na germinação e no crescimento (Singh et al., 2006, Teerarak et al., 2012). Nos insetos promovem repelência, inibição de oviposição, impalatividade, alterações no sistema hormonal, deformações, infertilidade e mortalidade (Roel, 2001). Todas as plantas os produzem, porém, variam quantitativamente e qualitativamente de espécie para espécie. Além disso, a tolerância ou resistência a estes compostos também pode ser específica, havendo espécies mais sensíveis que outras (Ferreira; Aquila, 2000).

De maneira geral, todos os tecidos das plantas apresentam potencial de armazenar metabólitos secundários; folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes (Friedman, 1995; Parvez et al., 2004). Sendo assim, as atividades biológicas diferem de acordo com órgão, mas as folhas e raízes são as principais fontes de compostos (WU et al., 2009). As atividades biológicas observadas em folhas e raízes podem ser resultado de diferenças na concentração de metabólitos secundário

difusíveis, composição química ou alcalinidade diferenciada entre extratos obtidos a partir destes órgãos (Dorning e Cipollini, 2006; Batish et al. 2007). Além disso, a síntese de metabólitos secundários é determinado pelas condições ambientais, tais como temperatura, salinidade, condições de umidade e nutrientes minerais (Kutchan et al., 2001). Tais condições influenciam na síntese de diferentes classes de metabólitos secundários promovendo uma tolerância a estresses abióticos e bióticos (Ramakrishna e Ravishankar, 2011).

Segundo Simões et al. (2007) a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O primeiro é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, já os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (Leite, 2008).

A presença e a concentração de metabólitos secundários nos vegetais estão relacionadas às funções as quais desempenham. Os terpenos representam a classe de metabólitos secundário mais abundante e desempenham um papel importante nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (Zwenger; Basu, 2008). Os sesquiterpenos compõem uma ampla gama de efeitos biológicos (Fraga, 1998), incluindo bactericida, fungicida, inseticida, citotóxica, piscicida, moluscicida, reguladores do crescimento de plantas e propriedades fitotóxicas (Jansen; Groot, 2004). Os flavonóides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico. Já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo com múltiplos efeitos biológicos, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, inseticida, poder de redução a fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária (Filho et al., 2001; Araújo, 2008; Pereira; Cardoso, 2012).

Tais características tornam as plantas uma fonte de fitoquímicos promissores no controle de pragas agrícolas e de insetos vetores. Além disso, os fitoquímicos são vantajosos devido à sua especificidade, maior aceitabilidade e são biodegradáveis, raramente contém átomos halogenados (Farooq et al., 2011).

## Cerrado

O domínio Cerrado compreende uma área de 205 milhões de hectares (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2004), e se estende sobre os Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Distrito Federal, ademais, dos encaves no Amapá, Roraima e Amazonas (Ministério do Meio Ambiente 2015). Além disso, o Cerrado é a mais rica savana tropical do planeta, com mais de 12.000 espécies de plantas, sendo 30% endêmicas (Klink e Machado de 2005; Forzza et al 2010). É um domínio fitogeográfico, em que há diferentes tipos de fisionomias, tais como mata ciliar, floresta estacional semidecídua, floresta estacional decidual, campo úmido, cerrado sensu stricto, cerradão (Batalha 2011).

Portanto, é uma das formações vegetais no Brasil de grande biodiversidade (Coutinho, 2002), embora seja o ambiente natural mais fragmentado do Brasil (Sano et al. 2008), em que diversas espécies de plantas e animais correm risco de extinção. Estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não ocorram em áreas protegidas. Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana e, nas últimas décadas, com a expansão da fronteira agrícola brasileira o Cerrado vem sendo degradado (Ministério do Meio Ambiente 2015).

O Cerrado apresenta duas estações definidas, a estação chuvosa (outubro a abril) e a estação seca (maio a setembro). O solo é ácido, e oligotrófico com alta concentração de alumínio (Haridasan 2000). Além disso, fatores ambientais como estresse hídrico e alta temperatura são situações comumente encontradas no Cerrado e pode aumentar a produção de compostos secundários nas plantas (Einhellig, 1996). Estudos realizados com espécies vegetais do Cerrado revelou a presença de aleloquímicos com atividade fitotóxica (Gorla e Perez, 1997; Borghetti et al., 2005; Silva et al, 2006; Gatti et al.,2007; Grisi et al.,2012; Imatomi,2013; Anese, 2015) sugerindo que a alelopatia desempenha um papel importante na ecologia do cerrado e, também compostos com atividade inseticida, sobretudo, em insetos vetores como o *Aedes aegypti* (Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2006). Diante desse contexto, o uso de espécies do Cerrado em estudos envolvendo atividade fitotóxica e inseticida se mostra promissora.

## **Espécies botânicas**

A família Lauraceae é composta por aproximadamente 2500 espécies distribuídas em 52 gêneros (Alves; Ishii, 2007). No continente Americano ocorre cerca de 900 espécies incluídas em 29 gêneros. No Brasil, é representada por 22 gêneros com alta diversidade nas florestas pluviais e também nas restingas e no Cerrado (Barroso et al., 2002). Lauraceae destaca-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias na fabricação de papel, na indústria de perfumaria e na indústria química, além de serem utilizadas na culinária, na marcenaria e na construção civil, como também na medicina popular (Marques, 2001).

Dentre os gêneros pertencentes a essa família destaca-se o gênero *Ocotea* o qual apresenta elevado potencial farmacológico. *Ocotea* é o maior gênero da família Lauraceae na região Neotropical, com cerca de 350 espécies, a maioria nas Américas tropical e subtropical. Estima-se que no Brasil ocorra entre 120 a 160 espécies. É um gênero muito variável servindo como depósito de espécies que não são prontamente acomodadas em outros gêneros (Werff, 1991). Segundo Rohwer (1993 a) é o gênero menos definido da família.

O gênero *Ocotea* é caracterizado por árvores e arbustos com folhas em geral alternas, flores unissexuadas ou bissexuadas, inflorescência tirsóide-paniculada ou racemiforme, fruto do tipo baga com cúpula (Baitello et al. 2003). Espécies do gênero *Ocotea* são reconhecidas fitoquimicamente pela síntese de uma grande variedade de substâncias, cujos principais metabólitos são monoterpenos, alcalóides isoquinolínicos, lignanas, neolignanas e óleos essenciais (Barbosa-Filho et al., 1999; Araujo et al., 2001; Dias et al., 2003; Budel; Farago, 2004; Pabon; Cuca, 2010; Silveira et al., 2011), flavonóides, como o canferol e a quercetina, polipropanóides, esteróides, sesquiterpenos e óleos essenciais (Costa 2000; Lordello et al. 2000; Araujo et al., 2001; Watson; Dallwits 2005).

Devido à diversidade química encontrada nas espécies desse gênero apresenta o maior número de espécies medicinais com diferentes atividades biológicas, tais como tônico e estomáquico, anti-reumática e depurativa (Emmerich & Senna, 1985; Marques, 2001), repelente (Lwande et al. 1999), antioxidante (Bruni et al., 2004; Oliveroverbel et al., 2010), antibacteriana (Bruni et al, 2004), antifúngica (Lorenzo et al., 2001; Bruni et al., 2004), antiinflamatória (Zschocke et al., 2000 a), antialérgica

(Serra et al., 1997), depressora do SNC (Morais et al., 1998), antiprotocista (Silva Filho et al., 2008; Cabral et al., 2010), relaxante muscular (Ribeiro et al., 2003), hipotensora (Dias et al., 2004), e antagonista do fator de ativação plaquetário (Faria-Neto et al., 1995a,b), herbicida (Carmo et al., 2007), etc.

A espécie *Ocotea pulchella* é conhecida por canela-babosa, louro-abacate, guaiacá, cane-goiacá, canela-parda, canela-pimenta, amansa-aiui-saiiu, além de Canelinha e Inhumirim (Marques, 2001). Está distribuída na América do Sul; Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. No Brasil, representantes dessa espécie ocorrem nas regiões Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Quinet et al. 2010).

O hábito desta espécie varia de arbustivo a arbóreo, podendo chegar a 20 m de altura, com ramos cilíndricos, áureo-pubérulos (Figura 1). As folhas são alternas, canaliculado, pubérulo na face abaxial; estreito-elíptica ou elíptica, cartácea-coriácea, ápice arredondado, obtuso ou acuminado, base cuneada, revoluta, face adaxial glabrescente, lustrosa, reticulação densa, nervuras planas, face abaxial glabrescente, reticulação densa, nervuras subsalientes, padrão de nervação broquidódromo, domácias nas axilas, cobertas por tricomas alvos. Inflorescências axilares; panícula ou racemo, áureo-pubérulo. Flores unissexuadas. Fruto ovalado ou elipsoide (Brotto et al., 2010). Ocorre em cerrado típico e cerradão (Lorenzi, 2002). Diferentes atividades biológicas foram identificadas nessa espécie (Borges et al., 1993; Lordello, 1997; Marques, 2001; Carmo, 2002; Carmo et al., 2007; Araujo, 2012; Montrucchio, 2012) entre elas, herbicida, bactericida, anticancerígena e inseticida.

A família Dilleniaceae é comum nos cerrados brasileiros (Metcalf e Chalk, 1950). As espécies dessa família são constituídas por árvores, arbustos e lianas de folhas inteiras, penínervas, sem estípulas, com filotaxia alterna e geralmente apresentam as células epidérmicas impregnadas de sílica, o que lhes confere certa aspereza ao tato (Barroso et al., 1978).

O gênero *Davilla* está distribuído na região Neotropical, sendo assim constituído por 20 espécies, 11 dos quais foram estudados botanicamente (Gurni e Kubitzki, 1981). Algumas espécies deste gênero são utilizadas pela população como plantas medicinais. Entre as atividades biológicas identificadas por espécies desse gênero está atividade anti-ulcerogénica (Guaraldo et al., 2001).



Figura 1. Imagens de *Ocotea pulchella*; (A) arbusto, (B) inflorescências e (C) frutos. Encontrada na área de reserva de Cerrado “sensu strictu” da Universidade Federal de São Carlos. Autor: Lafayette P. Candido, 2014.

*Davilla elliptica* (Dilleniaceae) St. Hil. é uma espécie que apresenta ampla distribuição neotropical (Schiavini; Araújo 1989), sendo parte da flora representativa dos cerrados (Marimon et al., 1998). *D. elliptica* é um arbusto que atinge 1,5m de altura, com folhas de pelos ásperos devido ao grande número de tricomas, flores amarelas e frutos secos redondos de cor marrom-amarelada, ocorre naturalmente no bioma Cerrado (Joly, 1987; Sano; Almeida, 1998; Silva et al., 2001) e é conhecida popularmente como lixeirinha, lixeira, bugre, sambaibinha e muricizinho (Figura 2).

Para espécies *D. elliptica* os estudos fitoquímicos prévios identificaram a presença de kaempferol, quercetina, miricetina e ramnosídeo (David et al., 1996; Guaraldo et al., 2001). Rinaldo et al., (2006), também isolaram de *D. elliptica* os compostos miricetina-3-O-Rhamnoside e quercetina-3-O-ramnosido. Partes aéreas de *D. elliptica* conduziu à detecção de ácidos fenólicos, um ácido retinóico, bem como uma série de flavonóides O-glicosídeos e seus derivados acilo (Rodrigues et al., 2008). Além disso, foi constatada a presença de taninos, cumarinas, resinas, flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenóides (Soares et al., 2005).

*D. elliptica* é empregada como adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético (Rodrigues; Carvalho, 2001), no tratamento de hemorróidas, hérnia e

diarréia, e em aplicações tópicas como antisséptico na limpeza de ferimentos (Silva et al., 2001). Além disso, a Michelin et al. (2005) descreveu a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das partes aéreas de *D. elliptica*. Carlos et al. (2005) observaram efeito imunestimulatório em ratos para os extratos metanólico e etanólico das folhas de *D. elliptica*. Gatti et al. (2007) identificou o efeito de extratos de *D. elliptica* na inibição da velocidade de germinação de alface e gergelim.

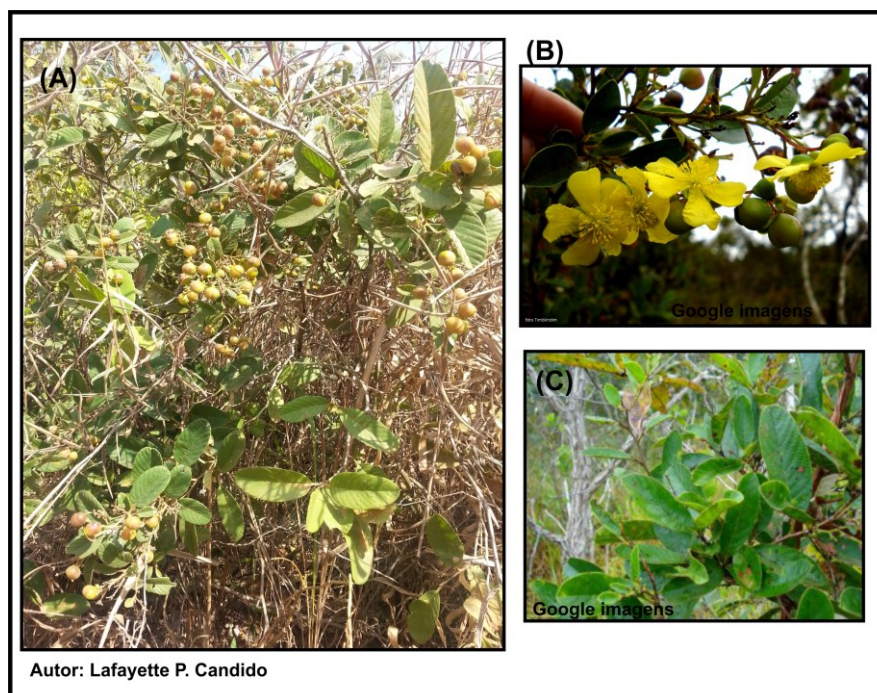


Figura 2. Imagens de *Davilla elliptica*; (A) arbusto, (B) flores e (C) folhas. Encontrada na área de reserva de Cerrado “sensu strictu” da Universidade Federal de São Carlos. Autor: Lafayette P. Candido, 2014.

### Aspectos gerais sobre *Aedes aegypti* L.

O *Aedes aegypti* tem sua origem no continente Africano do qual se disseminou para todo o planeta. Durante os séculos XVIII e XIX, esse inseto expandiu pelos trópicos como consequência do desenvolvimento marítimo da indústria e do comércio. Por meio das navegações tanto o vetor quanto os arbovírus foram dispersos, isso ocorreu por que os mosquitos utilizavam a água armazenada nos navios como locais para reprodução, mantendo o ciclo de transmissão mesmo em longas viagens (Glubler, 2002).

No Brasil, o *A. aegypti* é conhecido desde o século XVII, instalando-se em diversas regiões sendo hoje responsável por vários ciclos epidêmicos. O primeiro caso da doença ocorreu em Recife, em 1685 e anos depois em 1692 em Salvador, inúmeras pessoas morreram infectadas pelo vírus da dengue. Com o comércio e extrativismo da madeira o *A. aegypti* começou a se propagar no Brasil (Morais, et al., 2004). Atualmente, além dos quatro sorotipos da dengue esse vetor é responsável também pela transmissão da chikungunya e a zika (Teixeira et al., 2015).

Fatores como a globalização, alterações climáticas, o crescente número de voos internacionais com pessoas infectadas em período de incubação, entre outros propiciaram à dispersão de vetores e suas doenças. O Brasil está vivenciando a introdução e um rápido processo de dispersão de dois novos arbovírus para as Américas, mas que são velhos conhecidos na África e Ásia são eles; o vírus Chikungunya (introduzido de julho a agosto de 2014) (Teixeira et al. 2015), após ter entrado no Caribe em dezembro de 2013 e muito antes ter provocado grandes epidemias na África e Ásia desde 2004; e o vírus Zika, possivelmente introduzido no mesmo período durante a Copa do Mundo realizada em 2014 no Brasil (Zanluca et al., 2015).

Febre Chikungunya é uma doença semelhante a dengue, provocada pelo vírus CHIKV, da família Togaviridae. Seus sintomas são semelhantes aos da dengue: febre, mal-estar, dores pelo corpo, dor de cabeça, apatia e cansaço. Entretanto, o vírus chikungunya avança nas juntas dos pacientes e causa inflamações com fortes dores acompanhadas de inchaço, vermelhidão e calor local (Teixeira et al. 2015). A febre chikungunya teve seu vírus isolado pela primeira vez em 1950, na Tanzânia, até junho de 2004 não ocorriam surtos, mas a partir desse ano, a febre chikungunya teve fortes manifestações no Quênia, se espalhando para Ilhas do Oceano Índico, Índia, Malásia, Indonésia, Tailândia etc. E no ano de 2010 em Taiwan, França, Estados Unidos e Brasil foram identificados os primeiros casos (Nunes et al., 2015).

O Zika vírus é um flavivírus (Flaviviridae) que foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco Rhesus febril na Floresta Zika, localizada próximo de Entebbe na Uganda, em 20 de abril de 1947 (Dick et al.,1952; Karabatsos et al.,1985). Esse vírus é transmitido por *Aedes aegypti* e tem causado doença febril, cefaleia, exantema, mal estar, edema e dores articulares, por vezes intensas. Embora, seja aparentemente benigna a doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, tem apresentado quadros mais severos, afetando o sistema nervoso central (síndrome de



Guillain-Barré, mielite transversa e meningite), tem sido associado ao Zika (Oehler et al., 2013; Campos et al., 2015; Zanluca et al., 2015).

O *A. aegypti* é considerado o culicídeo mais eficiente na transmissão de várias espécies de arbovírus, principalmente o vírus da dengue (WHO, 1997b). Tanto os machos quanto as fêmeas nesses insetos possuem hábito alimentar diurno, com maior pico entre as 16h e 18h (Silva et al., 2004). As fêmeas são hematófagas e anautógenos, enquanto os machos se alimentam de substâncias retiradas do floema. As fêmeas desse vetor colocam os ovos em qualquer lugar desde que haja umidade (Augusto et al., 2000). O inseto *A. aegypti* alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbado antes de estar totalmente ingurgitado. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus (Passos et al., 2003). O ovo de *A. aegypti* é a forma mais resistente do ciclo biológico, por que apresentam diferentes períodos de quiescência, assim sendo, é responsável pela manutenção da população de adultos na natureza de forma contínua e flutuante (Silva et al, 1998).

O *A. aegypti* é holometábolo com o ciclo de vida composto por quatro fases: ovo, larva (1º a 4º instar), pupa e adulto, esse último com dimorfismo sexual (Figura 4).

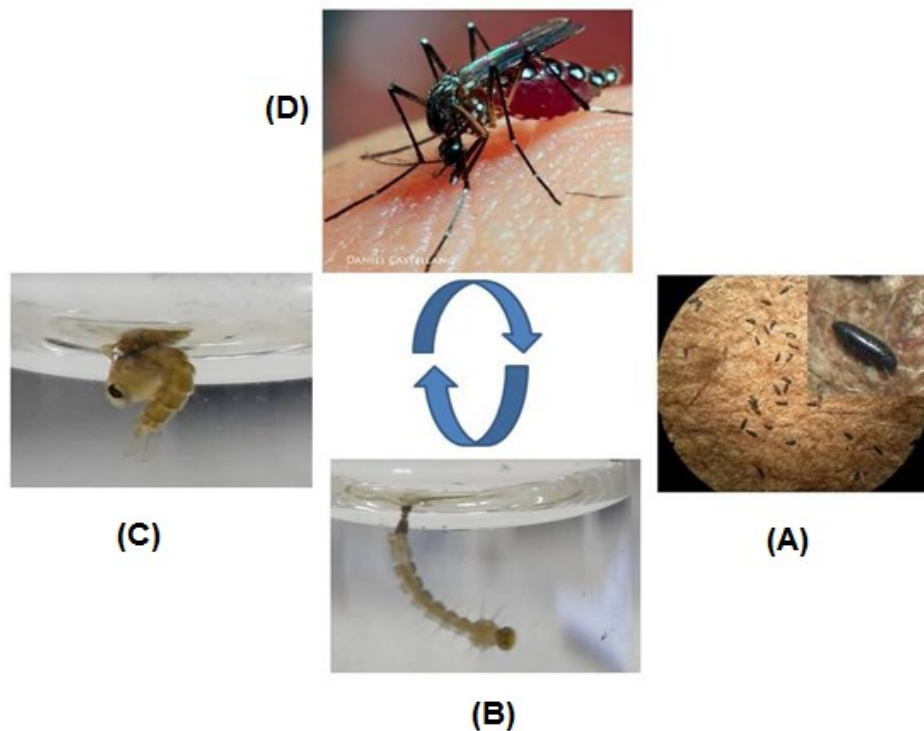


Figura 3. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. (A) ovo, (B) larva, (C) pupa e (D) adulto.

Os ovos dos mosquitos são elípticos, alongados e fusiformes, com aproximadamente 1 mm de comprimento. No momento da postura são de coloração branca, no entanto, adquirem coloração enegrecida e tonalidade brilhante após algumas horas (Consoli; Oliveira, 1994). As larvas são alongadas, vermiformes, esbranquiçadas, o corpo está dividido em cabeça, tórax e abdome (Lozovei, 2001). De vida livre, alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, alguns tipos de algas, sendo a filtração a forma mais comum de alimentação (Aciole, 2009). A pupa representa a transição entre o meio aquático para o terrestre. Seu corpo forma um cefalotórax e apresentam metabolismo lento (Forattini, 2002). Os adultos apresentam coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. Possuem um par de antenas que nos machos é plumosa e nas fêmeas é pilosa (Aciole, 2009).

Sendo assim, é importante ressaltar a necessidade de melhorar o controle vetorial e buscar novas alternativas para auxiliar os métodos atualmente utilizados no controle do *Aedes aegypti*, como a busca de novos fitoquímicos com propriedades larvicida, ovicida, adulticida e repelente, já que somente essa espécie no Brasil está associada à transmissão de três arboviroses: dengue, Chikungunya e Zika.

### **Extratos de plantas com potencial inseticida**

O uso de produtos de origem vegetal no controle de insetos, resultantes do metabolismo secundário, não se trata de uma novidade. Por exemplo, os rotenóides, as piretrinas e nicotinas já foram utilizados no passado pelos índios e romanos com esse fim. Os adventos de determinadas técnicas permitem a modificação química dessas substâncias para aumentar sua eficiência e a descoberta de novos princípios ativos que sirvam de ferramenta para o controle populacional desses animais (Teixeira, 2003).

A utilização de plantas com fins medicinais são hábitos comuns na cultura popular. Contudo, seu reconhecimento como ferramenta promissora no combate a insetos transmissores de doenças parece ser a grande novidade em vigilância entomológica. Como organismos que coexistem com os insetos e outros microrganismos, os vegetais desenvolvem mecanismo de defesa contra predadores e, portanto, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas (Teixeira, 2003). Substâncias extraídas da casca do caule, das folhas e dos frutos de diversas espécies têm demonstrado propriedades larvicida e ovicida no controle de diversos

culicídeos (Silva et al., 2004; Simas et al., 2004; Rodrigues et al., 2005; Candido et al., 2013, Candido et al., 2015).

Várias substâncias de origem natural são eficazes contra insetos, por maneiras distintas, como inseticidas que afetam os axônios (clorados e piretróides) e sinapses (organofosforados e carbamatos), ou a respiração (rotenóides); ou ainda aquelas que afetam o balanço hormonal, por exemplo, análogos e antagonistas do hormônio juvenil, e ainda, substâncias que afetam o comportamento, podendo ser atrativos ou repelentes (Teixeira, 2003; Knaak; Fiuza, 2010). Trabalhos de pesquisas envolvendo plantas, normalmente apresentam dois objetivos; a obtenção de inseticidas botânicos naturais para o uso direto ou a descoberta de novas moléculas que possam ser sintetizadas em escala industrial (Vendramim, 1997).

Entre os inseticidas de origem botânica encontrados no mercado estão àqueles derivados da rotenona, piretrina, azadiractina, nicotina e rianodina (Isman, 1997). Além de produtos a base de eucalipto e citronela comercializados para o controle de insetos (Xavier, 2009).

O controle de insetos realizado com extratos vegetais da flora nacional tem-se apresentado como uma alternativa promissora, pois vem produzindo bons resultados em condições de laboratórios e em campo. Esses produtos são efetivos no controle entomológico reduzindo as aplicações de inseticidas químicos sintéticos prejudiciais à saúde humana e causadores de desequilíbrios ecológicos (Pimenta, 2006).

Em vista dos danos ambientais e o risco a saúde humana gerada pelo crescente uso dos compostos sintéticos, os métodos alternativos ganharam novo impulso e passaram a merecer maior atenção (WHO, 2005). Dentre estes, vem se destacando o desenvolvimento da busca de novos princípios ativos extraídos de vegetais capazes de interferir negativamente sobre diferentes organismos. Assim, partindo das informações já existentes sobre a atividade biológica e fitoquímica de *Davilla elliptica* St. Hill e de *Ocotea pulchella* Nees & Mart, poucos trabalhos se referem ao papel dos compostos secundários dessas espécies vegetais e seu potencial herbicida e inseticida.

Diante disso, o objetivo do trabalho consistiu em obter conhecimentos sobre a fitotoxicidade e atividade inseticida *D. elliptica* e de *O. pulchella* e, para isso, se buscou responder os seguintes questionamentos:

(1) Os extratos de folha, caule e raiz de *D. elliptica* e *O. pulchella* poderiam interferir na germinação e no crescimento de espécies infestantes?

(2) Além disso, esses extratos poderiam afetar o desenvolvimento de larvas e a viabilidade de ovos de *Aedes aegypti*?

(3) Entre as espécies doadoras qual apresenta maior potencial fitotóxico e quais os compostos responsáveis pela atividade herbicida?

(4) Dentre os órgãos vegetais de *D. elliptica* e *O. pulchella* qual o extrato mais ativo no controle de plantas infestante e de larvas e ovos de *Aedes aegypti*?

## REFERENCIAS

- ACIOLE, S. D. G. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae). Dissertação. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. FCUL, p.86, 2009.
- ALMEIDA S. P.; PROENÇA C. E. B; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina/DF: EMBRAPACAPC, 1998.
- ALVES, F. M.; ISHII, I. H. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 179-192, 2007.
- ANESE, S; JATOBÁ, L.J; GRISI, P.U; GUALTIERI, S.C.J; SANTOS, M.F.C; BERLINCK, R.G.S. Bioherbicide activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miels roots. **Industrial Crops and Products**. v.74, p. 28–35, 2015.
- ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A.L.L.; MAIA, B.H. L. N. S. Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (LAURACEAE) **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 81-84, Jul.-Dez./2001.
- ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 477,2008.
- AUGUSTO, L. G. S. et al. Avaliação crítica do programa de erradicação do *Aedes aegypti*: Contribuições técnicas para medidas de controle. **Revista do IMIP**. v. 14 n.1, p.90-97, 2000.
- BAITELLO, J. B., HERNANDEZ, F. L., MORAES, P. L. R., ESTEVES, R., MARCOVINO, J. R. Lauraceae. In: Maria das Graças Lapa Wanderley; George John Shepherd; Therezinha Sant'Ana Melhem; Ana Maria Giuliatti; Mizué Kirizawa. (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo – v. 3. RiMa/Fapesp. São Paulo, 2003.
- BARBOUR, M. G.; BURK, J. H.; PITTS, W. D.; GILLIAM, F. S.; SCHWARTZ, M. W. **Terrestrial Plant Ecology**. Menlo Park: Benjamin Cumming, p.688, 1998.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS, L. C. S. L.; CUNHA, E.V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: Exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais Academia Brasileira Científicas**. v.71, p.231-238, 1999.
- BARROSO, G. M; GUIMARÃES E. F; ICHASO, C. L. F; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. **Sistemática das Angiospermas**. Rio de Janeiro: Ed. USP, 1978.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.1, 2ª. Ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.225, 2002.

BATALHA M.A. The Brazilian Cerrado is not a biome. **Biota Neotropical**, v.11, p.1–4, 2011.

BATISH, D.; LAVANYA, K.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. **Plant Growth Regulation**, v. 51, p.119-128, 2007.

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

BORGES, E. E. L.; Lopes, E. S.; Silva, G. F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I - árvores. **Revista Árvore**. v.17, p. 69-84, 1993.

BUDEL J. M.; FARAGO P.V. Aspectos botânicos e químicos do gênero *Ocotea* Aublet, Lauraceae. **Revista de Estudos Vale do Iguaçu**. v.4, p.31-39, 2004.

BROTTO, M. L. Estudo taxonômico do gênero *Ocotea* aubl. (lauraceae) na floresta ombrófila densa no estado do Paraná. 92 f. (Mestrado), Universidade Federal do Paraná), 2010.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v.85, p.415-421, 2004.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L.; CHAVES, M. C.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 124, p. 319-324, 2010.

CALLAWAY, R. M. The Detection of Neighbors by Plants. **Trends Ecology Evolution**, v. 17, p. 104-105, 2002.

CALLAWAY, R. M.; RIDENOUR, W. M. Novelweapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, p. 436 – 443, 2004.

CAMPOS, G. S; BANDEIRA, A. C; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v.21, p.5-10, 2015

CANDIDO, L. P. Bioatividade de extratos vegetais sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.1762). Dissertação. Pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental. p.109,2011.

CANDIDO, L P; CAVALCANTI, M T and BESERRA, E B. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.46, n.4, 2013.

CANDIDO, L. P. and BESERRA, E. B. Repellent activity of *Cnidocolus phyllacanthus* Mart. and *Ricinus communis* L. extracts against *Aedes aegypti* L. oviposition behavior. **Biotemas**, v.28, n.4, p.105-112, 2015.

CARLOS, IZ.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO, JR. C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.15, p. 44-50, 2005.

CARMO, F. M. S. Substâncias alelopáticas de algumas espécies arbóreas nativas do município de Viçosa, MG, Brasil. Tese de Doutorado. UNESP. Rio Claro. SP, 2002.

CARMO, F. M. DA S.; LIMA, E. E. B.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanic Brasilian**. v.21, n.3, p.697-705, 2007.

CONSOLI, R. A. G. B. e OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v.23, p.357-360, 2000.

COUTINHO L.M. **O bioma do cerrado**. In: Klein AL (Org) Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Editora da Unesp, São Paulo, 2002.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p. 2008.

CHENG, H. H. A conceptual framework for assising allelochemicals in the soil environmental. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Ed. Allelopathy. New York: Chapman & Hall, p.21-29, 1992.

DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L.; INDERJIT. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Eds.) Principles and practices in plant ecology. Boca Raton, CRC Press, 1999. p.3-14.

DAVID, J. M.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; CHÁVEZ, J. P. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. **Jounal Brazilian Chemical Society**. v.7, p.115–118, 1996.

DE MARCO, J. R. P.; COELHO, F. M. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural cultures' pollination and production. **Biodiversity and Conservation**. v.13, p.1245-1255, 2004.

DIAS, K. L.; SILVA, C.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Medica**, v.70, p.328-333, 2004.

DICK, G.W.A.; KITCHEN, S. F; HADDOW, A. J. Zika virus I. Isolation and serological specificity. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. v.46, n.5, p.509-20, 1952.

DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and mode of allelochemicals. In: PUTNAM, A. R.;TANG, C. S. Ed. The science of allelopaty. New York: J. Wiley & Sons. p.171-188, 1986.

EINHELLIG, F. A. Interaction involving allelopathy in crop systems. **Agronomy Journal**. v.88, p.886-893,1996.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**. v. 18, p. 586-608, 1964.

EMMERICH, M.; SENNA, L. M. Estudos de etnobotânica no Parque indígena do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. **Bradea**. v. 4, n. 26, p. 170-175, 1985.

FARAGO, P.V. Mestrado, Federal University of Paraná, Curitiba, 2002.

FARIA-NETO, H. C.; TIBIRICA, E.V.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Yangambin, a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and in vitro studies. **Planta Medica**, v.61, p.101-105, 1995a.

FARIA-NETO, H. C.; ARAUJO, C. V.; MOREIRA, S. et al. Yangambin, a new naturallyoccurring platelet activating factor receptor antagonist: in vivo pharmacological studies. **Planta Medica**, v.61, p.106-112, 1995b.

FAROOQ, M.; ZAHID, K. J.; CHEEMA, A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493-506, 2011.

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

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: **Agros**, 317-334, 2001.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Medica**. São Paulo: Edusp, p.453-492, 2002.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, A. A. JR.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.;



BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; FRAGA, B. Natural sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v.15, p. 73-92, 1998.

FRAGA, B. Natural sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v.15, p. 73-92, 1998.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. Pp. 629-644. In: J. Kegel & G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker Inc., New York. 1995.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; FERREIRA, A. G. Avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de espécies de cerrado. **Revista Brasileira Biociência**. v.5, p.174-176, 2007.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 454-461, 2010.

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

GORLA, C. M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influence of aqueous extracts of leaves of *Miconia albicans triana*, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Witt and *Drimys winteri* forst on germination and initial growth of tomato and cucumber seeds. **Revista Brasileira Sementes**. v.19, p.260-265, 1997.

GUARALDO, L.; SERTIÈ, J. A. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in rat. **Journal Ethnopharmacology**. v.76, p.191-195, 2001.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Os insetos: um resumo de entomologia. 3. ed. São Paulo: Roca, 440 p., 2007.

GURNI, A. A.; KUBITZKI, K. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. **Biochemical System Ecology**. v.9, p.109-114, 1981.

GLUBER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**. v.10, p.100-103, 2002.

GRISI, P. U.; RANAL, M. A.; GUALTIERI, S. C. J.; SANTANA, D. G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. **Acta Science Agronomy**. v.34, p.1-9, 2012.

HARIDASAN, M. Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, p.54-64, 2000.

HOLDEN, C. Entomologists Wane as insects Wax. **Science**. v.246, p.734-736, 1989.

HOLTZ, A. M. et al. Ação de plantas por meio de Infoquímicos sobre o segundo e terceiro nível tróficos. **Biociência**. Uberlândia. v. 20, n.1, p 53-60, jan/abr.2004.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta botânica brasílica**. v. 27, n. 1, p.54-61, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas do Brasil**. IBGE, Rio de Janeiro (2004). gov.br/mapas\_tematicos/mapas\_murais/biomas.pdf. Acesso em novembro 2015.

ISMAN, N. B. Neen and botanical insecticides: barriers to comercializacjon. **Phytoparasitica**. v.25, n.4, p. 339-344, 1997.

JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**, v. 21, p. 449-477, 2004.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal**. Companhia Editora Nacional. São Paulo, SP, 1987.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed. San Antonio: **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.11, p.47, 1985.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**. v. 125, p. 58-60, 2001.

KLINK, C. A.; Machado, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**. v.19, p.707–713, 2005.

KNAAK, K.; FIUZA, L. M. Potencial de oleos essenciais de plantas no controle de insetos e microorganismos. **Neotropical Biology and Conservation**. v.5, n.2, p.120-132, 2010.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 14, p. 246-251, 2011.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, 344p. 2008.

LORDELLO, A. L. L.; YOSHIDA, M.. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Phytochemistry**. v. 46, p. 741-744, 1997.

LORDELLO, A. L. L.; CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* Lauraceae. **Revista Latinoamericana de Química**.v.28, p.35-39, 2000.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, v. 1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.

- LOZOVEI, A. L. Culicídeos (mosquitos). *Entomologia Medica e Veterinária*. Editora Atheneu, p.432, 2001.
- LWANDE, W.; NDAKALA, A. J.; HASSANALI, A.; MOREKA, L.; NYANDAT, E.; NDUNGU, M.; AMIANI, H.; GITU, P.M.; MALONZA, M. M.; PUNYUA, D. K. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. **Phytochemistry**. v.50, p.401-405, 1999.
- MARINON, B. S.; R. F. VARELLA; B. H. MARINON JUNIOR. Fitossociologia de uma área de cerrado de encosta em Nova Xavantina, Mato Grosso. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**. v.3, p.82-101,1998.
- MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.195 - 206, 2001.
- MARZZOCO, A. E TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.736, 2007.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford, UK, 1950.
- MICHALET, R.; BROOKER, R. W.; CAVIERES, L. A.; KIKVIDZE, Z.; LORTIE, C. J.; PUGNARIE, F. I.; VALIENTE-BANUET, A.; CALLAWAY, R. M. Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? **Ecology Letters**. v.9, p.767-773, 2006.
- MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; IHA, S. M.; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.15, p.209–211, 2005.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biomás**. MMA, (2015). <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em março 2016.
- MOLISCH, H. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie*. Jena, Fischer. 1937.
- MONQUERO, P.A. *Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas*. Ed. Rima, São Carlos, p.430, 2014.
- MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.62, p.57-61, 1998.
- MORAIS, N. B. et al. Dengue um desafio a vencer. **Revista CFMV**, Brasília-DF, v.10, n.33, p.11-17, 2004.
- MORRISSEY, J. P. Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites (cap.13), in *Plant-derived Natural Products*. Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (Eds.), Springer, 2009.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicine isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medicines**. 78: 1543–1548, 2012.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. **Principles of the plants and animal pest control**. volume 2, weed control. Washington: Printing and Publishing Office of the National Academy of Science, p.471, 1971.

NOVAES, Paula. Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellata*. Dissertação. Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar, 2011.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M.; GLDING, N.; KRAEMER, M. U.; OLIVEIRA, L. F. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**. v.13, n.102, p.1-11, 2015.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOLFRT, I.; LESTÈRE, S.; VALOUR, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**. v.19, n.9, p.20720, 2014.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SANTANA, A. E. G. Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.16, p.618–624, 2006.

OLIVEIRA, S. C. C. Estudo Alelopático de Espécies do Gênero Solanum do Distrito Federal. Tese de Doutorado. São Carlos: UFSCar, 2009.

OLIVERO-VERBEL, J.; GONZÁLEZ-CERVERA, T.; GÜETTE-FERNANDEZ, J. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 568-574, 2010.

PABON, C. L.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, n. 4, p.875-879, 2010.

PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V.C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PARVEZ, S.; PARVEZ, M.; FUJII, Y.; GEMMA, H. Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. **Plant Growth Regulation**. v. 42, 245-252, 2004.

PASSOS, A, MARQUES, RAM G. et al, Pominance of *Aedes aegypti* Over *Aedes albopictus* in the south heastern coast of Brazil. **Journol of Public Health**. v. 37, nº 6, p. 720 – 730, 2003.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. v. 3, n. 4: p. 146-152, 2012.

PIMENTA, A. T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; ARRIAGA, A. M. C.; MENEZES, G. H. A.; BEZERRA, S. B. Estudo Fotoquímico e Avaliação da Atividade Larvicida de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.501-505, 2006.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008480>).

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.352-360, 2005

RIBEIRO, R. A.; CARMO, L. G.; VLADIMOROVA, I. et al. Nantenine blocks muscle contraction and Ca<sup>2+</sup> transient induced by noradrenaline and K<sup>+</sup> in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology**. v.470, p.37-43, 2003.

RICE, E.L. Allelopathy. New York, Academic Press, 1974.

RINALDO, D.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO ARMS, RIZVI, S. J. N.; RIZVI, V. Allelopathy: basic and applied aspects. London: Chapman & Hall, p. 480, 1992.

RINALDO, D. ; MARCELO, A. S.; CLENILSON, M. R.; TAMARA, R. C.; MIRIAM, S.; LOURDES, C. D S.; WAGNER, V.; HÉLIO, K.; CLÉLIA, A. HIRUMA-LIMA; ALBA, R. M. DE S. B. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. **Química Nova**. v.29, n.5, 2006.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras/MG: UFLA, 2001.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; ROBLOT, F.; FOURNET, A. ESPINDOLA, L. S. Larvicida activity of *Cybisstrax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**. v.76, p.755-757, 2005.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C. D; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Anal.** v.19, p.17-24, 2008.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v.1, p.43-50, 2001.

ROHWER, J. G. Lauraceae. The families and genera of vascular plants. Magnoliid, Hamameliid and Caryophyllid families. In: K. Kubitzki; J.G. Rohwer; V. Bittrich (eds.). Berlin, **Springer-Verlag**, v.2, p. 336-391, 1993a.

SAN EMETERIO, L.; DAMGAARD, C.; CANALS, R. M. Modelling the combined effect of chemical interference and resource competition on the individual growth of two herbaceous populations. **Plant and Soil**. v. 292, n. 1-2, p. 95-103, 14 fev 2007.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado ambiente e flora. Planaltina/DF: EMBRAPA-CAPC, 1998.

SANO, E. E; ROSA, R. R; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L.G. Semidetailed land use mapping in the Cerrado. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. v.43, p.153–156, 2008.

SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; BARRETO, E.O. et al. Anti-allergic properties of natural PAF antagonist yangambin. **Planta Medica**, v.63, p.207-212, 1997.

SILVA, H. H. G. et al. Estudo de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* L. (1762) (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, XVII. Anais, Rio de Janeiro: SEB, p.998, 1998.

SILVA, S. R; SILVA, A. P; MUNHOZ, C. B; SILVA, J. R. M. C; MEDEIROS, M. B. (Org.) **Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília/DF: WWF, 2001.

SILVA, F. M. Verificação da eficiência dos bioensaios com extratos aquosos no diagnostico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras. UFRS- Instituto de Biociências. Dissertação. Pós-graduação em Botânica, 2004.

SILVA, H. H. G.; IONIZETE, G. S.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; CARMECI, N. E. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v.37, p.396–399, 2004.

SILVA, G. B; MARTIM, L; DA SILVA, C. L; YOUNG, M. C. M; LADEIRA, A. M. P. Allelopathic potential of Cerrado native arboreous species. **Hoehnea**. v.33, p.331-338, 2006.

SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**. v. 22, p. 1307-1310, 2008.

SILVEIRA, L. M. S.; MORAES, D. C.; OLEA, R. S. G.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C.; MORAES, L.S. Atividade antibacteriana de duas espécies vegetais do gênero *Ocotea*. **Revista Florence**. n.1, 2011.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-Atividade larvicida de *Myroxlom Balsamum* (Óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Revista Química Nova**. v.27, p.46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, p.1102, 2007.

SINGH, S. P; BATISH, D. R; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K.  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annal of Botany**. v. 98, 1261-1269, 2006.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. (Dilleniaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.15, p.352-360, 2005.

SCHIAVINI, I.; ARAÚJO, G. M. Considerações sobre a vegetação de Reserva Ecológica do Panga (Uberlândia). **Sociedade & Natureza** 1: 61-66, 1989.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, I. A.; JERMY, T. Insect-plant biology; from physiology to evolution. Chasman & Hall, London, 1998.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, I. A.; DICKE, M. Insect-plant Biology. Second Edition, Oxford, p.421, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 319, 2009.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P.; KATONOGUCHI, H. Allelopathic activities of *Jasminum officinale* f. var. *grandiflorum* (Linn.) Kob.: Inhibition effects on germination, seed imbibition, and  $\alpha$ -amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 7850-7854, 2012.

TEIXEIRA, Dulcinéia Furtado. Estudo químico e avaliação biológica de *Atalea excelsa* Mart. Ex SPRENG (urucuri) e *Pterodon emarginatus* vog (sucupira branca) em *Aedes aegypti*. Tese. Rio de Janeiro, UFRJ, p.124, 2003.

TEIXEIRA, M. G.; ANDRADE, A.; COSTA, M. C.; CASTRO, J.; OLIVEIRA, F.; VASCONCELOS, P. F. C.; Chikungunya outbreak in Brazil by African Genotype. *Emerg Infect Dis*. In Press, 2015.

VENDRAMIM, J. D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGANICA, 2. Campinas 1997, Campinas: Fundação Cargill, p.64-69, 1997.

VILEGAS, W. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. **Quimica Nova**. v.29, p.947–949, 2006.

XAVIER, V. M. Impactos de inseticidas botânicos sobre *Apis mellifera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidea), 2009, 47f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Mg, 2009.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. (1992 onwards) Version: 13<sup>th</sup> January, 2005.

WEIDENHAMER, J. D.; HARTNETT, D. C.; ROMEO, J. T. Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **Journal of Chemical Ecology**. v.26, p.613-524, 1989.

WERFF, H. Van der. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of Missouri Botanical Garden**. v.78, p.377-387, 1991.

WEIR, T. L.; BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. Intraespecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (-)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (aported knapweed). **Journal of Chemical Ecology**. v.29, p.2397-2411, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva WHO, 1997b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for laboratory and Field testing of mosquito larvicides. WHO/ CDS/ NTD/ WHOPES/ GCDPP, 2005.

WU, A.; YU, H.; GAO, S.; HUANG, C.; HE, W.; MIAO, S.; DONG, M. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. **Trees, Heidelberg**. v. 23, p.11-17, 2009.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. The first report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v.110, n.4, p.569-72, 2015.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S. E.; PAULUS, K. et al. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v.71, p.219-230, 2000a.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. v. 3, p. 1-7, 2008.



# CAPÍTULO 1

**Fitotoxicidade de extratos de *Davilla elliptica* St. Hill  
(DILLENiaceae) e *Ocotea pulchella* Nees & Mart.  
(Lauraceae) sobre espécies infestantes.**

Fitotoxicidade de extratos de *Davilla elliptica* St. Hill (DILLENACEAE) e *Ocotea pulchella* Nees & Mart. (LAURACEAE) sobre espécies infestantes.

## RESUMO

O Cerrado é o segundo domínio fitogeográfico mais diverso do Brasil. Contudo, apenas uma pequena fração das espécies vegetais tem sido estudada do ponto de vista fitoquímico e do potencial herbicida. Objetivou-se avaliar o potencial herbicida dos extratos brutos de *Ocotea pulchella* (Lauraceae) e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) sobre espécies infestantes. Os bioensaios de coleóptilos foram realizados utilizando os extratos hexânicos, diclorometânicos, acetosólicos, metanólicos e aquosos de folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica*, a 0,2; 0,4 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos mais ativos foram avaliados sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum* utilizando as doses de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos foliares de *O. pulchella* inibiram o crescimento de coleóptilos de trigo a germinação e o crescimento das plântulas das espécies daninhas. Para alguns extratos, esse efeito foi semelhante ou mesmo superior ao do herbicida comercial. Em geral, o extrato de acetato de etila apresentou maior atividade fitotóxica, com efeito dependente da concentração. *Panicum maximum* foi a espécie alvo mais afetada pelos extratos de folha de *O. pulchella* em todos os parâmetros avaliados. A redução no crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema submetidas ao extrato de acetato de etila. O extrato foliar da espécie *O. pulchella* apresentou potencial herbicida na germinação e no crescimento de espécies infestantes avaliadas.

**Palavras-chave:** Cerrado, extratos, fitotoxinas, plantas daninhas.

Phytotoxicity from extracts *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) and *Ocotea pulchella* Nees & Mart. (LAURACEAE) on weed species.

## ABSTRACT

Cerrado is phylogeographic dominance of great biodiversity in Brazil. It presents plants with potential to produce chemical compounds with different biological activities. Aimed to evaluate the potential of herbicide *Ocotea pulchella* (Lauraceae) and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) from extracts. Bioassays coleoptile were performed using extracts, dichlorometane, ethyl acetate, aqueous and methanolic leaf, stem and root from *O. pulchella* and *D. elliptica* 0.2, 0.5 and 0.8 mg.mL<sup>-1</sup>. Most active extracts were determined on the germination and initial growth of *Euphorbia heterophylla* and *Panicum maximum* using doses of 0.25, 0.5, 1 and 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Leaf extracts *O. pulchella* inhibit coleoptile growth of wheat and germination and seedling growth of weeds. For some extracts, this effect was similar or even higher than the commercial herbicide. In general, the ethyl acetate extract has higher phytotoxic activity, with the concentration dependent effect. The *Panicum maximum* was the target species most affected by the *O. pulchella* leaf extracts in all evaluated parameters. The reduction in root growth of wild poinsettia seedlings can be related to the decrease in the elongation of metaxylem cells submitted to the ethyl acetate extract. The species *O. pulchella* showed potential herbicide in germination and growth of weeds crop species.

**Keywords:** Cerrado, extracts, phytotoxin, weeds.

## 1.INTRODUÇÃO

As plantas infestantes de culturas agrícolas causam maiores prejuízos a agricultura do que as pragas e doenças juntas, e constituem a maior barreira para produção de alimentos (Miranda, 2003). Essas plantas competem por recursos, reduzindo a produção, e podem depositar uma quantidade elevada de sementes no solo, perpetuando o problema durante plantações futuras (Vyvyan, 2002). O principal método de controle das plantas invasoras é feito utilizando herbicidas de origem sintética (Hong et al., 2004). O uso excessivo desses produtos pode causar poluição do solo, da água, além de prejuízos a saúde humana. Além disso, tem submetido essas espécies a uma alta pressão de seleção, tornando-as, em algumas situações, resistentes a estes produtos químicos (Pinto et al., 2008).

Este fenômeno tem levado à busca de novas alternativas, menos agressivas ao meio ambiente, como é o caso dos aleloquímicos. Oriundos do metabolismo secundário vegetal, os aleloquímicos são substâncias que podem apresentar potencial fitotóxico sobre o desenvolvimento de plantas invasoras de agrossistemas (Neto Linhares, et al., 2014), além de apresentar ausência de moléculas halogenadas, ter meia-vida reduzida, serem solúveis em água e biodegradáveis (Duke et al., 2000).

Nos vegetais, esses compostos com propriedades aleloquímicas estão distribuídos em todos os tecidos, mas a concentração e as rotas pelos quais são liberados diferem entre as espécies (Tur et al., 2012). As folhas e as raízes são as principais fontes de compostos (Wu et al., 2009), contudo, a produção e concentração desses metabólitos estão relacionados as variações ambientais as quais estão submetidas. Quando absorvido pelas raízes das espécies alvo essas substâncias podem atuar sobre a divisão celular; o alongamento; permeabilidade das membranas; síntese de lipídeos; mecanismos desencadeados por hormônios; indução do crescimento; síntese proteica e na absorção de nutrientes entre outros fenômenos morfofisiológicos (Silva, 2012).

O Cerrado apresenta grande variedade de fitofisionomias e um grande número de espécies (Forzza et al., 2010). As espécies botânicas estão submetidas a condições ambientais adversas, tais como solo ácido com pouca disponibilidade de nutrientes, concentrações elevadas de alumínio e altas temperaturas (Haridasan, 2000), além da ocorrência de queimadas, sendo considerado um fator determinante na densidade florística do Cerrado (Coutinho, 1981; 1992; Moreira, 2000; Oliveira et al., 2004). Tais

fatores ambientais regulam as taxas de produção dos aleloquímicos (Einhelling 1996; Gatti et al., 2004), sobretudo, os fatores relacionados ao estresse que podem aumentar a atividade biológica referente aos compostos com propriedades alelopáticas (Kong et al. 2002).

Apesar do aumento nas investigações sobre o potencial herbicida de plantas nativas nas últimas décadas o conhecimento atual, todavia, é considerado escasso. Os estudos com espécies oriundas do Cerrado têm demonstrado que extratos de diferentes partes vegetais apresentam atividade fitotóxica em pelo menos alguma fase do desenvolvimento de plantas alvos (Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2014).

A espécie *Davilla elliptica* pertence a família Dilleniaceae possui cerca de dez gêneros de ampla distribuição nos trópicos e subtropicais. No Cerrado, além da *D. elliptica* há várias outras espécies que pertencem a esse gênero (*D. bilobata*, *D. bahiana*, *D. kunthii*) (Soares et al., 2005; Gerardo; Aymard, 2007). Essa espécie possui diversas propriedades farmacológicas já conhecidas, por exemplo, adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético (Rodrigues; Carvalho, 2001), anti-inflamatório e antisséptico (Silva et al., 2001). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre seu potencial herbicida. Outra espécie do Cerrado de grande interesse é a *Ocotea pulchella* que pertence a família Lauraceae a qual possui espécies em praticamente todo mundo. No Brasil são encontradas 390 espécies. O gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros por sua ampla distribuição e abundância no território nacional e grande número de espécies com propriedades medicinais já relatadas, (Lorenzi, 2002), entre elas: antirreumáticas, purgativa, tônica, propriedades estomacais e contra abscessos (Camargo et al., 2013), além da atividade herbicida com efeito inibidor sobre a germinação, o crescimento e a concentração de clorofila (Borges et al., 1993; Carmo, 2002; Carmo et al., 2007).

Diante disso e dos impactos ambientais provocados pelo uso demasiado dos herbicidas comerciais, além dos danos econômicos oriundos da ocupação e do crescimento de plantas infestantes sobre espécies cultivadas, torna-se necessário mais estudos sobre o potencial alelopático de plantas nativas como alternativa na busca de fitotoxinas naturais, pois apresentam ação específica e menos prejudiciais ao meio ambiente (De Conti; Franco, 2011).

Dado a importância do Cerrado e das atividades biológicas mencionadas na literatura sobre as espécies doadoras, a seguinte hipótese foi lançada; fitotoxinas

presentes nos extratos de *D. elliptica* e *O. pulchella* apresentam potencial fitotóxico sobre o desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum*. Neste sentido, foram avaliados os efeitos dos extratos de folha, caule e raiz de *D. elliptica* e *O. pulchella*, em bioensaios com coleóptilos estiolados de trigo, germinação e crescimento de espécies infestantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira o efeito fitotóxico dos extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* Nees & Mart. e *Davilla elliptica* St. Hill foi avaliado em bioensaios de coleóptilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Duro). Os extratos mais fitotóxicos foram avaliados na segunda etapa, constituída pelos bioensaios de germinação e crescimento nas espécies invasoras de culturas como o amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* Linn: Euphorbiaceae), e capim-colônia (*Panicum maximum* Jacq: Poaceae).

### 2.1 Coleta e produção dos extratos

O material vegetal (folhas, caules e raízes) de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* foram coletados em Agosto 2012 (estação seca), na reserva de Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), Brasil. Exsicatas das espécies foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com os números de registro HUFSCar 8798 e HUFSCar 8799.

Após a coleta, os diferentes órgãos vegetais foram secos em estufa a 40°C por 72 horas e triturados a pó em moinho elétrico. 200 g de pó de cada material (folha, caule e raiz) foram extraídos utilizando 600 mL de cada solvente hexano (Hx), diclometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (Ac) e metanol (MeOH). As soluções foram submetidas a banho de ultrassom durante 30 minutos. Após filtragem a vácuo, o processo foi repetido. A solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida.

O extrato aquoso foi obtido utilizando 100 g do pó de cada material vegetal (folha, caule e raiz) de ambas as espécies que foram submetidos à extração em

diclorometano/metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ) (1:1) (AIBU et al., 2004). Em seguida, cada extrato bruto foi diluído em  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (95:5) e particionado com hexano, obtendo-se os extratos metanólicos e hexânicos de folha, caule e raiz. Os extratos metanólicos foram suspensos em água destilada e particionados com acetato de etila, dando origem aos extratos de acetato de etila e aquosos de folhas, caule e raízes de *O. pulchella* e *D. elliptica* (Otsuka, 2005). Nos ensaios de fitotoxicidade, utilizaram-se apenas os extratos aquosos de folha, caule e raiz das espécies doadoras obtidos da extração líquido-líquido.

## **2.2 .Bioensaios de fitotoxicidade.**

### **2.2.1.Bioensaios com Coleóptilos de trigo.**

As sementes de *Triticum aestivum* L., (cv. BRS 264) foram pré- germinadas em caixas gerbox forradas com papel filtro umidecidas com água destilada (10 mL) e introduzidas em câmara tipo B.O.D. durante 3 dias no escuro a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . As raízes e as cariopses foram removidas. Depois foram colocados em uma guilhotina de Van der Weij e a parte apical (2 mm) foi cortada e descartada (Hancock et al., 1964). Os próximos 4 mm dos coleóptilos foram cortados em segmentos de 4 mm e usados nos bioensaios (Macías et al., 2010). Todas as manipulações foram realizadas sob uma luz de segurança verde (Nitsch; Nitsch, 1956).

Os extratos foram pré-solubilizados em  $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), e diluídos em solução tampão (pH=5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% sacarose (Macías et al., 2010) nas concentrações de 0,8; 0,4; 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Dois controles foram realizados: um negativo com DMSO ( $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ) e solução tampão e um positivo com o herbicida comercial GOAL<sup>®</sup> (ingrediente ativo oxyfluorfen= 240 g/L).

Cada tratamento foi utilizado com três repetições. Cada repetição com cinco fragmentos de coleóptilos de trigo e 2 mL de cada solução em tubos de ensaios que foram tampados e mantidos em câmara de B.O.D., a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, sob rotação constante de 1.6 rpm por 24 h. Após esse período os coleóptilos foram removidos, fotografados e medidos utilizando o software Image-Pro-Plus<sup>®</sup>5.0 (Macías et al., 2010).

### 2.2.2. Bioensaios de germinação

Os extratos de folha de *O. pulchella* foram selecionados para avaliar sua fitotoxicidade sobre a germinação de sementes das espécies infestantes de culturas *E. heterophylla* (amendoim-bravo) e *P. maximum* (capim-colonião). As sementes foram acondicionadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de germinação, umedecidas com 5 mL de água destilada (controle), ou com os extratos nas concentrações (0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos. Cada tratamento recebeu 25 diásporos das espécies-alvo, com quatro repetições e, em seguida, foram tampadas, seladas com filme plástico e as placas de Petri foram mantidas em câmara de germinação a 25°C, sob fotoperíodo de 12 h/12 h luz/escuro para amendoim-bravo (Inoue et al., 2010) e com alternância de temperatura de 20-30°C e fotoperíodo de 16-8 h (Tomaz et al., 2010) para capim-colonião. Foram realizadas leituras a cada 12 h nos cinco primeiros dias e, em intervalos de 24 h, até a germinação ser nula por três dias consecutivos. Como critério de germinação foi adotado a protrusão de qualquer parte do embrião. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação, o tempo (TMG) e a velocidade média (VMG) das sementes germinadas (Ranal; Santana, 2006).

### 2.2.3. Bioensaios de crescimento.

Sementes das espécies-alvos foram colocadas para germinar em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de germinação umedecidas com água destilada. As placas foram mantidas em câmara de germinação a 25°C, sob fotoperíodo de 12 /12 h luz/escuro. Logo após atingir um comprimento da raiz de 2 mm, as sementes foram transferidas para caixas de plástico transparente (15 x 10 x 5 cm). Cada caixa continha duas folhas de papel de filtro umedecidas com 8 mL de cada extrato de folhas de *O. pulchella*, herbicida GOAL (controle positivo). Tanto o extrato quanto o herbicida foram solubilizados em DMSO (5 ul/mL) e diluídos em água para a obtenção das concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Utilizou-se um controle negativo com água destilada. Foram realizados quatro repetições contendo 10 plântulas cada, totalizando 40 indivíduos por tratamento. As caixas foram colocadas em sacos de plástico transparente e submetidas às mesmas condições de incubação citado pelo teste de germinação (Carvalho et al., 2001; Inoue et al., 2010; Tomaz et al.,



2010). Após sete dias, as plântulas foram removidas, fotografadas e os comprimentos da parte aérea (do colo ao meristema apical caulinar) e da raiz primária (do colo ao meristema apical radicular) foram medidos com auxílio do software Image-Pro-Plus<sup>®</sup>5.0. Na presença de plântulas com características anormais, essas foram fotografadas, caracterizadas e contabilizadas como descrito por RAS (2009).

#### **2.2.4. Bioensaio de anatomia em raízes de *Euphorbia heterophylla*.**

A anatomia interna das dicotiledôneas falicit a visualização em microscópico óptico das células do metaxilema em raiz, com base nisso, o teste de anatomia foi desenvolvido com amendoim-bravo. Com base no experimento de crescimento, as plântulas de amendoim-bravo foram submetidas às concentrações de 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato de acetato de etila (AcOEt) de folhas de *O. pulchella* e controle. O experimento para avaliar o comprimento de células de metaxilema foi conduzido sob as mesmas condições adotadas para o bioensaio de crescimento. Após cinco dias da instalação do experimento, as plântulas foram retiradas das caixas, com auxílio de um estilete, foi removido o segmento da raiz primária que foi imerso, imediatamente, em álcool 70% durante cinco dias. Após esse período, as raízes foram lavadas em água destilada e colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25%), em estufa a 60°C, durante 48 horas, período em que foi observada a clarificação do material. O método de coloração adotado foi de Fuchs com algumas modificações (Kraus; Arduin, 1997).

O material clarificado foi imerso em uma placa de petri (15 cm) contendo safranina (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>C<sub>1</sub>) e soda cáustica (NaOH a 10%), e mantidos em estufa, a 60°C, por 24 horas. Após o procedimento de coloração, o material foi lavado novamente e fixado em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico acoplado com câmera fotográfica. Para cada tratamento foram utilizadas cinco réplicas de raízes primárias crescidas nas diferentes concentrações do extrato AcOEt folha de *O. pulchella* e da solução controle. Com auxílio do microscópio, foi fotografado 50% do comprimento total de cada raiz considerando a região central em direção ao colo, em uma amplitude de 20 vezes (Gatti et al., 2010). As células do metaxilema, no total 10 por fotografia da raiz, foram medidas por meio do programa Image Pro-Plus 5.0.

### 2.3. Análises estatísticas

Inicialmente, os dados obtidos para cada bioensaio, considerando os parâmetros avaliados, foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando atendidas essas duas pressuposições, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ou Dunnett, a 0,05 de probabilidade. A ausência de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (comparações múltiplas) ou Mann-Whitney (comparação binária) seguido do teste de Dunn. Para os bioensaios de germinação e crescimento, quando o resultado da ANOVA foi significativo, procedeu-se à regressão linear ou quadrática. O ajuste do modelo foi testado a 0,05 de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Nos casos onde não foi possível o ajuste dos modelos ( $R^2 < 0,70\%$ ) ou quando os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, os valores foram apresentados em forma de tabela. Realizou-se uma análise conjunta dos dados de crescimento de coleótilos estiolados de trigo submetidos aos efeitos dos extratos de folhas, caules e raízes de *D. elliptica* e *O. pulchella*, uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (Pimentel-Gomes, 1990).

### 3. RESULTADOS

Foram obtidos dos extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* os rendimentos expressos na tabela 1.

As respostas fitotóxicas no crescimento de coleótilos de trigo, obtidos no presente estudo, mostraram variação significativa na atividade dos extratos dos diferentes órgãos de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica*. Os extratos de folha de *O. pulchella* extraídos com Hexano, DCM, AcOEt e acetona inibiram significativamente o crescimento dos coleótilos de trigo em relação ao controle negativo, sendo que desses os extratos de Hexano, DCM e AcOEt apresentaram resultados semelhantes ao herbicida. O extrato AcOEt de folha de *O. pulchella* produziu maior inibição no crescimento de coleótilos de aproximadamente 85% na concentração de  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 1).

Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos de 200g de pó de folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica* por meio da utilização de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O extrato aquoso foi obtido por partição líquido-líquido utilizando 100g de pó (Otsuka, 2005).

Extratos	Rendimentos (g)					
	<i>Ocotea pulchella</i>			<i>Davilla elliptica</i>		
	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz
Hexano	2,12	18,66	0,743	1,84	3,14	0,810
DCM	4,13	7,08	0,680	1,58	7,03	0,785
AcOEt	0,931	5,84	0,492	1,22	6,80	0,504
Acetona	0,614	0,338	0,667	1,85	7,40	0,707
MeOH	3,97	6,05	5,91	5,46	9,43	6,31
Aquoso	5,36	0,518	0,830	5,87	0,777	1,12

Os coleóptilos de trigo demonstraram maior suscetibilidade (>-80%) quando submetidas às concentrações dos extratos obtidos das folhas de *O. pulchella*. Tanto para *O. pulchella* quanto para *D. elliptica* o efeito no crescimento dos coleóptilos estiolados de trigo foi proporcional a dose quando submetidos aos extratos de folha AcOEt. Um acréscimo na concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> para 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> resultou aproximadamente em um aumento da atividade de inibição de -33% em *O. pulchella* e de -58% em *D. elliptica* (Figura 1).

O extrato de caule de *D. elliptica* extraído com MeOH a 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> reduziu o crescimento de coleóptilos de trigo em -60% (Figura 1).

Por meio da análise conjunta foi possível correlacionar atividade de inibição do crescimento de coleóptilos em função do tipo de extrato, do órgão vegetal e das espécies doadoras. Os menores valores de comprimentos foram observados quando os coleóptilos foram mantidos no extrato de AcOEt, seguido pelo extrato hexânico (Figura 2 A). Observou-se que o extrato metanólico exerceu menor atividade inibitória (Figura 2 A). O efeito no crescimento dos coleóptilos de trigo não diferiu significativamente quanto aos extratos da folha e do caule de *O. pulchella* e *D. elliptica*. Entretanto, foram verificadas diferenças no comprimento dos coleóptilos entre os extratos das raízes nas espécies doadoras (Figura 2 B). Em geral, os extratos de *O. pulchella* provocaram maior atividade fitotóxica no crescimento de coleóptilos

estiolados de trigo em relação aos extratos de *D. elliptica* (Figura 2 C). Os extratos de folha de *O. pulchella* foram selecionados para avaliar a fitotoxicidade na germinação e no crescimento de espécies infestantes.

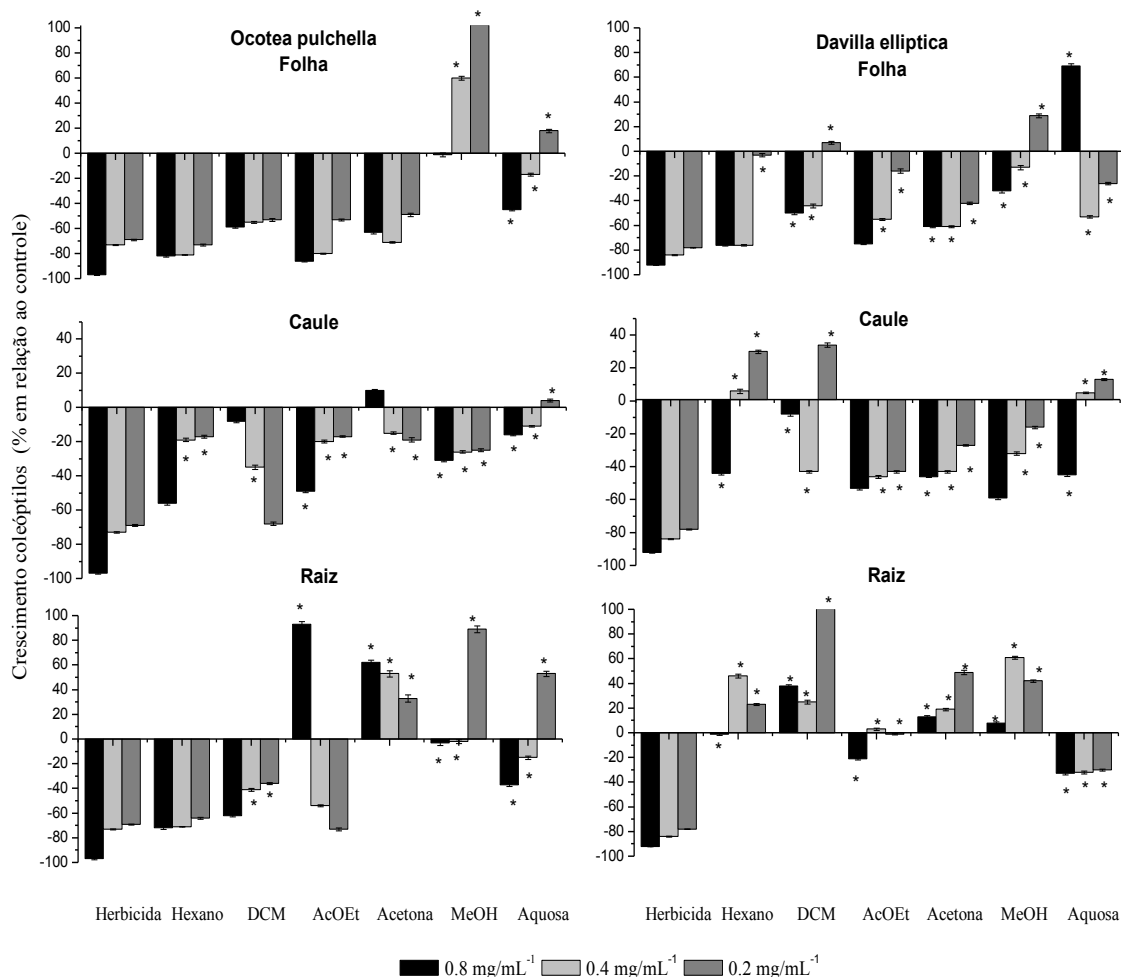


Figura 1. Efeito dos extratos brutos obtidos a partir da folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica* e do herbicida GOAL® sobre o crescimento de coleótipos de trigo. Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância.

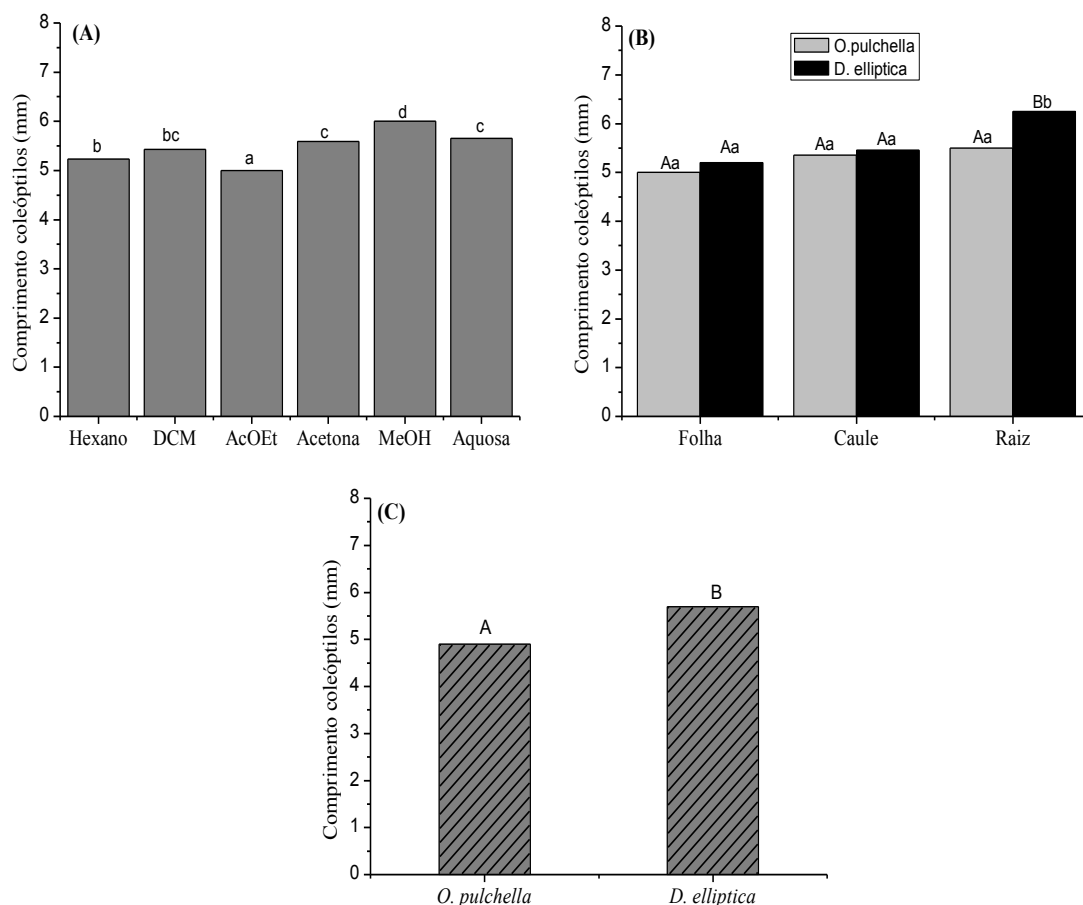


Figura 2. Análise conjunta do comprimento de coleótilos estiolados de trigo (*Triticum aestivum* L.), sob a ação dos extratos de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica*. Relação de atividade entre os diferentes extratos (A), entre os diferentes órgãos vegetais (B) e entre as espécies (C). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas comparam as espécies e minúsculas para extratos, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade.

Os resultados obtidos no bioensaio de germinação evidenciaram a atividade do extrato foliar acetônico de *O. pulchella* sobre a porcentagem de germinação de amendoim-bravo, houve um decréscimo linear na porcentagem de germinação de 10,6% para cada 2 mg. mL<sup>-1</sup> adicionado (Figura 3). As sementes de capim-colonião tiveram a porcentagem de germinação inibida pelos extratos foliares hexano (Tabela 3), AcOEt e aquoso na dose de 2 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 3). Os demais extratos foliares de *O. pulchella* não inibiram significativamente a porcentagem de germinação das sementes avaliadas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Germinação de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de *Ocotea pulchella*, em diferentes concentrações.

Variáveis (Unidades)	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )					Estatística F(p)
	0	0.25	0.5	1	2	
<b>Extrato hexânico</b>						
G(%)	52 ± 8.71 a	47 ± 12.44 a	39 ± 9.94 a	53 ± 5.91 a	47 ± 5.91 a	1.700(0.1888)
TMG (d)	1.49± 0.24 a	1.62± 0.17 ab	1.67± 0.22 ab	2.14± 0.68 b	1.81± 0.38 ab	<b>2.767(0.0557)</b>
VMG (d)	0.68±0.11 a	0.62± 0.06 ab	0.60± 0.08 ab	0.49± 0.14 b	0.57± 0.13 ab	<b>2.464(0.0583)</b>
<b>Extrato Diclorometânico</b>						
G(%)	52 ± 8.71 a	41 ± 7.68 a	37 ± 4.35 a	45 ± 10.72 a	44 ± 9.79 a	1.595(0.2136)
TMG (d)	1.49 ± 0.24 a	1.83 ± 0.19 a	1.55 ± 0.23 a	1.76 ± 0.28 a	1.80 ± 0.06 a	3.451(0.0552)
VMG (d)	0.68 ± 0.11 a	0.54 ± 0.05 b	0.65 ± 0.09 ab	0.57±0.09ab	0.55 ± 0.01 ab	<b>3.692(0.020)</b>
<b>Extrato de Acetato de etila</b>						
G(%)	52 ± 8.71 a	46 ± 11.48 a	55 ± 7.68 a	40 ± 17.20 a	41 ± 3.31 a	1.981(0.1357)
<b>Extrato Acetonico</b>						
TMG (d)	1.49 ± 0.24 a	1.59 ± 0.26 a	1.70 ± 0.09 a	1.70 ± 0.19 a	1.73 ± 0.35 a	1.157(0.3592)
VMG (d)	0.68 ± 0.11 a	0.64 ± 0.10 a	0.58 ± 0.03 a	0.59 ± 0.06 a	0.59 ± 0.13 a	1.261(0.3179)
<b>Extrato Metanólico</b>						
G(%)	52 ± 8.71 a	57 ± 3.31 a	45 ± 5.91 a	51 ± 11.09 a	43 ± 5.91 a	2.696(0.0597)
TMG (d)	1.49 ± 0.24 a	1.67 ± 0.24 ab	1.78 ± 0.24 ab	1.82 ± 0.1 ab	1.98 ± 0.15 b	<b>5.282(0.0045)</b>
<b>Extrato Aquoso</b>						
G(%)	52 ± 8.71 a	45 ± 5.03 a	48 ± 9.79 a	33 ± 22 a	45 ± 13.21 a	1.652(0.1997)

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G:germinabilidade;TMG: tempo médio de germinação; VMG: velocidade média de germinação; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações(ANOVA; P<0,05).

O tempo médio (TMG) e a velocidade média de germinação (VMG) foram os parâmetros mais afetados em pelo menos quatro extratos avaliados em sementes de amendoim-bravo e todos testados em capim-colonião (Tabelas 2 e 3). O TMG sofreu acréscimo significativo, em relação ao controle (1,49 dias), nas sementes de amendoim-bravo submetidas aos extratos de hexano na dose de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (2,14 dias) e de 2 mg.mL<sup>-1</sup> (1,98 dias) em MeOH (Tabela 2), e aumentou nos extratos de AcOEt e Aquoso, na concentração em 2 mg.mL<sup>-1</sup> para 2,2 e 2,1 dias, respectivamente (Figura 3). A VMG, inversamente proporcional ao TMG, em amendoim-bravo, também sofreu influencia dos extratos de hexano e DCM (Tabela 2), sobretudo, dos extratos de folha

AcOEt e MeOH de *O. pulchella*, já que reduziu em  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  a velocidade em 0,50 e 0,51 dias, respectivamente (Figura 3).

Tabela 3. Germinação de capim-colonião (*Panicum maximum*) submetidos á ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de *Ocotea pulchella*, em diferentes concentrações.

Variáveis (Unidades)	Concentrações ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )					Estatística F(p)
	0	0.25	0.5	1	2	
<b>Extrato hexânico</b>						
G(%)	$86 \pm 5.16 \text{ a}$	$77 \pm 6.83 \text{ ab}$	$77 \pm 8.86 \text{ ab}$	$88 \pm 3.26 \text{ a}$	$74 \pm 2.3 \text{ b}$	<b>7.599 (0.009)</b>
TMG (d)	$2.07 \pm 0.17 \text{ a}$	$2.39 \pm 0.22 \text{ ab}$	$2.46 \pm 0.25 \text{ b}$	$2.33 \pm 0.18 \text{ ab}$	$2.36 \pm 0.16 \text{ ab}$	<b>3.599 (0.022)</b>
VMG (d)	$0.48 \pm 0.04 \text{ a}$	$0.42 \pm 0.03 \text{ b}$	$0.40 \pm 0.04 \text{ b}$	$0.43 \pm 0.03 \text{ ab}$	$0.42 \pm 0.03 \text{ ab}$	<b>4.022 (0.014)</b>
<b>Extrato Diclorometano</b>						
G(%)	$86 \pm 5.16 \text{ a}$	$81 \pm 8.86 \text{ a}$	$85 \pm 8.86 \text{ a}$	$82 \pm 6.92 \text{ a}$	$75 \pm 3.82 \text{ a}$	2.527 (0.072)
TMG (d)	$2.07 \pm 0.17 \text{ a}$	$2.23 \pm 0.25 \text{ ab}$	$2.53 \pm 0.16 \text{ b}$	$2.29 \pm 0.18 \text{ ab}$	$2.33 \pm 0.13 \text{ ab}$	<b>5.137 (0.005)</b>
VMG (d)	$0.48 \pm 0.04 \text{ a}$	$0.45 \pm 0.05 \text{ ab}$	$0.39 \pm 0.02 \text{ b}$	$0.43 \pm 0.03 \text{ ab}$	$0.43 \pm 0.02 \text{ ab}$	<b>4.818 (0.006)</b>
<b>Extrato Acetonico</b>						
G(%)	$86 \pm 5.16 \text{ a}$	$77 \pm 13.2 \text{ ab}$	$85 \pm 8.24 \text{ a}$	$84 \pm 3.26 \text{ ab}$	$72 \pm 4.61 \text{ b}$	<b>4.059 (0.014)</b>
<b>Extrato Metanólico</b>						
G(%)	$86 \pm 5.16 \text{ a}$	$82 \pm 5.16 \text{ a}$	$83 \pm 3.82 \text{ a}$	$88 \pm 22.8 \text{ a}$	$73 \pm 8.86 \text{ a}$	1.658 (0.198)
TMG (d)	$2.07 \pm 0.17 \text{ a}$	$2.45 \pm 0.32 \text{ ab}$	$2.38 \pm 0.14 \text{ ab}$	$2.34 \pm 0.44 \text{ ab}$	$2.65 \pm 0.11 \text{ b}$	<b>3.917 (0.016)</b>
VMG (d)	$0.48 \pm 0.04 \text{ a}$	$0.41 \pm 0.05 \text{ ab}$	$0.42 \pm 0.02 \text{ ab}$	$0.43 \pm 0.07 \text{ ab}$	$0.37 \pm 0.01 \text{ b}$	<b>4.76 (0.007)</b>

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G: germinabilidade; TMG: tempo médio de germinação; VMG: velocidade média de germinação; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

As sementes de capim-colonião foram mais sensíveis aos extratos de folha de *O. pulchella* quanto ao TMG e a VMG (Tabela 3). A taxa de germinação foi pouco sensível aos extratos, exceto, nas sementes expostas as concentrações de AcOEt e aquosa que foram afetadas em todos os parâmetros avaliados do processo germinativo. Foi verificado decréscimo linear na germinação e na velocidade média de 6,8% e 0,1 dias, respectivamente para o extrato de AcOEt e uma redução 7,7% de sementes germinadas a cada  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  adicionado de extrato aquoso. Além disso, houve um acréscimo no tempo médio de germinação de 0,34 dias em AcOEt e de 0,27 dias nas sementes submetidas ao extrato aquoso (Figura 3).

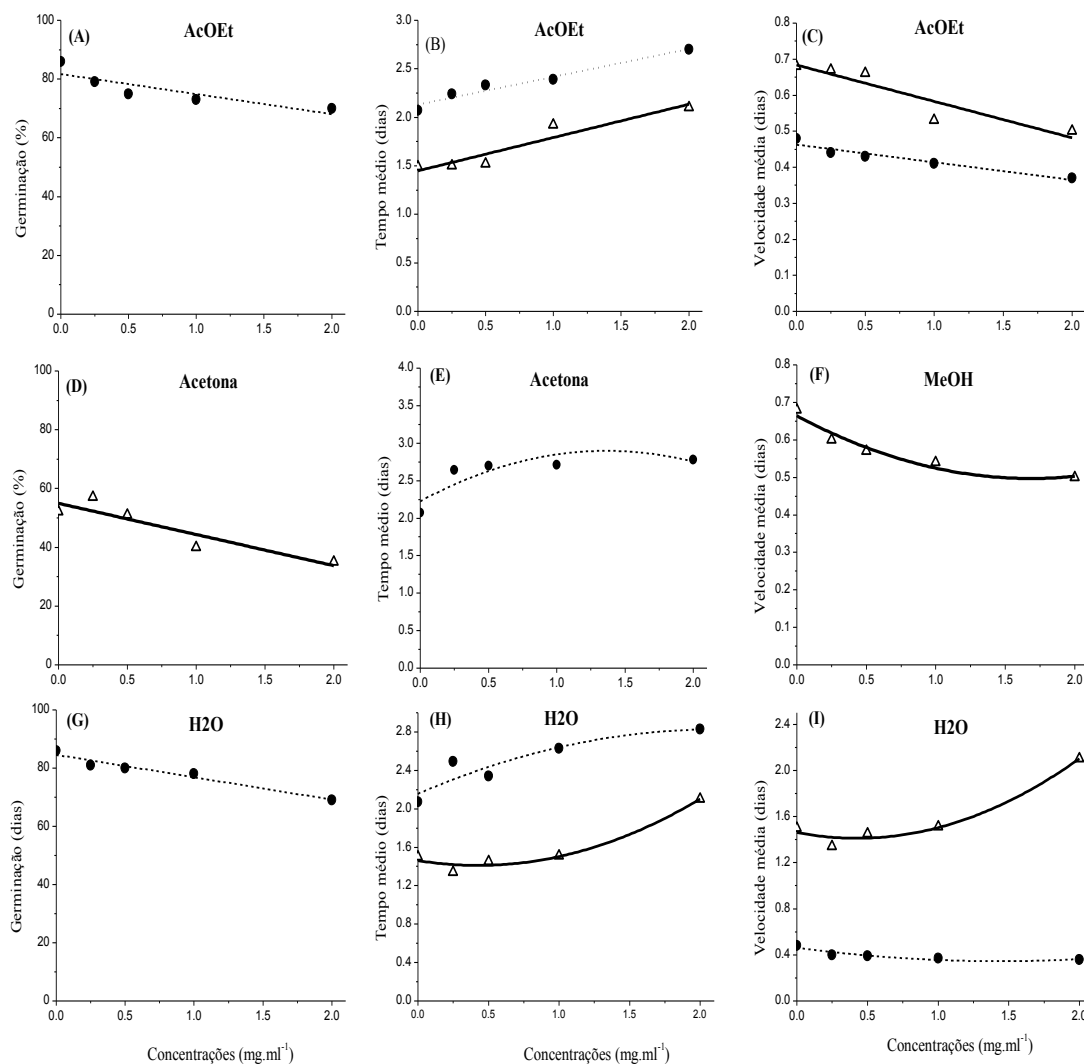


Figura 3. Germinação, tempo médio e velocidade média de sementes de amendoim-bravo ( $\Delta$ ;  $-y$ ) e capim-colonião ( $\bullet$ ;  $---y'$ ) submetidas ao efeito dos extratos de AcOEt (A); (B) e (C), de acetona (D) e (E), de MeOH (F) e aquoso (G); (H) e (I) de folhas de *O. pulchella*, em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A)  $y' = -6,8x + 81,7$ ,  $R^2 = 0,75$ ; (B)  $y = 0,287x + 2,1308$ ,  $R^2 = 0,95$ ;  $y' = 0,343x + 1,4488$ ,  $R^2 = 0,90$ ; (C)  $y = -0,101x + 0,6838$ ,  $R^2 = 0,86$ ;  $y' = -0,049x + 0,4628$ ,  $R^2 = 0,92$ ; (D)  $y = -10,6x + 54,95$ ,  $R^2 = 0,84$ ; (E)  $y' = -0,3609x^2 + 0,9863x + 2,2237$ ,  $R^2 = 0,74$ ; (F)  $y = 0,059x^2 - 0,1986x + 0,6643$ ,  $R^2 = 0,95$ ; (G)  $y' = -7,7x + 84,575$ ,  $R^2 = 0,95$ ; (H)  $y = -0,1495x^2 + 0,6333x + 2,1558$ ,  $R^2 = 0,84$ ;  $y' = 0,2791x^2 - 0,2377x + 1,4617$ ,  $R^2 = 0,97$ ; (I)  $y = 0,2791x^2 - 0,2377x + 1,4617$ ,  $R^2 = 0,97$ ;  $y' = 0,0568x^2 - 0,1631x + 0,462$ ,  $R^2 = 0,86$ .

O tempo médio de germinação em sementes de amendoim-bravo e capim-colonião submetidas aos extratos hexânico e metanólico não apresentaram ajuste linear ou quadrático (Tabela 2 e 3).

Por meio dos resultados, pode-se observar que os extratos de AcOEt e aquoso, não somente reduziu o número e a velocidade de sementes germinadas dias como



também induziu um aumento no tempo médio de germinação das espécies – alvo (Figura 3). O capim-colonião foi a espécie mais sensível aos tratamentos no bioensaio de germinação e o parâmetro mais afetado foi o tempo médio de sementes germinadas.

Os bioensaios de crescimento de plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião mostraram atividades variadas dos extratos de folha de *O. pulchella* sobre o desenvolvimento da parte aérea e raiz. O extrato de folha de *O. pulchella* AcOEt inibiu significativamente tanto o crescimento de parte aérea quanto de raízes das espécies avaliadas. O parâmetro mais afetado em plântulas de amendoim-bravo foi o crescimento de parte aérea com atividade de inibição entre 18 a 44% (Figura 4). Além disso, foi verificado efeito de dose-resposta, com o aumento da concentração ( $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  para  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), na presença dos extratos de DCM e AcOEt, em que foram verificados, respectivamente um aumento na inibição de 14% e 12%. O crescimento da radícula foi o parâmetro menos afetado em amendoim-bravo. Foi verificado atividade inibitória significativa, em relação ao herbicida comercial, apenas nas raízes submetidas às concentrações de AcOEt com atividade variando entre 10% e 29%, da menor para maior concentração (Figura 4).

Embora, os extratos foliares de *O. pulchella* exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de parte aérea em plântulas de capim-colonião os resultados obtidos não foram significativos em relação ao herbicida. Em capim-colonião, o crescimento da raiz foi o parâmetro mais susceptível aos extratos, sobretudo, na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com uma atividade inibitória superior a -75%, diferindo significativamente do herbicida comercial. As raízes submetidas aos extratos de AcOEt, acetona, MeOH e aquoso, na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , apresentaram atividade de inibição entre -39% a -75%. O aumento na concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  para  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , nas raízes submetidas aos extratos de AcOEt e acetona, exerceu um acréscimo de inibição de -5% para -61% e de -10% para -75%, respectivamente (Figura 4).

No bioensaio de crescimento, constatou-se que tanto as plântulas de amendoim-bravo quanto de capim-colonião foram susceptíveis aos extratos de folha de *O. pulchella* (Figura 4). O extrato de acetona exerceu maior efeito de inibição do crescimento sobre as raízes de capim-colonião. Foi verificado nas espécies receptoras submetidas às concentrações do extrato hexânico estímulo no crescimento da raiz (Figura 4).

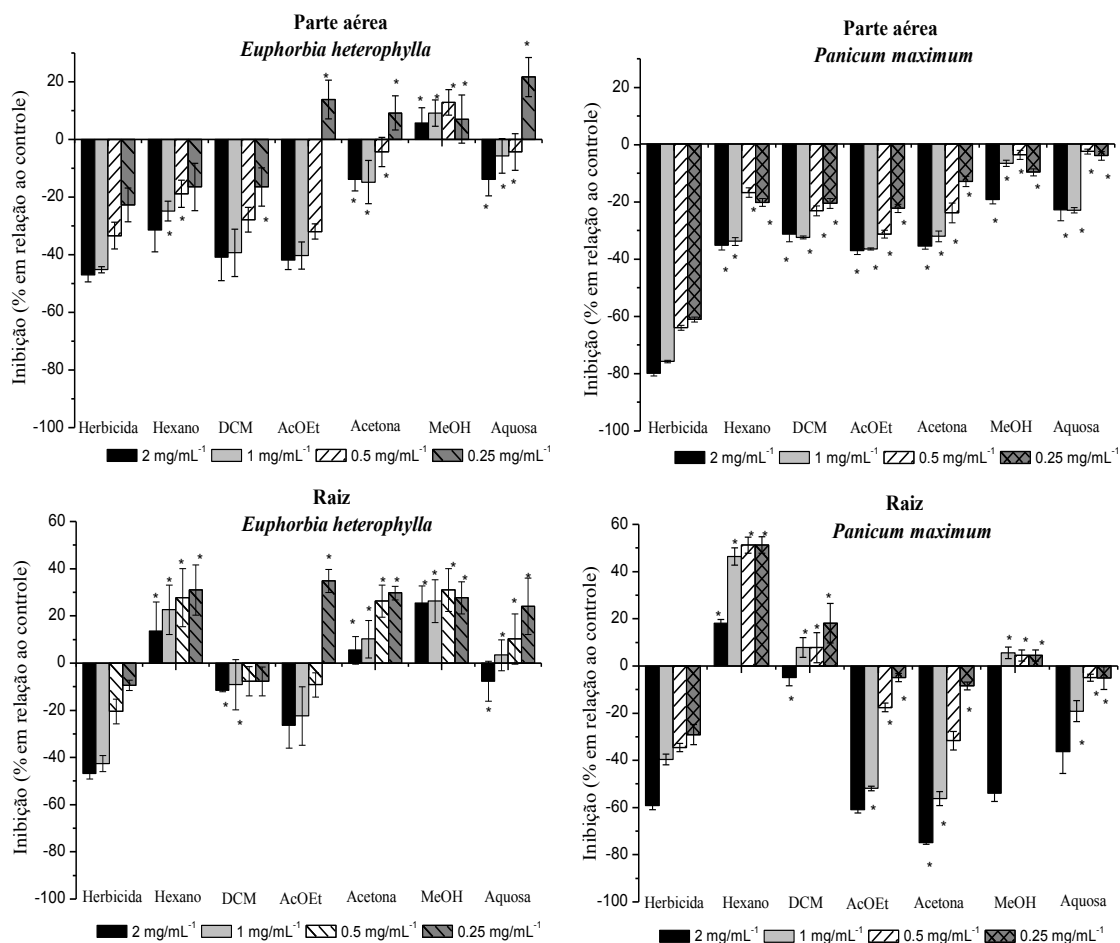


Figura 4. Efeito do herbicida Goal e dos extratos de folha de *Ocotea pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo) e *Panicum maximum* (capim-colonião). Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância.

No bioensaio de crescimento a porcentagem de plântulas anormais variou de acordo com o tipo de extrato, da concentração e da espécie receptora. Pode-se notar que o número de plântulas com algum tipo de anormalidade foi proporcional ao aumento da concentração, com maiores ocorrências de anormalidades a  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , para todos os extratos brutos. Os extratos de folha de AcOEt e aquosa produziram 100% de anormalidades em plântulas de amendoim-bravo a  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Mais de 50% das plântulas de amendoim-bravo submetidas aos extratos de folha extraídas com

DCM, AcOEt e acetona apresentaram algum tipo de anormalidade, a partir da concentração 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4).

Tabela 4. Percentagem de plântulas anormais de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-colonião (*P. maximum*) e tipos de anomalias identificados em cada concentração dos extratos foliares de *Ocotea pulchella*. Necrose (N), enrolamento do hipocótilo (EH), inversão gravitrópica (IG), raízes seminais pouco desenvolvidas (RF), raízes enroladas (RE), sem raiz principal (SR), sem raízes seminais laterais (sRS), atrofia (A).

<i>Euphorbia heterophylla</i>								
Anomalias (%)								
Extratos	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )				Anomalias			
	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
Hexano	60	60,6	62,5	62,5	RF;EH	N;sRS;EH	N;EH;SR	SR;sRS;EH
DCM	71,8	84,1	70,2	86,4	SR;N;EH	SR;N;EH	EH;sRS;N;RF	N;EH;SR
AcOEt	46,8	73,2	84,3	100	N;SR;EH;sRS	N;SR;EH	N;SR;EH;sRS	N;SR;EH
Acetona	57,5	55	72,7	94,5	EH;sRS	N;EH;RE;sRS	N;EH;sRS;RF	N;EH;RF
MeOH	49,9	60,6	71,4	78,1	EH;SR;RF;RE	RF;N;EH	RF;EH;N	RF;EH;N
Aquosa	45,5	65	69	100	SR;N;EH;RF	sRS;N;EH;RF	sRS;N;EH;IG	SR;N;EH;RF
<i>Panicum maximum</i>								
Hexano	-	-	5	85	-	-	RE	RE;RF
DCM	10	57,5	100	100	RE;RF	RE;RF	RE;RF	RE;RF;A
AcOEt	85	100	100	100	RE	RE	RE;A	RE;A
Acetona	35	100	100	100	RE	RE	RE;IG;A	RE;A
MeOH	22,5	82	100	100	RE;IG;RF	A;RE	RE;A;RF	RE;A;RF
Aquosa	12,5	75	97,5	100	RE	RE;A;IG	RE;A;IG	RE;A;IG

Capim-colonião foi a espécie alvo que apresentou a maior percentagem de anomalias, sendo verificada ausência de plântulas normais submetidas à ação dos extratos de AcOEt e acetona, a partir da concentração de 0,5, 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup> e de DCM e MeOH, a partir de 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. O extrato de folha de *O. pulchella* extraídas com AcOEt promoveu maior porcentagem de plântulas anormais, visto que a 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> foi verificado 85% de anormalidades (Tabela 4).

Foram verificados diferentes tipos de anormalidades, por exemplo; necrose na raiz e na parte aérea, enrolamento do hipocótilo, inversão gravitrópica, raízes seminais pouco desenvolvidas, raízes enroladas, ausência de raiz principal, sem raízes seminais laterais e atrofia. As plântulas de amendoim-bravo apresentaram o sistema radicular com maior porcentagem de danos quando crescidas em extratos de folha de *O. pulchella*, com 63,2% dos casos verificados no teste de crescimento. Necrose (N) das raízes em 29% das plântulas, raízes com baixo vigor (RF) 27%, enrolamento do hipocótilo (EH) 24% e ausência de raízes seminais (sRS) foram, em escala

decrecente, as anomalias mais frequentes. Hipocótilo retorcido e pequenos sinais de necrose no caule e/ou cotilédones foram os tipos de anomalias identificadas na parte aérea. Apenas um indivíduo apresentou inversão gravitrópica no bioteste com o amendoim-bravo (Figura 5).

No bioensaio de crescimento com capim-colonião foram verificados quatro tipos diferentes de anomalias. Assim como no teste utilizando amendoim-bravo, na maioria dos casos, os danos provocados pelos extratos de folha de *O. pulchella* também afetaram o sistema radicular, visto que 78% das plântulas apresentaram raízes retorcidas, 9% raízes fracas e 6% inversão gravitrópica (Figura 5). Atrofia foi verificada em 7% dos casos.

Conforme os resultados do teste de crescimento, o extrato de folhas extraídas com AcOEt promoveu maior atividade inibitória. O estudo da anatomia das raízes de plântulas de amendoim-bravo permitiu visualizar um dos modos de ação desse extrato bruto a nível celular (Figura 7). No grupo controle o tamanho médio das células do metaxilema foi três vezes maior em relação ao tamanho verificado nas raízes submetidas a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os resultados dos tratamentos (extratos foliares  $0,5$ ,  $1$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), diferiram significativamente do controle. O efeito do extrato sobre o crescimento das células do metaxilema foi dependente da concentração. O menor comprimento dessas células ( $100 \mu\text{m}$ ) foi registrado na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 6).

As raízes de amendoim-bravo que cresceram na presença das diferentes concentrações do extrato de folhas extraídas com AcOEt de *O. pulchella* resultaram em reduções no tamanho médio das células do metaxilema, mais expressivas que as crescidas em água (controle). No controle teve predomínio para células pertencentes aos tamanhos entre  $354$  a  $607 \mu\text{m}$ , com maior número de observações (36%) com células de  $480 \mu\text{m}$  (Figuras 7).

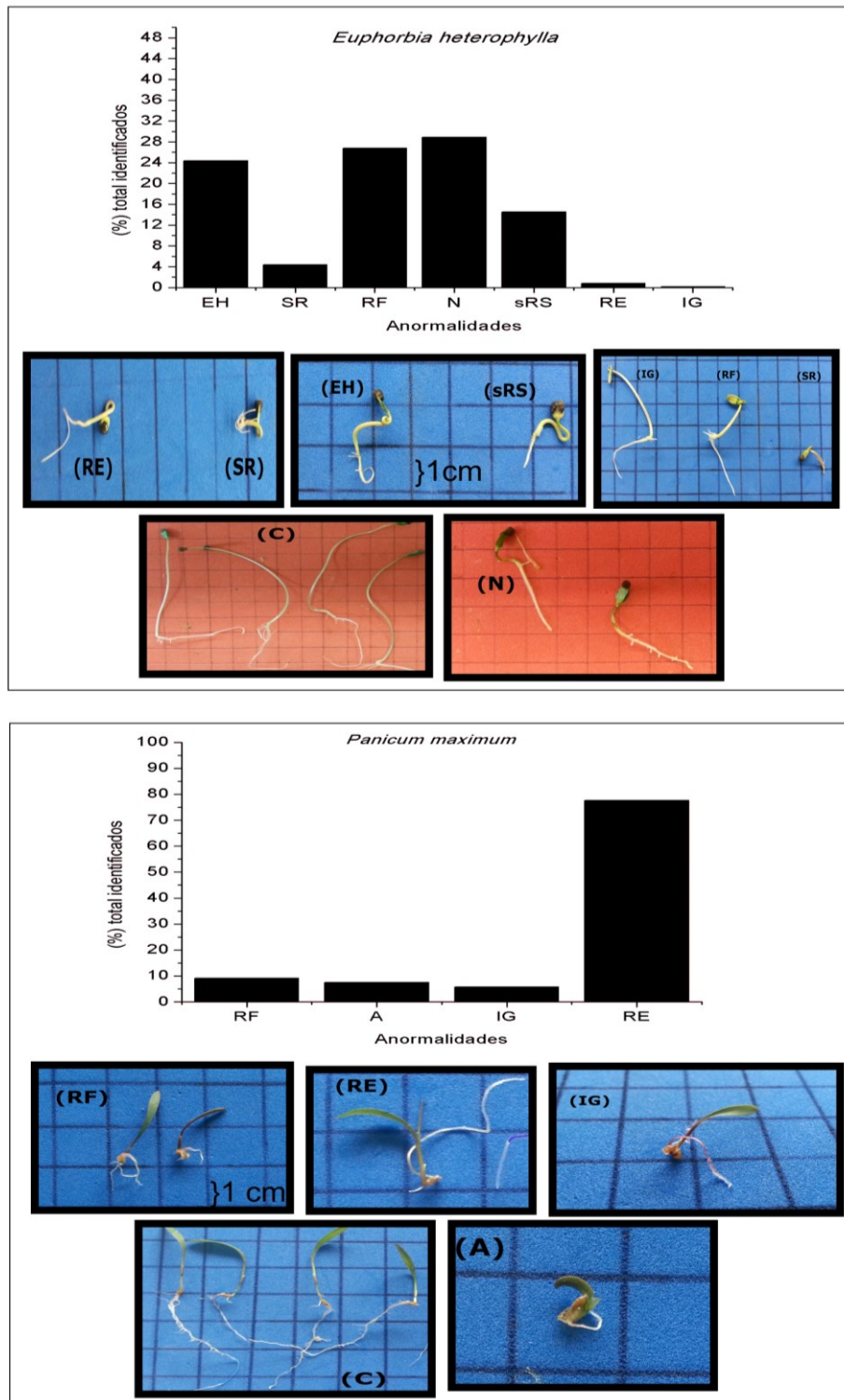


Figura 5. Percentagem total das anomalias identificadas em plântulas de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-colonião (*P. maximum*) crescidas em extratos foliares de *Ocotea pulchella*. Necrose (N), enrolamento do hipocótilo (EH), inversão gravitrópica (IG), raízes seminais pouco desenvolvidas (RF), raízes enroladas (RE), sem raiz pivotante (SR), sem raízes seminais laterais (sRS), atrofia (A), controle (C).

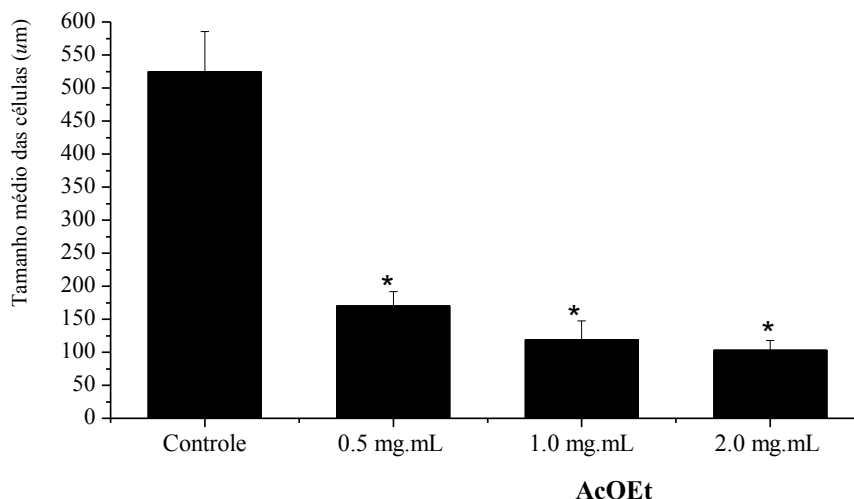


Figura 6. Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas em diferentes concentrações do extrato foliar de *O. pulchella* extraídas com AcOEt, e do controle (água). (\*) média difere significativamente do controle pelo teste de Dunnet, a 0,05 de probabilidade.

As plântulas que cresceram sob a influência do extrato foliar de AcOEt exibiram valores médios no tamanho das células bastante heterogêneo, sendo verificadas dimensões nas células relativamente pequenas e outras grandes. O tamanho médio das células da raiz submetidas a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram entre 106 a  $175 \mu\text{m}$  com predomínio 30% com tamanho ( $175 \mu\text{m}$ ). As células do metaxilema de amendoim-bravo que permaneceram nas concentrações de 1 e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , foram as menores, visto que na dose de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi observado maior frequência de células com tamanhos entre 74 a  $109 \mu\text{m}$  e na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  entre 55 a  $106 \mu\text{m}$ . Entretanto, o menor comprimento das células do metaxilema foi observado nas plântulas crescidas na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , uma vez que houve uma maior frequência absoluta com predomínio de células (32%) com  $74 \mu\text{m}$  (Figura 7).

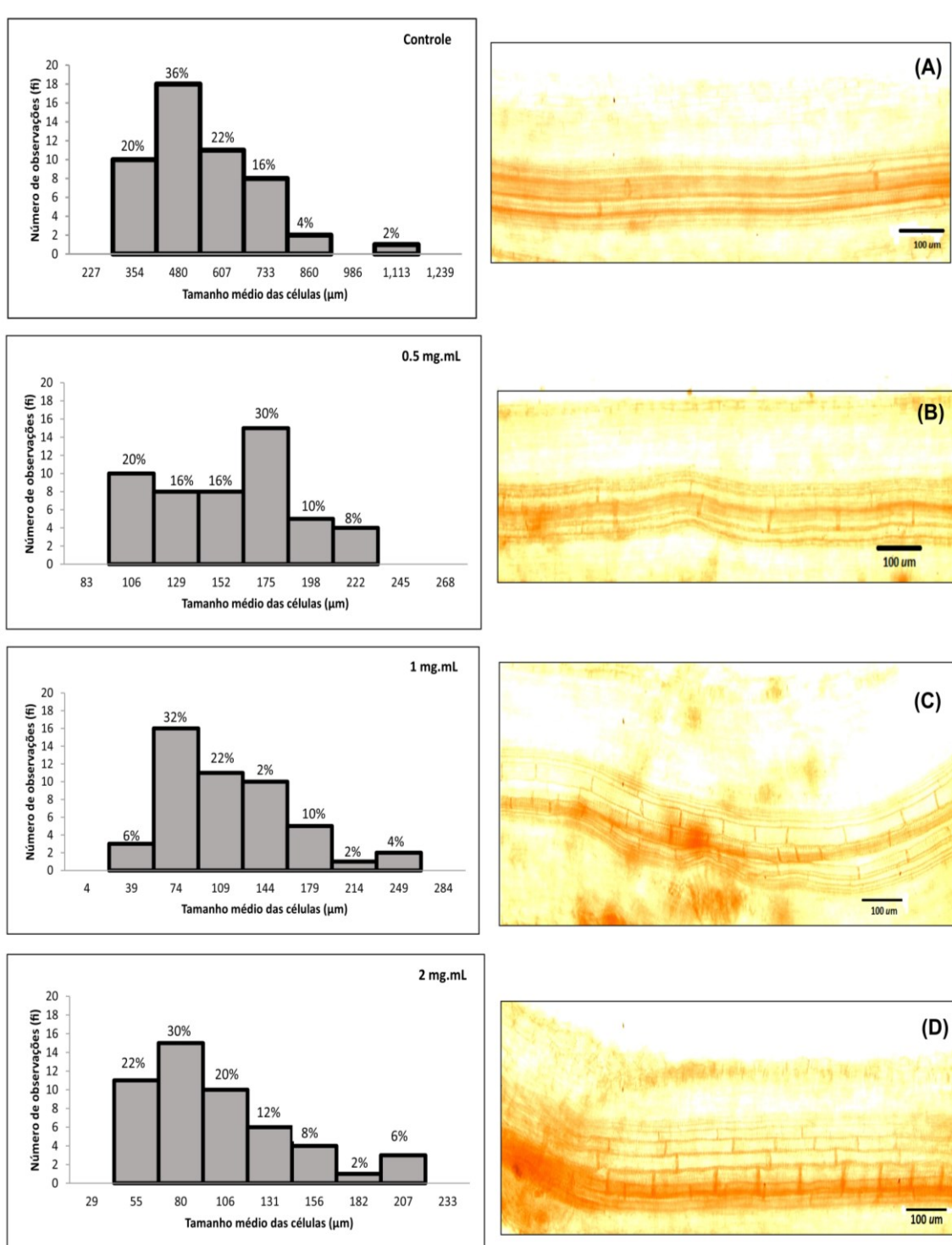


Figura 7. Histograma e fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas no controle (A), e na presença das concentrações de  $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (B),  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (C) e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (D), do extrato de AcOEt das folhas de *O. pulchella*. O comprimento de cada barra é a frequência absoluta (fi), (número de vezes em que uma determinada variável assume um valor). Sobre as colunas a frequência percentual de classe. Escala=100 µm.

#### 4. DISCUSSÃO

As plantas sintetizam um vasto número de metabólitos secundários, alguns com papel importante na interação das plantas com o meio ambiente onde podem atuar, entre outros, como aleloquímicos na interferência com outras plantas (Kroymann, 2011). No presente estudo foi verificado efeito fitotóxico dos aleloquímicos presentes nos extratos de folha, caule e raiz de *Davilla elliptica* e de *Ocotea pulchella*. Os extratos de folha de *O. pulchella* apresentaram maior atividade de inibição sobre o crescimento de coleótilos estioladas de trigo. Dessa forma, deu-se continuidade aos testes de fitotoxicidade utilizando os extratos de folha dessa espécie doadora. Embora, os aleloquímicos possam ser sintetizados em diferentes órgãos das plantas sua quantidade varia de um órgão para o outro (Weston; Duke, 2003; Parvez et al., 2004). Metabolicamente ativas, as folhas sintetizam inúmeras substâncias químicas, que atuam na defesa contra predadores e por esse e outros motivos concentram muitos metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (Novaes, 2011). Foi identificada a presença de óleos essenciais em folhas de diferentes espécies do gênero *Ocotea* (Araujo et al., 2001). Os principais constituintes dos óleos essenciais são os monoterpenos seguidos pelos sesquiterpenos, além de compostos aromáticos de baixo peso molecular (Langenhei, 1994). Muitos desses compostos interferem em vias metabólicas específicas ou em processos fisiológicos importantes de outros organismos (Harbone, 1988; Rhodes, 1994). A presença dessas substâncias nas folhas estar relacionada a funções ecológicas como proteção contra fungos e bactérias (Berenbaun; Zangerl, 1992; Lerdau e Penuelas, 1984).

As espécies botânicas estudadas (*Davilla elliptica* e *Ocotea pulchella*) foram coletadas no domínio Cerrado no qual as plantas estão submetidas, normalmente a condições adversas. Tais características interferem nas relações ecológicas entre as espécies vegetais e fatores abióticos, tornando-o um importante ambiente de estudos alelopáticos (Oliveira et al., 2004; Grisi et al., 2013). Folhas de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata*, coletadas durante a estação seca, condicionaram extratos com maior atividade alelopática (Novaes, 2011). O potencial alelopático de espécies do Cerrado é bem documentado na literatura (Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013; Grisi et al., 2013; Anese et al., 2014; Anese et al., 2015; Habermann et al., 2015; Pereira et al., 2015), em que várias espécies vegetais apresentaram atividade fitotóxica no desenvolvimento e crescimento de plantas alvos.



Em geral, o padrão menos afetado pelos extratos foliares de *O. pulchella* foi a porcentagem de germinação. Tal resultado corresponde aos registrados na literatura (Ferreira; Áquila, 2000;) que se refere como o parâmetro do desenvolvimento vegetal menos sensível aos aleloquímicos. Entretanto, no presente estudo os extratos de AcOEt e acetona inibiram a germinação de sementes de capim-colonião. Efeitos negativos na germinação resultam em desuniformidades nas espécies alvo, uma vez que os aleloquímicos podem ocasionar estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio atuando de forma direta ou como sinalizador nos processos de degradação celular e, conseqüentemente danos em processos fisiológicos e ao desenvolvimento inicial das plântulas (Almeida, 1988).

Por outro lado, a velocidade e o tempo médio de germinação foram os parâmetros mais alterados pelos extratos de folha de *O. pulchella*, já descrito na literatura (Periotto et al., 2004; Souza et al., 2010; Grisi et al., 2013) como variáveis mais afetadas. Segundo Ferreira e Borghetti (2004), quanto menor o valor de VMG, menor o vigor, pois quantifica o número de sementes germinadas por dia. No presente estudo os extratos atuaram, de maneira geral, diminuindo o vigor das sementes das espécies alvo, observando-se atraso na germinação. Outros trabalhos de pesquisa utilizando espécies do Cerrado observaram inibições mais significativas no tempo de germinação do que no número de sementes germinadas em diferentes espécies alvo (Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013; Costa et al., 2015). A velocidade e/ou tempo médio de germinação são indicadores mais sensíveis quando comparado ao percentual de germinação, por que refletem os efeitos dos aleloquímicos ao longo do processo de retomada do crescimento do embrião (Rizzardi et al., 2008; Costa et al., 2015).

O capim-colonião foi a espécie mais sensível aos tratamentos no bioensaio de germinação e o parâmetro mais afetado foi o tempo médio de sementes germinadas. O tempo médio de germinação é um fator importante na sobrevivência das espécies daninhas, uma vez que plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido, menor competição por recursos e, conseqüentemente menor competência para se estabelecer no ambiente (Souza et al., 2010). Além disso, a tolerância verificada por algumas espécies alvos submetidas a substâncias inibitórias depende de características fisiológicas, bioquímicas e evolutivas específicas para cada espécie (Hunter; Mangers, 2002; Kobayashi, 2004). Ademais, diferença na inibição da germinação verificada no presente estudo está relacionada com o tamanho das sementes das espécies alvo. Plantas infestantes com sementes grandes tendem a ser

menos sensíveis à ação de aleloquímicos, pois, podem evitar o efeito fitotóxico devido a uma menor absorção, translocação ou degradação mais rápida das fitotoxinas (Dayan et al., 2009). O amendoim-bravo apresenta sementes grandes em relação ao capim-colonião, e neste trabalho, foi menos sensível aos aleloquímicos presentes nos extratos de folha de *O. pulchella*.

Os extratos de folha de *O. pulchella* apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de parte aérea e de raízes das espécies daninhas avaliadas. Assim como nos bioensaios anteriores a tendência se manteve, o extrato de AcOEt foi mais ativo, dentre os analisados. No teste de crescimento com plântulas de amendoim-bravo a parte aérea foi a mais afetada pelos extratos, visto que a atividade inibitória dos extratos hexano, DCM e AcOEt foi semelhante ao do herbicida comercial. O herbicida Goal atua inibindo o transporte de elétrons, síntese de ATP além de alterar as membranas plasmáticas das células vegetais, entre outros fatores (Pereira; Walter, 1987). Em plântulas de capim-colonião submetidas aos extratos de folhas de *O. pulchella*, a raiz foi o órgão vegetal mais susceptível com inibição do crescimento significativamente semelhante ao controle positivo. A redução do tamanho das plântulas pode estar relacionada à menor absorção de água e de minerais pelas raízes, alteradas pela presença dos extratos foliares de *O. pulchella* que podem comprometer a membrana plasmática e, conseqüentemente a síntese de proteínas, a respiração e fotossíntese (Bogatek et al., 2005). A maior susceptibilidade da raiz observada no presente estudo, utilizando plântulas de capim-colonião, corrobora com outros trabalhos de pesquisa registrados na literatura (Grisi et al., 2013; Pereira et al., 2015) que embora tenham utilizado outras espécies alvo observaram o mesmo efeito dos extratos vegetais.

A redução do comprimento das raízes de amendoim-bravo, provocados pelos extratos foliares de AcOET estar associado com a diminuição do alongamento das células do metaxilema verificados no presente trabalho. Segundo Gatti et al. (2010), a provável interferência dos compostos com atividade alelopáticas sobre o tamanho das células, entre outros, estar relacionado com alterações na concentração de fitormônios responsáveis pelo crescimento.

Embora, os extratos de hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e aquoso apresentem a mesma origem; folhas de *O. pulchella*, não apresentam a mesma composição química e proporção, uma vez que foi verificado efeito positivo dos extratos de hexano, acetona, metanol e aquoso no crescimento da raiz primária de

plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião, sobretudo nas raízes submetidas ao extrato hexano, com estímulo do crescimento radicular de plântulas de capim-colonião. Alguns metabolitos secundários atuam como hormônio de crescimento provocando aumento no comprimento da parte aérea e da raiz (Oliveira et al., 2014). Isso pode ser explicado considerando que um dado composto químico pode exercer tanto efeito inibitório quanto estimulante, sendo também dependente da concentração do mesmo no ambiente (Goldfarb et al., 2009).

O feito crônico dos extratos vegetais avaliados no presente estudo, sobre as plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião, foi caracterizado por alterações morfológicas presentes tanto na parte aérea quanto na raiz, sobretudo quando presentes na maior concentração dos produtos. De acordo com outros autores a atividade fitotóxica acentua com o aumento da concentração dos extratos, em uma relação de dose-resposta (Borella et al., 2012; Mendes et al., 2013; Borella et al., 2014). Foi interessante observar que alguns extratos não exerceram atividades inibitórias sobre o crescimento da parte aérea e da raiz, mas foram capazes de provocar alterações morfológicas possíveis de comprometer a capacidade das plântulas de se estabelecer no ambiente. Em todos os aspectos avaliados o capim-colonião mostrou ser mais sensível aos produtos extraídos das folhas de *O. pulchella*, logo apresentou maior percentagem de plântulas com algum tipo de anormalidade. Dependendo das características fisiológicas e bioquímicas, as espécies alvo respondem de formas diferentes aos produtos de origem vegetal, revelando distintos graus de sensibilidade às substâncias fitotóxicas (Kobayashi, 2004).

O maior número de anomalias foi verificado no sistema radicular das espécies infestantes, sendo a parte mais sensível ao efeito direto dos extratos. A susceptibilidade do sistema radicular deve-se ao seu contato direto e prolongado com os extratos (Correia et al., 2005). No hipocótilo há uma camada de cutícula protetora ausentes nas raízes primárias que, por esse motivo, apresentam maior permeabilidade às fitotoxinas, resultando em uma maior penetração dos compostos no tecido radicular (Yoshimura et al., 2011). Quando em contato com as raízes, os aleloquímicos podem afetar diretamente o seu crescimento ou provocar modificações morfológicas (Teerarak et al., 2012).

Em suma, os extratos de folhas de *O. pulchella*, sobretudo os extraídos com AcOEt foram os que provocaram maiores alterações na germinação e no crescimento das plântulas das espécies infestantes avaliadas. Estudos fitoquímicos de espécies do

gênero *Ocotea* registraram a presença de constituintes químicos da classe dos flavonóides, dos esteróides, dos triterpenos, das saponinas e dos taninos, além de óleos essenciais, com altos teores de safrol e de cânfora (Toledo, 2000). Os fenóis e os terpenos são compostos que estão mais envolvidos nos efeitos alelopáticos de inibição de metabolismo das plantas alvo (Indejit e Duke, 2003). Os compostos fenólicos estão implicados na inibição da germinação de sementes e no estabelecimento de plantas em comunidades vegetais (Carmo et al., 2007). A fitotoxicidade de espécies do gênero *Ocotea* foi relatado por Carmo et al. (2007), na redução da germinabilidade e no crescimento do sistema radicular da espécie *Sorghum bicolor* L. submetidos a extratos aquosos de *Ocotea odorífera*, além disso, Araujo (2012) testou extratos foliares de *Ocotea pulchella* e observou redução na velocidade de germinação e na porcentagem final de sementes *Lactuca sativa*, corroborando com os resultados aqui apresentados. Portanto, é necessário um estudo fitoquímico de *O. pulchella* para relacionar sua atividade fitotóxica com os aleloquímicos presente em suas folhas.

## 5.CONCLUSÕES

Os aleloquímicos presentes nos extratos de *Ocotea pulchella* exerceram atividade fitotóxica na germinação e no crescimento de *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum*.

Os extratos de *O. pulchella* promoveram maior efeito inibitório sobre o crescimento de coleótilos de trigo.

Os extratos de folha de *O. pulchella* inibiram a germinação e o crescimento das plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião, sendo a maior atividade constatada para o extrato de acetato de etila e acetônico.

O capim-colonião foi a espécie alvo mais afetada pelos extratos de folha de *O. pulchella* em todos os parâmetros avaliados.

A redução no crescimento radicular das plântulas de amendoim-bravo está relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema.

## 6. REFERENCIAS

AIBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinales* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrason Sonochem.** v.11, n.3-4, p.261-265, 2004.

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

ANESE, S.; GRISI, P. U.; JATOBÁ, L. J.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V. C.; GUALTIERI, S. C. J. Seasonal variation in phytotoxic of *Drymis brasiliensis* Miers. **Idesia.** v.32, n.3, p.109-116, 2014.

ANESE, S.; JATOBÁ, L. J.; GRISI, P. U.; GUALTIERI, S. C. J.; SANTOS, M. F. C.; BERLINCK, R.G.S. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drymis brasiliensis* Miers roots. **Industrial Crops and Products.** v.74, p. 28–35, 2015.

ARAÚJO, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.

BERENBAUM, M. R.; ZANGERL, B. Herbivores – Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. New York: Ed.Academic Press. p.415, 1992.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z. AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extratos aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Basilica.** v.26, n.2, p.415-420, 2012.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z. AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Desempenho de sementes e plântulas de rabanete sob a ação de extrato aquoso de folhas de *Trema micranta* (Ulmaceae). **Bioscience Journal.** v.30, n.1, p.108-116, 2014.

BOGATEK, R.; ORACZ, K.; GNIAZDOWSKA, A. Ethylene and ABA production in germinating seeds during allelopathy stress. Fourth World Congress in Allelopathy. 2005. Available at: [http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409\\_bogatekr.htm](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2409_bogatekr.htm). Access 30 jan 2013.

BORGES, E. E. L.; Lopes, E. S.; Silva, G. F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I - árvores. **Revista Árvore.** v.17, p.69-84, 1993.

CAMARGO, M. J. DE et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova.** v. 36, n.7, p.1008-1013, 2013.

CARMO, F. M. S. Substâncias alelopáticas de algumas espécies arbóreas nativas do município de Viçosa, MG, Brasil. Tese de Doutorado. UNESP. Rio Claro. SP, 2002.

CARMO, F. M. S.; LIMA, E. E.; BORGES; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta botanic Brazilian**. v.21, n.3, p.697-705, 2007.

CARVALHO, P. G. B.; BORGUETTI, F.; BUCKERIDGE, M. S.; MORHY, L.; FERREIRA FILHO, E. X. F. Temperature-dependent germination and endob-mannase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v.13, n.2, p.139-148, 2001.

CARMO, A. B.; VASCONCELOS, H. L.; ARAUJO, G. M. Estrutura da comunidade de plantas lenhosas em fragmentos de cerrado: relação com o tamanho do fragmento e seu nível de perturbação. **Revista Brasileira de Botânica**. v.34, p. 31-38, 2011.

CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influencia de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**.v.35, p.498-503, 2005.

COSTA, S. M. L.; FERREIRA, M. C.; PASIN, L. A. A. P. Avaliação do potencial alelopático de ingá sobre o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas. **Acta Iguazu**.v.4, n.1, p. 1-13, 2015.

COUTINHO, L. M. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado - Nota sobre ocorrência e a datação de carvões vegetais encontrados no interior de solo sob cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. v.4, p.115-117, 1981.

COUTINHO, L. M. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciência Hoje**. Volume especial, p.130-138, 1992.

DA SILVA, P. S. S., Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**. v.25, p.65-74, 2012.

DAYAN, F. E.; HOWELL, J. L.; WEIDENHAMER, J. D. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. **Journal of Experimental Botany**. v. 60, p. 2107-2117, 2009.

DE CONTI, D.; FRANCO, E.T. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* sw. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira Agrociência**. v.17, p.193-203, 2011.

DE MIRANDA, ROQUELINE RODRIGUES SILVA, Síntese e fitotoxicidade de novas p-benzoquinonas substituídas. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p.1-148, 2003.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; RAMAFNANI, J.G.; RIMADO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**.v.40, p.499-505, 2000.

EINHELLIG, F.A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**.v.88, p.886-893, 1996.

- 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, p. 323, 2004.
- FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, A. A. JR; PEIXOTO, A.L.;WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, JR.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, JR.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V.C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- GATTI, ANA BEATRIZ; PEREZ, SONIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI DE ANDRADE; LIMA, MARIA INÊS SALGUEIRO. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta botanic brasilian**. v.18, n.3, p.459-472, 2004.
- GATTI, A. B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN, M. PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta botânica brasilica**. v. 24, n. 2, p.454-461,2010.
- GERARDO, A. e AYMARD, C. Three new species of Davilla (Dilliniaceae) from Brazil. **Novon**. v.17, n.3, p.281-287, 2007.
- GOLDFARB, M; PIMENTEL, L.W; PIMENTEL, N.W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.3, p.23-28, 2009.
- GRISI, P. U., GUALTIERI, S.C.J., PEREIRA, C.V., FORIM, M. R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extracts on weed control. **Planta Daninha**. v.31, p. 239-248, 2013.
- HABERMANN, E.; PEREIRA, V.C.; IMATOMI, M.; PONTES, F. C.; GUALTIERI, S.C.J. Fitotoxicidade e fracionamento biodirigido dos extratos de cascas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O.Berg (Myrtaceae). **Biotemas**. v.28, n.1, p.37-44, 2015.
- HANCOCK, C.; BARLOW, H.; LACEY, H. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**. n.15, p. 166–176, 1964.
- HARBONE, J.B. Introduction to ecological biochemistry. 4a ed. Academic Press, London. 318 pp. 1988.
- HARIDASAN, M. Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, p.54-64, 2000.
- HONG, N. H.; XUAN, T. D.; EIJI, T.; KHANH, T. D. Paddy weed control by higher plants from Southeast Asia. **Crop Protection**. v.23, n.3, p.255-261, 2004.

HUNTER, M.E.; MENGERS, E.S. Allelopathic effects and root distribution of *Ceratiola ericoides* (Empetraceae) on seven rosemary scrub species. **American Journal Botany**. v. 89, p.1113-1118, 2002.

INDERJIT & DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217: 529-539, 2003.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**. v. 28, p. 735-741, 2010.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta botânica brasileira**. v. 27, n. 1, p.54-61, 2013.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**. v. 4, p. 1-7, 2004.

KONG, C; HU, F.; XU, X. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Ageratum conyzoides* under stress. **Journal of Chemical Ecology**. v.28, n.6, p.1173-1182, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**. v.19, p.707-713, 2005.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropedica, EDUR, 1997.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 14, p. 246-251, 2011.

LANGENHEIM, J.H. Higher Plant Terpenoids: Phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**. v. 20. p. 1223-1280, 1994.

LERDAU, M. T.; PENUELAS, **Journal Mund. Cient**. v.13, p.60, 1984.

LINHARES NETO, MANOEL VIANA, SANTANA, FARLEY SILVA, MALHEIROS, RAFAEL SOARES POZZI, MACHADO, LUCIANA LUCAS, MAPELI, ANA MARIA. Avaliação alelopática de extratos etanólicos de *Copaifera sabulicola* sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, *Lycopersicum esculentum* e *Zea mays*. **Biotemas**. v.27, n.3, p.23-32, p.2175-7925, 2014.

LORENZI, H.; Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, 4ª ed.; Instituto Plantarum: São Paulo, v. 1, 143-144, 2002.



MACÍAS, F. A., LACRET, R., VARELA, R. M., NOGUEIRAS, C., MOLINILLO, J. M. G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal Chemical Ecology**. v.36, p.396–404, 2010.

MENDES, C. E.; CASARIN, F.; SPERENDIO, S. L.; MOURA, N. F.; DENARDIN, R.B.N. Avaliação do potencial fitotóxico de *Persea venosa* Nees & Mart.(Lauraceae) sobre sementes e plântulas de diferentes espécies cultivadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.3, p.337-346, 2013.

MOREIRA, A. G. Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. **Journal of Biogeography**. v.27, p.1021-1029, 2000.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the Growth of Coleoptile and First Internode Sections. A New, Sensitive, Straight-Growth Test for Auxins. **Plant Physiology**. v. 31, p.94-111, 1956.

NOVAES, P. Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellata*. 112 f. Tese (doutorado). Curso de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

NOVAES, Paula; MOLINILLO, José M. G.; VARELA, Rosa M.; MACÍAS, Francisco A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochem Rev**. v.12, p.839–855, 2013.

OLIVEIRA, R. S., L. BEZERRA, F. PINTO, C.A. KLINK, D.C. NEPSTAD, E.A. DAVIDSON & A.G. MOREIRA. No prelo. Deep root function in soil water dynamics in Cerrado savannas of central Brazil. *Functional Ecology*, 2003.

OLIVEIRA, SARAH C. CALDAS; FERREIRA, ALFREDO GUI; BORGHETTI, FABIAN. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta botanic brasilian**. v.18, n.3, p.401-406, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M; PEREIRA, K. C. L; MULLER, J. A. I; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**. v.32, p.41-47, 2014.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, editors. Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology. Humana Press; Estados Unidos. p. 269-273, 2005.

PARVEZ, S.; PARVEZ, M.; FUJII, Y.; GEMMA, H. Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. **Plant Growth Regulation**. v. 42, 245-252, 2004.

PEREIRA, W. S. P. Herbicida de pré-emergência – oxifluorfen. Série Técnica IPEF, Piracicaba, v.4, n.12, p.45 – 60, Set.1987.

PEREIRA, Viviane De Cassia, ANESE, Simoni, IMATOMI, Maristela, GRISI, Patrícia Umeda, MONTE CANEDO, Enzo, JULIANO GUALTIERI, Sonia Cristina,

RODRIGUES-FILHO, Edson. ALLELOPATHIC POTENTIAL OF *Serjania lethalis*: EVIDENCE FROM *Sesamum indicum*. **Acta biology Colombia**. v.20, n.1, p.31-37, 2015.

PERIOTTO, F.; PERES, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica**. v.18, n.3, p.425-430, 2004.

PIMENTEL-GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 477p

PINTO, J. J. O. et al. Controle de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**. v. 26, n. 4, p. 767-777, 2008.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**. v. 29, p. 1-11, 2006.

Regras para análise de sementes (RAS). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; p. 399, 2009.

RIZZARDI, M. A.; NEVES, R.; LAMB, T. D.; JOHANN, L. B. Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) na supressão de picão preto (*Bidens sp.*) e soja. **Revista Brasileira Agrociência**, v.14, n.2, p. 239-248, 2008.

RODRIGUES, V. E. G, CARVALHO, D.A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras/MG: UFLA, 2001.

RHODES, M. J. C. "Physiological roles for secondary metabolites in plants: some process, many outstanding problems". **Plant Molecular Biology**. v.24, p.120. 1994.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA, J. R. M. C.; MEDEIROS, M. B (Org.). Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Brasília/DF: WWF, 2001.

SOUZA, F. M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S. C. J. G. A.; RODRIGUES, R. R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae), **Acta Botânica Basílica**. v.24, p.169-174,2010.

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. **Plantas Daninhas**, v.28, n.3, p.689-697, 2010.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K.G.L.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil.(Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.352-360, 2005.

TEERARAK, M.; CHAROENNYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Physiological and cellular mechanism of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour on bioassay plants. **Acta Physiological Plantarium**, v.34, p.1277-1285, 2012.

TOLEDO, M. G. T. Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2000.

TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L. C.; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim-tanzânia. **Revista brasileira de Sementes**. v.32, p. 80-87, 2010.

TUR, CELIA MARIA; BORELLA, JUNIOR; PASTORINI, LINDAMIR HERNANDEZ. Alelopatia de extratos aquosos de cinamomo (*Melia azedarach* L.– Meliaceae) sobre a germinação e crescimento inicial do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. – Solanaceae). **Biotemas**. v.25, n.3, p.49-56, 2012.

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

YOSHIMURA, H.; SAWA, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal of chemical Ecology**. v.37, p.320-328, 2011.

WESTON L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 22, p.367-389, 2003.

WU, A.; YU, H.; GAO, S.; HUANG, C.; HE, W.; MIAO, S.; DONG, M. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. **Trees, Heidelberg**, v.23, p.11-17, 2009.

## CAPÍTULO 2

**Evaluation of the phytotoxic potential of leaf, stem and root extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart.**

Avaliação do potencial fitotóxico de extratos de folha, caule e raiz  
de *Ocotea pulchella* Nees & Mart.

## RESUMO

Apesar do aumento em pesquisas nas últimas décadas sobre o potencial herbicida de plantas nativas, o conhecimento atual, todavia, é considerado baixo. Poucos estudos revelaram o perfil químico e atividade biológica de espécies do Cerrado. No presente estudo foi avaliada a atividade fitotóxica de extratos de acetato de etila e metanol de folhas, caules e raízes de *Ocotea pulchella* Nees. Os extratos foram ensaiados em coleótilos estiolados de trigo. O extrato de folha de acetato de etilo foi o mais ativo e foi testado em espécies-alvo padrão (STS). As espécies *Lycopersicon esculentum* e *Lactuca sativa* foram as mais sensíveis. Um total de onze compostos foram isolados e caracterizados. Compostos dihidroxi-eudesma, hidroxieudesma, loliolida e ácido dimorfecólico não foram identificados anteriormente em *O. pulchella*. Ocoteol é descrito pela primeira vez na literatura. Oito compostos foram testados no crescimento de coleótilo de trigo, mas as maiores atividades foram exibidas pelo espatulenol, salicilato de benzilo e benzoato de benzilo. Estes compostos exibiram atividade inibitória sobre a espécie *L. esculentum*. Os valores obtidos correspondem à atividade exibida pelo extrato, portanto, estes compostos podem ser os responsáveis pela atividade fitotóxica evidenciada para *O. pulchella*.

**Palavras-chave:** Cerrado, bioensaios, fitoquímicos.

Evaluation of the phytotoxic potential of leaf, stem and root extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart.

## ABSTRACT

Despite the increase in recent decades in herbicide research on the potential of native plants, current knowledge is considered to be low. Very few studies have been carried out on the chemical profile or the biological activity of the Brazilian savanna (Cerrado) species'. In the study reported here the phytotoxic activity of ethyl acetate

and methanol extracts of leaves, stems and roots from *Ocotea pulchella* Nees was evaluated. The extracts were assayed on etiolated wheat coleoptiles. The ethyl acetate leaf extract was the most active and this was tested on standard target species' (STS). *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* were the most sensitive species' in this test. A total of eleven compounds have been isolated and characterized. Compounds 1, 2, 4 and 6 have not been identified previously from *O. pulchella*. Ocoteol (9) is described for the first time in the literature. Eight compounds were tested on wheat coleoptile growth and spathulenol, benzyl salicylate and benzyl benzoate showed the highest activities. These compounds showed inhibitory activity on *L. esculentum*. The values obtained correspond to the activity exhibited by the extract and these compounds may therefore be responsible for the phytotoxic activity shown by *O. pulchella*.

**Keywords:** Cerrado, bioassays, phytochemicals.

## 1.INTRODUCTION

The Cerrado (Brazilian savanna) is one of the most biodiverse vegetation formations in Brazil and it has experienced significant deforestation and fragmentation. The Cerrado must contain at least 12,000 higher plant species' but only a small fraction of these has been studied from the phytochemical viewpoint (Novaes et al., 2003). Allelochemicals arise from the secondary metabolism that operates in plant-plant interactions (Bethke et al., 2013). Furthermore, the distribution of these chemical compounds in plants is not uniform, either qualitatively or quantitatively, in space or time. Allelochemicals can be present in many parts of the plant, namely leaves, stems, roots, flowers, seeds and bark. Under appropriate environmental conditions these phytotoxins are released into the environment by volatilization, exudation from the roots, leaching from the aerial parts, and decomposition of plant remains. When these compounds are released into the environment they or their degradation products (Macias et al., 2014), affect the growth and development of natural or implanted biological communities, either negatively or positively. Thus,

these compounds can affect the development of neighboring plants, mainly in the germination and the growth of shoots and roots (Shimomura et al., 1987).

The knowledge of the main interactions between secondary compounds extracted from native plants and cultivated plants can be relevant in the management of weeds in agricultural ecosystems (Khan et al., 2011).

Weeds can be controlled using a combination of cultivation practices, such as sowing rates, mechanical weeding, crop rotation and the use of competitive crops (Mortensen et al., 2000). The use of synthetic herbicides is, however, the main method of weed control due to its high efficiency and practicality. Nevertheless, the intensive application of herbicides causes not only severe environmental damage but also the development of herbicide-resistant weed populations (Pinto et al., 2008). Several factors may cause or accelerate the development of weed resistance to synthetic herbicides and these include the biological features of the plants and the chemical properties of the herbicide. The continued use of the same herbicide or one with the same mode of action is the main factor in the selection of resistant varieties. New regulations have reduced the number of synthetic pesticides available in agriculture due to the potential impact that they have on human health and the environment (Dayan et al., 2009). Knowledge of the role of chemical compounds extracted from plants, and their negative effects on the development of weeds, is an alternative in the search for natural phytotoxins and synthetic derivatives to use as natural herbicides, since they have specific modes of action and are less damaging to the environment (Cantrell et al., 2012).

Lauraceae is a family with 55 genera and about 2500–3000 species' of mostly tropical trees. Worldwide, this family is of considerable economic importance because it is used as a source of wood for construction (*Nectandra*, *Ocotea*, *Persea* spp.), as a crop (*Persea americana*) and to obtain flavors for the food industry, perfumery and medicines (*Cinnamomum zeylanicum*, *C. cassia*) (Coutinho, 2007; Christoffoleti et al., 2008). The genus *Ocotea* (Lauraceae) is widely represented in the American Tropics with 300–400 species' and it is also present in Brazil with about 150 species' (Chaverri et al., 2011). The largest number of species' in the genus *Ocotea* have attracted the interest of Brazilian phytochemical researchers (Lorenzi, 2002). Some species' of this genus are used in popular medicine due to their anti-rheumatic, purgative and tonic properties and for the treatment of stomach disorders and abscesses (Camargo et al., 2013), amongst other uses. The Lauraceae family is known

to contain high levels of essential oils, which are mainly present in the leaves and have different reported biological activities (Chaverri et al., 2011). Other species' are considered to be aromatic and they are therefore used in perfumery and flavorings (Takaku et al., 2007). These oils have also shown herbicidal activity with inhibitory effects on germination, growth and chlorophyll concentration in the plant species' studied as targets (Borges et al., 1993).

Chemical studies carried out with species' of the genus *Ocotea* have often shown the presence of aporphine alkaloids (Lordello; Yoshida, 1997), lignans and neolignans (Ishige et al., 1991), tannins, steroids, triterpenes and phenylpropanoids (Andrei et al., 1988). In a phytochemical study on leaves of *O. pulchella* it was found that leucoanthocyanidins, glycosides, flavonoids, flavonols, steroids, triterpenes and anthocyanin and glycosides were present in addition to the potential larvicidal, cytotoxic and antioxidant properties (Montrucchio, 2012; Araujo, 2012). To date, several compounds have been isolated from this plant and various biological activities have been identified. Different extracts of this plant have also shown phytotoxic activity but the natural products responsible for the observed activity have not been identified.

The aim of the study described here was to determine the compounds responsible for the phytotoxic activity of *Ocotea pulchella*. In order to achieve this aim a bioassay-guided isolation was carried out to identify the plant part and the extract that were the most phytotoxic. The major components from this active extract were isolated, characterized and tested in appropriate bioassays to identify the metabolites responsible for the observed activity.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 General Experimental Procedures.**

Infrared (IR) spectra (KBr) were recorded on a Fourier transform infrared (FT-IR) Spectrum 1000 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on 600, 500 and 400 MHz spectrometers (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts are given in ppm with respect to residual  $^1\text{H}$  signals of  $\text{CHCl}_3-d_1$  ( $\delta$  7.25) and the  $^{13}\text{C}$  signals are referenced to the solvent signal ( $\delta$  77.00). Optical rotations were determined at room temperature on



a model 241 polarimeter (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) (on the sodium D line). HRMS were obtained on a Synapt G2 UPLC-QTOF ESI mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). HPLC was carried out on an HPLC chromatograph (Merck-Hitachi, Tokyo, Japan) with RI detection. Silica gel 0.060–0.200 60A from Acros Organics (Geel, Belgium) and Lichroprep RP 18 (40–63  $\mu\text{m}$ ) from Merck (Darmstadt, Germany) were used for column chromatography. Thin layer chromatography was carried out on TLC Silica gel 60 F254 aluminum sheets and TLC Silica gel 60 RP-18 F254S aluminum sheets from Merck. The columns used for HPLC were a semipreparative column (250 mm  $\times$  10 mm i.d., 10  $\mu\text{m}$  Lichrospher 100 RP-18, Merck, Darmstadt, Germany) with a guard column (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany) and an analytical column (250 mm  $\times$  4.5 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  Gemini 110A RP-18, Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a guard column (Security Guard Cartridges Gemini RP-18, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Ultrasound extractions were performed in an ultrasonic bath (360 W, J.P. Selecta, Barcelona, Spain) in two series of 15 min.

## 2.2 Chemicals.

Chloroform, *n*-hexane, methanol, dichloromethane, ethyl acetate and acetone (all Hipersolv Chromanorm for HPLC) were obtained from VWR International (Radnor, PA, USA). MagniSolv chloroform-*d*<sub>1</sub> (deuteration degree min. 99.8%) for NMR spectroscopy was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

## 2.3 Preparation of extracts and isolation of compounds.

*O. pulchella* (Lauraceae) leaves, stems and roots were collected in September 2013 (dry season) from the Brazilian (Cerrado) area on the campus of Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) in São Carlos-SP, Brazil (21°58' to 22°00' S and 47°51' to 47°52' W). A voucher specimen was filed in the herbarium of the Botany Department of the Federal University of São Carlos, with the number HUFSCar 8799. After collection the leaves, stems and roots were dried at 40 °C for 72 hours and ground in an industrial mill.

Dried material (60 g) was defatted with hexane by applying an ultrasoundassisted extraction. The following quantities of hexane extracts were

obtained: 1.7 g (leaves), 194 mg (stems) and 581 mg (roots). The material was subsequently dried (48 hours at 40 °C in an oven) and subdivided into small portions of leaf, stem and root powder. Ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) were used to extract defatted material and these extractions yielded the following amounts after removal of the solvent: leaves 3.39 g (EtOAc) and 3.16 g (MeOH); stems 1.1 g (EtOAc) and 2.1 g (MeOH); roots 1.1 g (EtOAc) and 1.08 g (MeOH). Chlorophyll was removed from leaf extracts using mixtures of H<sub>2</sub>O/MeOH and this treatment yielded four fractions: 20% methanol (Fr. A), 40% + 60% methanol (Fr. B), 80% methanol (Fr. C) and 100% methanol (Fr. D), ending with dichloromethane as eluent on an RP-18 chromatography column. These extracts (EtOAc and MeOH) from leaves (without chlorophyll), stems and roots were bioassayed on etiolated wheat coleoptiles. The ethyl acetate extract from the leaves was the most active and this was therefore studied in a phytotoxicity bioassay on target species’.

Bearing in mind that the EtOAc leaf extract was the most active, the remaining leaves (1.25 Kg) – previously defatted – were extracted with 10 L of EtOAc in portions of 15 g of plant material using an ultrasonic bath (2 × 500 ml). This process yielded 33.9 g of material. Chlorophyll was removed from the extract using the same H<sub>2</sub>O/MeOH mixtures as described above, and four (chlorophyll-free) fractions were obtained in decreasing order of polarity: A (5.7 g), B (1.2 g), C (1.0 g) and D (3.0 g).

*Fr. A* was chromatographed on C-18 reverse phase using H<sub>2</sub>O/acetonitrile/MeOH mixtures of increasing polarity from 0 to 100%, with an increase each time of 10% of MeOH and finishing with 1:1 acetonitrile/MeOH (500 ml). This process afforded three fractions: A1 to A3. The fraction A2 (2.1g) was pooled and subjected to column chromatography with CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O from 10% to 100% in methanol and 1% water, with a 10% increase each time and finishing with 100% MeOH (500 ml of each polarity) to give six subfractions (A2.1 to A2.6). Subfraction A2.1 (365 mg) was subjected to column chromatography under the same conditions as subfraction A2 to yield eight subfractions. The second subfraction (A2.2) yielded compound **7** (4.9 mg). Subfraction A2.6 was purified by HPLC (semipreparative column) eluting with H<sub>2</sub>O/acetone (50:50 v/v, flow 3 ml/min) to give compound **8** (1.2 mg).

Subfraction A3 (2.3 g) was subjected to column chromatography with CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O from 10% to 100% in methanol, with a 10% increase each mixture and finishing with 100% methanol (500 ml), with 1% water at all polarities, to afford

seven subfractions (A3.1 to A3.7). Subfraction A3.4 (54.5 mg) was purified by HPLC (semipreparative column) eluting with H<sub>2</sub>O/acetone (50:50 v/v, flow 3 ml/min) to give compounds **9** (3.1 mg), **7** (10 mg) and **8** (1.8 mg). Subfraction A3.6 (1.6 g) was subjected to column chromatography with CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O from 10% to 100% in methanol and 1% water, with a 10% increase each time and finishing with 100% MeOH (500 ml of each polarity) to give four subfractions (A3.6.1–A3.6.4). The spectroscopic data for subfraction A3.6.4 were consistent with a mixture of two anomeric sugars of D-xylopyranose (500 mg).

Frs. B and C were chromatographed with a hexane/EtOAc gradient from 0 to 100% EtOAc, with a 10% increase each time, and finishing with 100% MeOH (500 ml of each polarity) to afford various subfractions: (B) B1 to B7 and (C) C1 to C6. Subfractions B3 (15.5 mg) and B5 (32.1 mg) yielded compounds **1** (10.1 mg) and **4** (22.1 mg). Subfraction C1 (278 mg) was subjected to column chromatography with a hexane/acetone gradient from 0 to 100% in acetone, with a 10% increase each time and finishing with 100% MeOH (100 ml of each polarity), to afford five subfractions (C1.1 to C1.5). Subfraction C1.1 (237 mg) was purified by HPLC (semipreparative column) eluting with hexane/EtOAc (85:15 v/v, flow 3 ml/min) to obtain compounds **2** (2.7 mg), **3** (3.1 mg), **5** (16 mg), **10** (3.6 mg) and **11** (52 mg). Subfraction C5 (85.5 mg) yielded compound **6** (2.8 mg).

**Ocoteol (9):** yellow amorphous solid;  $[\alpha]_{D}^{25} -22.4$  (*c* 1.0, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (2.53), 225 (2.41) nm nm; IR  $\nu_{max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>; 3375, 2945, 1736, 1614, 1516, 1450, 813, 681; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> 600 MHz), see Table 1; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 125 MHz), see Table 1; negative-ion HREITOFMS *m/z* 433.1497 [M – H]<sup>+</sup> (calcd for [M – H]<sup>+</sup>, 433.1499).

## 2.4 Coleoptile Bioassay.

The extracts (EtOAc and MeOH) at concentrations of 0.8, 0.4 and 0.2 mg/ml were subjected to an etiolated wheat coleoptile bioassay. This test is widely used to evaluate the sensitivity of wheat to a wide range of bioactive substances (Hancock et al., 1964). *Triticum aestivum* L. cv. Hard seeds were pre-germinated in water for 3 days in the dark at 22 ± 1 °C, stored in Petri dishes (15 cm diameter) and covered with Whatman No. 1 filter paper containing around 100 seeds in a volume of 15 ml of deionized water. The roots and caryopses were removed from seedlings and the

coleoptiles were removed. The latter were placed in a Siles Guillotine and the apical 2 mm were cut off and discarded (Hancock et al., 1964). The next 4 mm of the coleoptiles were removed and used for bioassays (Macias et al., 2010). All manipulations were performed under a green safelight (Nitch; Nitch, 1956).

Crude extracts were dissolved in DMSO (0.1%) and diluted in phosphatecitrate buffer containing 2% sucrose at pH 5.6. Three control samples were used: buffer with DMSO; buffer alone; and an internal reference with Logran® herbicide (59% terbutryn and 0.6% triasulfuron). The commercial herbicide was used as an internal reference to allow comparison with a study reported previously (Macias et al., 2000).

The concentrations were 0.8, 0.4 and 0.2 mg/ml for extracts and  $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  and  $10^{-5}$  M for compounds. Three replicates were performed for each dilution. Each assay was carried out on five coleoptiles and 2 ml of extract, buffer or Logran®. The tubes were rotated at 6 rpm in a roller tube apparatus (Stuart Scientific) for 24 h at 25 °C in the dark. After 24 h the coleoptiles were removed and measured using Photomed software after digitalization of the images (Macias et al., 2010). Data were statistically analyzed using Welch's test (Martin; Luna, 1990) and are presented as percentage difference from the control.

## **2.5 Germination and growth bioassay.**

The bioassay was conducted in a Petri dish (50 mm diameter) on Whatman No. 1 paper as support. Germination and growth were conducted in aqueous solutions with pH controlled by using  $10^{-2}$  M 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid and 1 M NaOH (pH 6.0). The extracts were dissolved in DMSO and the resulting solutions were diluted with buffer (5 µL DMSO solution/ml buffer). Parallel controls were also run as described above for the coleoptile bioassay. The concentrations used were 0.8, 0.4 and 0.2 mg/ml for extracts, and  $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  and  $10^{-5}$  M for compounds. Samples were prepared and added to the seeds in a Petri dish, which was then covered with parafilm and incubated in the dark. Each treatment consisted of four replicates of 20 seeds per replicate (total of 80 seeds) and 1 ml of solution in each Petri dish.

The selected targets species' were based on the results of a previous phytotoxicity study (Martin e Luna, 1990). The standard target species' (STS) proposed included the dicotyledons tomato (*Lycopersicon esculentum* Will.), cress

(*Lepidium sativum* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.), and the monocotyledon onion (*Allium cepa* L.).

The Petri dishes were further incubated at 25 °C in a Memmert ICE 700 controlled environment growth chamber. The photoperiod was 24 h of dark for onion, tomato, cress and lettuce. Bioassays took 4 days for cress, 5 days for tomato, 6 days for lettuce and 7 days for onion. After the specified incubation period, the seeds from each Petri dish were stored at –10 °C for 24 hours to stop seedling growth prior to measurement. A commercial herbicide of known activity was used as a control, namely Logran® marketed by Syngenta.

## 2.6 Statistical analysis.

The data for germination rate, root length and shoot length were recorded using a Fitomed system (Castellano, 2002). Data were analyzed statistically using Welch's test, with significance fixed at 0.01 and 0.05. The results are presented as percentage differences from the control. Zero represents control, positive values represent stimulation and negative values represent inhibition. In order to achieve a more accurate analysis of the results it was necessary to calculate a series of statistical parameters. As a consequence, IC<sub>50</sub> values were calculated and cluster analysis was carried out. The IC<sub>50</sub> values were calculated using sigmoidal dose-response or dose-response variable slope models.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Dried leaves (60 g), stems (60 g) and roots (60 g) of *O. puchella*, defatted with hexane, were extracted with ethyl acetate and methanol. The weight percentages of the EtOAc extract from leaves, stems and roots were 5.7%, 1.8% and 1.8%, respectively, and in the MeOH extract they were 5.3%, 3.4% and 1.8%, respectively. Chlorophyll was removed from the leaf extracts. The extracts, at concentrations of 0.8, 0.4 and 0.2 mg ml<sup>-1</sup>, were subjected to an etiolated wheat coleoptile bioassay. This bioassay showed a higher inhibition by the ethyl acetate extract from leaves, with a value of nearly 60% at 0.8 mg ml<sup>-1</sup>, whereas the effects of stem and root extracts was of little significance when compared to that of the control. The methanol extracts from leaves,

stems and roots showed a level of inhibition lower than those of the EtOAc extracts, i.e., 20–40% at the highest concentration (0.8 mg ml<sup>-1</sup>) (Figure 1).

Differences in the activity between the leaf, stem and root extracts were observed in the present study are consistent with literature data in terms of the concentrations of allelochemicals in different plant parts (Monquero, 2014).

The differences in the activity profiles between the MeOH and EtOAc extracts suggest that the most active metabolites have a medium polarity. Moreover, the activity profile of the EtAOc leaf extract had a dose-response relationship in which an increase in the concentration from 0.2 mg ml<sup>-1</sup> to 0.8 mg ml<sup>-1</sup> resulted in an increase of about 40% in inhibition (Figure 1). Allelochemicals that typically have medium polarity belong to the group of alkaloids, flavonoids, phenols and terpenoids (Kim et al., 2005). As in the present study, Miranda et al. (2015), found greater inhibition in wheat coleoptiles exposed to EtOAc extracts. Therefore, the EtOAc leaf extract was evaluated in a subsequent phytotoxicity bioassay.

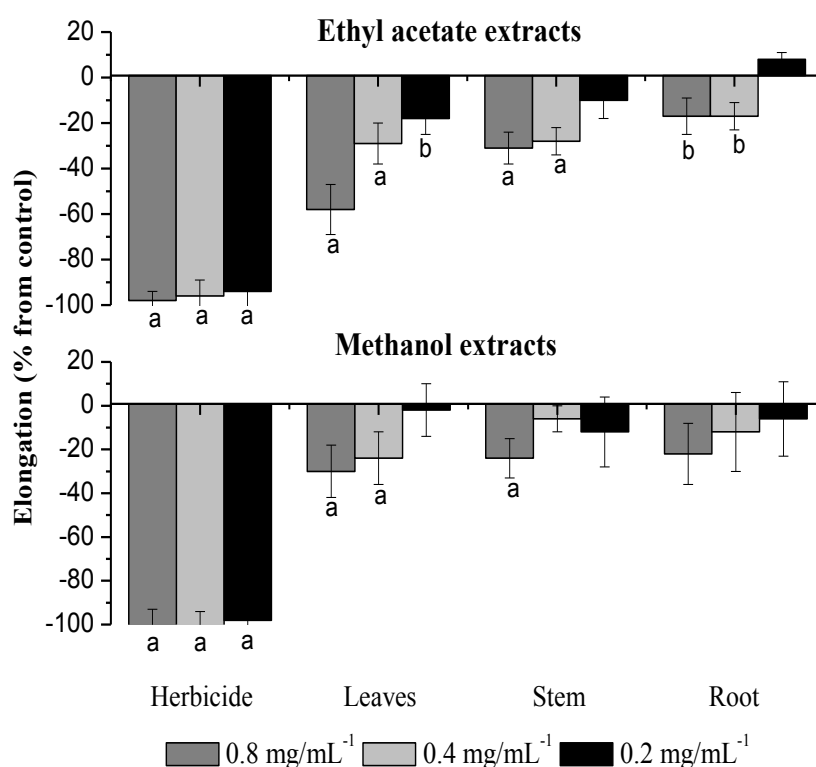


Figure 1. Effects of leaf, stem and root extracts from *Ocotea pulchella* and the herbicide Logran® on the elongation of etiolated wheat coleoptiles. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $p < 0.01$  (a) and  $0.01 < p < 0.05$  (b), according to Welch's test compared to control.

A phytotoxicity test on standard target species' (cress, onion, lettuce and tomato) was employed to assess the bioactivity of the EtOAc leaf extract from *O. pulchella* on the development of root, shoot and seed germination. The parameter that was most affected by the EtOAc leaf extract was root length, with inhibition values for *Lycopersicon esculentum* of around 65%. In addition, a dose-dependent inhibition was observed on the root tomato seedlings tested (Figure 2). The sensitivity of roots to allelochemicals can be explained by the fact that roots are the first parts of the plant to emerge and they are in direct contact with the extracts, which can be absorbed directly (Tanveer et al., 2012).

In the case of *Lactuca sativa*, the parameter that was most affected was the root growth, with an inhibition of 45% at the highest concentration (0.8 mg/ml<sup>-1</sup>). *L. esculentum* was the only species that was significantly affected in relation to the germination and development of root and stem upon exposure to the EtOAc extract (Figure 2). The observed differences in susceptibility between the target species' are consistent with the literature data. According to Ferreira and Aquila (2000), tolerance or resistance to allelochemicals may be specific and certain species' may have a greater sensitivity than others; for example, lettuce (*L. sativa* L.) and tomato (*L. esculentum* L.) are bioindicators of phytotoxic activity.

The herbicidal potential of the genus *Ocotea* has already been identified by other researchers. For example, Borges et al. (1993) found that aqueous extracts of *Ocotea odoriferous* significantly reduced the germination, root growth and chlorophyll content of *Sorghum bicolor* L. species'.

The EtOAc leaf extract was selected for further study. The remaining defatted material (33.9 g) was extracted with EtOAc and the chlorophyll was removed to give 10.9 g of material as four chlorophyll-free Frs.: A (5.7 g), B (1.2 g), C (1.0 g) and D (3.0 g). Fr.A was chromatographed on a C-18 column using H<sub>2</sub>O/acetonitrile/MeOH. Frs. B and C were chromatographed on silica gel using hexane/EtOAc mixtures of increasing polarity. This process afforded subfractions (A) A1 to A3; (B) B1 to B7 and (C) C1 to C6. These subfractions were purified and the allelochemicals were characterized.

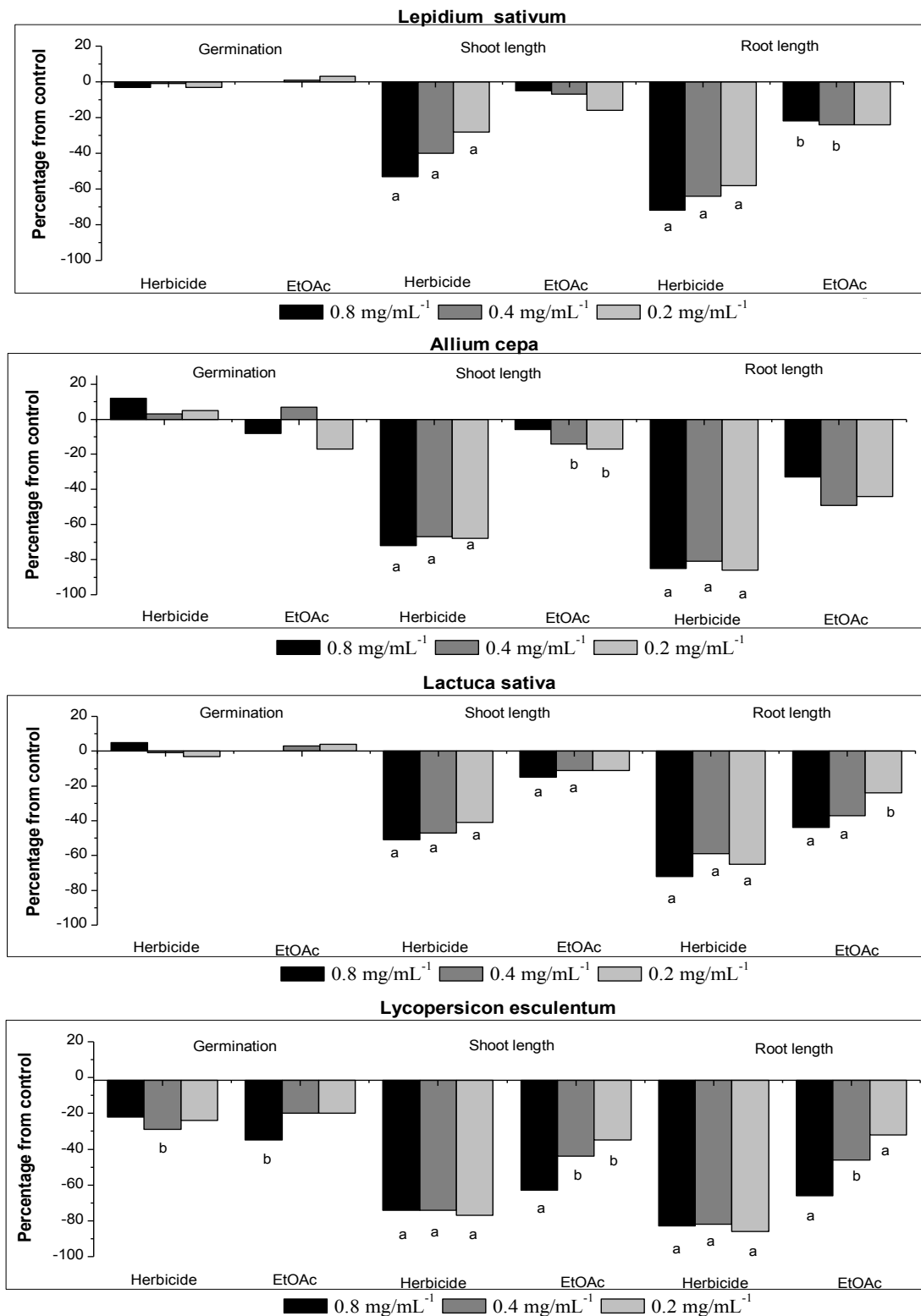


Figure 2. Effects of the herbicide Logran<sup>®</sup> and ethyl acetate leaf extract (EtOAc), of *Ocotea pulchella* on standard target species growth. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $0.01 < p < 0.05$  (b) or  $p < 0.01$  (a) according to Welch's test compared to control.



The chromatographic separation of subfractions led to the isolation of the following compounds: five sesquiterpenes (**1–5**), one fatty acid (**6**), two flavonoids (**7** and **8**), one phenylethanoid glucoside (**9**), two aromatic esters (**10** and **11**) and two sugars (**12** and **13**). The isolated compounds were identified by comparison of their spectroscopic data ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR and MS) with those reported in the literature for  $1\beta,6\alpha$ -dihydroxy-eudesm-4(5)-ene (**1**) (Nagashima et al., 2005);  $1\beta$ -hydroxy-eudesma-5,11-diene (**2**) (Blas et al., 2004); T-cadinol (**3**) (Feliciano et al., 1989); loliolide (**4**) (Isoe et al., 1971); spathulenol (**5**) (Iwabuchi et al., 1989); dimorphecolic acid (**6**) (Tsuboi et al., 1986); afzelin (**7**) (Garcez et al., 1995); kaempferol-4'-*O*-rhamnopyranoside (**8**) (Ibrahim et al., 2008); benzyl salicylate (**10**); benzyl benzoate (**11**) (Talzi, 2006); both anomers of D-xylopyranose (Gorin; Mazuret, 1975) (Figure 3).

The chemical profile of the extracts revealed a high proportion of sesquiterpenes. Most studies on Lauraceae extracts reported in the literature showed a predominance of this kind of metabolite (Gottlieb et al., 1981; Ciccio e Chaverri, 2008; Telascra et al., 2008; Alcantara et al., 2010). Several biological activities (Ghelardini et al., 2001) have been reported for sesquiterpenes **1–4** and these include anti-inflammatory (Fernandes et al., 2007), anti-allergic (Costa et al., 2000), local anesthetic (ZHANG et al., 2011), nematocide (Machado et al., 2010), cytotoxic, antifungal and bactericidal (Ghelardini et al., 2001), in addition to the herbicidal activity on weeds (Colom et al., 2007; Miranda et al., 2015).

Compounds **1**, **2**, **4** and **6** have not been isolated before from *O. pulchella*. Compound **6** is a polyunsaturated long chain fatty acid and this class of compound has shown several biological activities including antimicrobial, cytotoxic, antioxidant and signaling (Desbois; Smith, 2010).

Compound **9** (3.1 mg) was isolated from subfraction A4.4 (54.5 mg) as a yellow amorphous solid. The HREITOFMS spectrum of **9** showed a molecular ion at  $m/z$  433.1497  $[\text{M} - \text{H}]^+$ , which is consistent with the molecular formula  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_9$ . The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **9** (Table 1) is consistent with the presence of an anomeric proton that resonates at  $\delta$  4.24 and aromatic protons between  $\delta$  6.71 and 7.08. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum is consistent with the presence of a sugar and aromatic rings. The sugar was identified as glucose by comparison of the chemical shifts and splitting patterns of the sugar protons (Jo et al., 2006). The anomeric C-1 carbon ( $\delta$  104.4) was correlated to H-8'a ( $\delta$  3.91) and H-8'b ( $\delta$  3.66) in the HMBC spectrum. The H-8'a and H-8'b signals

were correlated in the COSY spectrum and further correlated to the signal for H-7' ( $\delta$  2.81). The signal for H-7' was correlated in the HMBC to three aromatic carbon signals at  $\delta$  130.0 (C-1'),  $\delta$  131.3 (C-2', C-6'), and C-8' ( $\delta$  71.7).

These findings suggest that **9** has a phenylethanoid glycoside as a partial structure. The resonances at  $\delta$  4.42 and 4.20 were assigned to H-6a and H-6b, respectively, of the sugar moiety due to the correlation with proton H-5 ( $\delta$  3.42) in the COSY spectrum. The phenylethanoyl substitution at C-6 was revealed by the HMBC experiment, in which H-6a and H-6b were correlated to the ester carbonyl carbon ( $\delta$  173.8, C-8'') (Table 1). C-8'' was correlated to H-7'' at  $\delta$  3.53, and H-7'' was correlated to the aromatic carbon resonances at  $\delta$  126.3 (C-1'') and  $\delta$  130.9 (C-2'', C-6'') in the HMBC spectrum of **9**. The positions of the hydroxyl groups in the aromatic rings were determined by comparison of the chemical shifts and splitting patterns of the aromatic protons in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **9**, which displayed two sets of spins systems that were assigned to a 1,4-disubstituted aromatic ring [ $\delta$  7.08 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', 2'', 6', 6''),  $\delta$  6.69 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', 3'', 5', 5'')], with those of compounds with the same hydroxylation pattern (Shimomura et al., 1987). The corresponding aromatic carbons were assigned from the HSQC data for **9**. Therefore, the structure of **9** was assigned as shown in Figure 3. This compound is described for the first time in the literature and has been named **ocoteol**.

The bioactivities of five sesquiterpenes (**1–5**), one flavonoid (**7**) and two aromatic esters (**10**, **11**) were assessed in the wheat coleoptile bioassay in a concentration range from  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$  M. Compounds **8** and **9** were not tested due to the low amounts obtained. The results are summarized in Figure 4.

Sesquiterpenes **1–5** showed significant inhibitory activity on coleoptile elongation at the two highest concentrations ( $10^{-3}$  and  $3 \cdot 10^{-4}$  M), with values between 60 and 100%, and compound **5** (spathulenol) was the most active of all the compounds tested, with 100% inhibition at  $10^{-3}$  and  $3 \cdot 10^{-4}$  M. These values are higher than those of the commercial herbicide Logran® at these concentrations. Antibacterial activity and an inhibitory effect on the growth of the phytopathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Botrytis cinerea* have also been also reported for compound **5** (Prieto et al., 2010). The flavonoid **7** (afzelin) showed low inhibitory activity, with a value of 50% at  $10^{-3}$  M, and had small effects at higher dilutions. Flavonoids represent an important class of polyphenols and their presence in plants seems to be related to defense functions, control of plant hormones, enzymes and the inhibition of allelopathic agents

(Borella; Pastorini, 2010). The two aromatic esters **10** and **11** (benzyl salicylate and benzyl benzoate) had the best activity profiles and the highest inhibitory activity on coleoptile elongation. These compounds showed values greater than 90% inhibition at the highest concentrations ( $10^{-3}$  and  $3 \cdot 10^{-4}$  M) and even at the third concentration ( $10^{-4}$  M), at which it exceeded 80% inhibition.

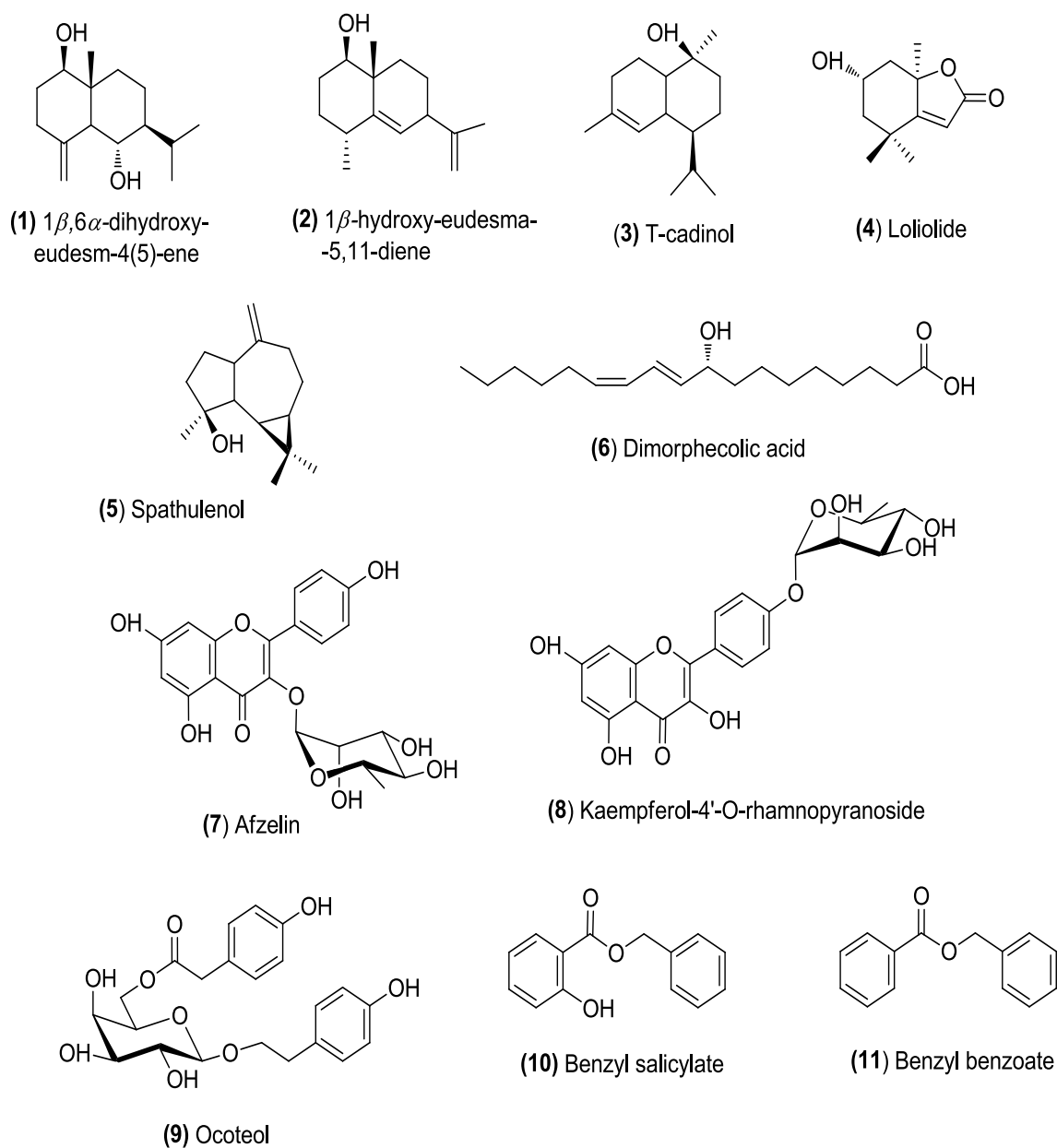


Figure 3. Compounds isolated from leaves of canelinha (*Ocotea pulchella*).

Table 1. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz), and <sup>13</sup>C (125 MHz) Spectroscopic Data for Compound 9 in Cl<sub>3</sub>CD.

position	$\delta_C$	$\delta_H$ [J in Hz]	HMBC
1	104.4	4.24 (d, 7.5)	
2	75.3	3.16 (dd, 8.5, 7.5)	C-1
3	77.9	3.31 [m]	
4	72.1	3.25 [m]	
5	75.0	3.42 [m]	
6a	64.9	4.42 (dd, 12.0, 2.0)	C-8", C-5
6b		4.20 (dd, 12.0, 6.0)	
1'	130.0		
2'	131.3	7.08 (d, 8.5)	C-4', C-6', C-7'
3'	116.3	6.69 (d, 8.5)	C-4', C-6', C-1', C-5'
4'	156.8		
5'	116.3	6.69 (d, 8.5)	C-4', C-6', C-1', C-3'
6'	131.3	7.08 (d, 8.5)	C-4', C-2', C-7'
7'	36.4	2.81 (t, 7.2)	C-1', C-8'
8'a	71.7	3.91 (dt, 9.5, 7.2)	
8'b		3.48 [m]	
1"	126.3		
2"	130.9	7.08 (d, 8.5)	C-4", C-6", C-7"
3"	116.1	6.68 (d, 8.5)	
4"	157.5		
5"	116.1	6.68 (d, 8.5)	
6"	130.9	7.08 (d, 8.5)	
7"	41.1	3.53 [m]	C-8", C-1", C-6", C-2"
8"	173.8		

These values are higher than those of the commercial herbicide at the same concentrations. These compounds isolated from *O. pulchella* have shown cytotoxic activity on tumor cell lines (CCF-STTG1, Hep3B, HepG2, H-460, AGS, N-87, SW-620, MCF-7 and VERO), of which astrocytoma cells were the most resistant (Chaverri

et al., 2011). If therapeutic concentrations can be achieved in target tissues, it has been proven that these components may be useful in the treatment of age-related inflammatory conditions. Further bioassays (cytotoxic, antitumor and plant growth regulators) were performed with these compounds and the results were positive (Gunawardena et al., 2015; Jung et al., 1990).

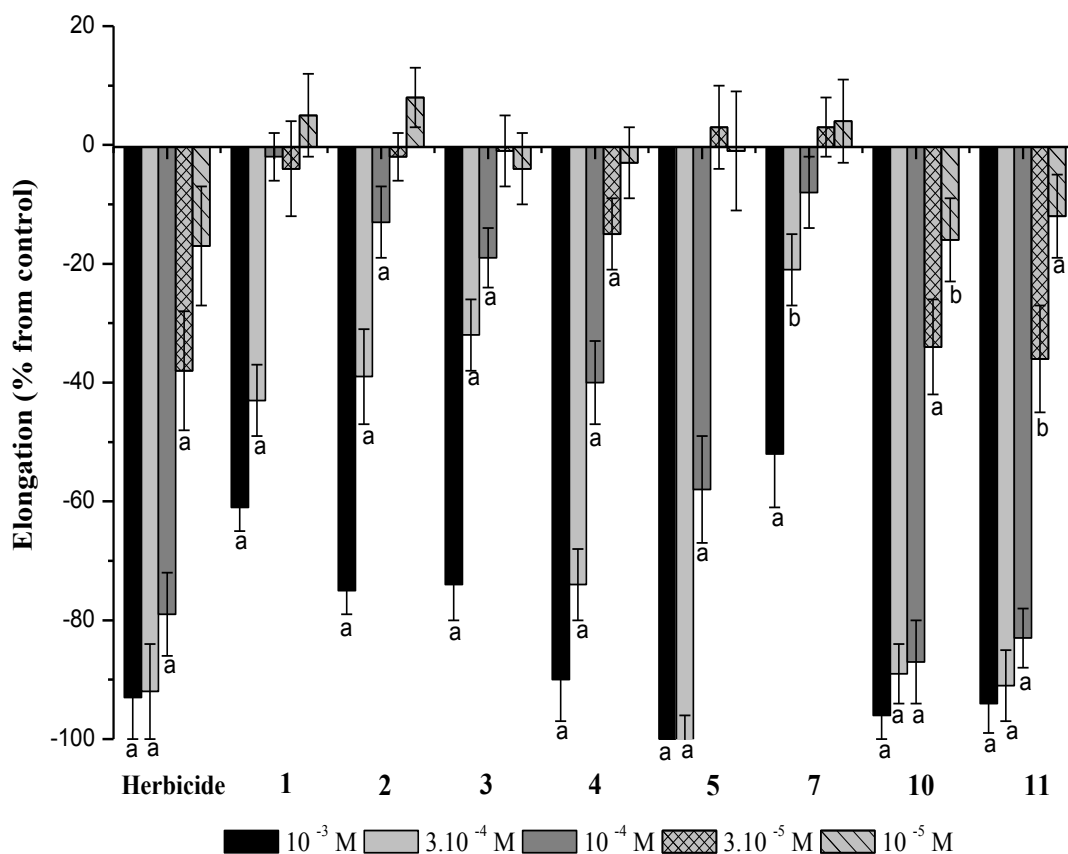


Figure 4. Effects of the compounds **1-5**, **7**, **10**, **11** and herbicide Logran® isolated from *Ocotea pulchella* on the elongation of etiolated wheat coleoptiles. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $0.01 < p < 0.05$  (b) or  $p < 0.01$  (a) according to Welch's test compared to control.

The results obtained in this bioassay showed that the most active compounds were **5** (spathulenol) and the aromatic esters **10** (benzyl salicylate) and **11** (benzyl benzoate). These activity values were corroborated by calculating the  $IC_{50}$  values for all of the compounds. It is noteworthy that compounds **10** and **11** showed similar or

lower IC<sub>50</sub> values compared to the herbicide Logran® (38.5, 39.3 38.7 µg .ml<sup>-1</sup>, for **10**, **11** and Logran®, respectively) (Table 2).

Table 2. IC<sub>50</sub> values calculated from compounds 1–5, 7, 10 and 11 and Logran in the wheat coleoptile bioassay, using a sigmoidal dose-response variable slope models.

Compound	IC <sub>50</sub> [µg mL <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
<b>1</b>	512.4	0.9753
<b>2</b>	399.3	0.9918
<b>3</b>	487.2	0.9885
<b>4</b>	131.8	0.9963
<b>5</b>	89.3	0.9307
<b>7</b>	900.1	0.9969
<b>10</b>	38.5	0.9712
<b>11</b>	39.3	0.9794
<b>Logran</b>	38.7	0.9895

Compounds **5**, **10** and **11** were selected for evaluation on *L. sativa* and *L. esculentum* (Figure 5). *L. esculentum* was the species that was affected the most by the EtOAc leaf extract. The compounds tested showed inhibitory activity on the three parameters assessed, especially at the first concentration (10<sup>-3</sup> M), with values between 60% and 80% on root and stem growth and 40% to 60% on germination (Figure 5). These three compounds also showed inhibitory activity on *L. sativa*, albeit with lower values than the initial EtOAc extract. It is worth highlighting the inhibition on root growth, with values close to 40% obtained with compound **11** at the highest concentration tested (10<sup>-3</sup> M).

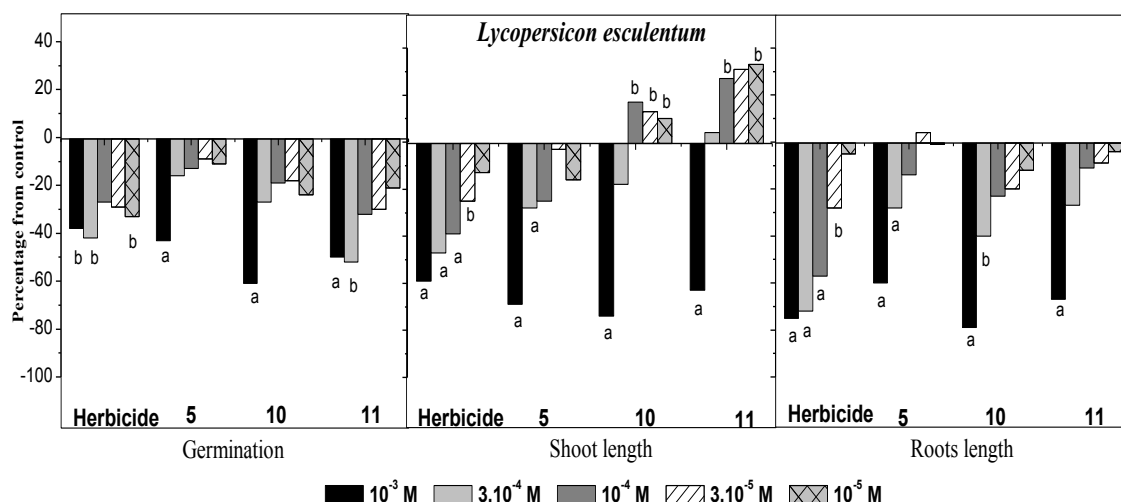


Figure 5. Effects of the compounds spathulenol (5), benzyl salicylate (10) and benzyl benzoate (11) from *Ocotea pulchella* on *L. esculentum* growth. Values are expressed as percentage difference from control. Levels of significance at  $0.01 < p < 0.05$  (b) or  $p < 0.01$  (a) according to Welch's test compared to control.

#### 4. CONCLUSIONS

The ethyl acetate leaf extract from *Ocotea pulchella* was the most promising in the study of phytotoxic activity, with the species *L. esculentum* affected the most (inhibition values higher than 60% on root and stem growth).

Eleven compounds have been isolated from this extract and these were characterized. Compounds **1**, **2**, **4** and **6** have not been identified previously in *O. pulchella* and ocoteol (**9**) is described for the first time.

Sesquiterpene **5** and the aromatic esters **10** and **11** were the most active in the coleoptile bioassay, with inhibition values higher than 90%.

The  $IC_{50}$  values for compounds **10** and **11** were similar to those of the herbicide Logran®.

Compounds **10** and **11** showed inhibitory activity on *L. esculentum*, especially at the highest concentration tested, with values around 60% and 80% on root and stem growth, respectively. These results are very similar to the activity exhibited by the EtOAc extract.

Therefore, it can be concluded that spathuleol (**5**), benzyl salicylate (**10**) and benzyl benzoate (**11**) are responsible for the phytotoxic activity shown by *O. pulchella*.

## 5. REFERENCES

- ALCÂNTARA, J.M.; YAMAGUCHI, L.K. K.; SILVA, J. R. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**. v.40, n.3, p.567- 572, 2010.
- ANDREI, C. C.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. Amsterdam : Elsevier, **Phytochemistry**.v.27, p.3992-3993, 1988.
- ARAÚJO, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.
- BORELLA, J.; PASTORINI, I. L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciências e Agrotecnologia**. v.34, n.4, 1120, 2010.
- BORGES, E. E. L.; Lopes, E. S.; Silva, G. F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I - árvores. **Revista Árvore**. v.17, p.69-84, 1993.
- BETHKE, R. K.; MOLIN, W. T.; SPRAGUE, C.; PENNER, D. Evaluation of the interaction between Glyphosate and Glufosinate. **Weed Science**.v.61,p.41-47, 2013.
- BLAS, BARBARA, ZAPP, JOSEF, BECKER, HANS. ent-Clerodane diterpenes and other constituents from the liverwort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. **Phytochemistry**. v.65, p.127–137, 2004.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides.**Journal Natural Products**.v.75,n.6, p.1231-42, 2012.
- CAMARGO, M. J. DE et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Quim. Nova**, vol. 36 (7), p.1008-1013, 2013.
- CASTELLANO, D. Optimización de bioensayos alelopáticos. Aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. PhD dissertation. Universidad de Cádiz, Spain, 2002.
- CICCIÓ, J. F.; CHAVERRI, C. Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadriporata* (Lauraceae) from “Alberto M. Brenes” biological preserve. **Química Nova**, v.31, n.3, p.605-609, 2008.



COLOM, O. A.; POPICH, S.; BARDON, A. Bioactive constituents from *Rollinia emarginata* (Annonaceae). **Nat. Prod. Res.** v.21, p.254–259, 2007.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology.** v.72, p.111-117, 2000.

COUTINHO, Denise F. Composition and Molluscicidal Activity of the Essential Oil from the Stem Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **J. Essent. Oil Res.** v.19, p.482–484, 2007.

CHAVERRI, Carlos; DIAZ, Cecilia; CICCIO, Jose F. Chemical analysis of essential oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gomez-Laur. (Lauraceae) collected at "reserva biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their cytotoxic activity on tumor cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v.22,n.4,p.741-745,2011.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LOPEZ-OVEJERO, R. F.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. P. C.; CAETANO, A. C.; CARVALHO, C. C.; MOREIRA, M. S. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Coordenação: Christoffoleti,P.J.,3<sup>a</sup> ed. Atua. e revista Piracicaba:HRAC-BR,p.120, 2008.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, n.12, p.4022-34, 2009.

DESBOIS, A. P., SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 85, p.1629–1642, 2010.

FELICIANO, A. S.; MEDARDE, M.; GORDALIZA, M.; DEL OLMO, E.; DEL CORRAL, J. M. M. Sesquiterpenoids and phenolics of *Pulzcaria paludosa*. **Phytochemistry.** v. 28, n.10, p.2717-2721, 1989.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology.** v.569, n.3, p.228-236, 2007.

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

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry.** v.39, n.4, p.815-816, 1995.

GORIN, P. A. J.; MAZURET, M. Further Studies on the Assignment of Signals in <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectra of Aldoses and Derived Methyl Glycosides. **Canadian Journal of Chemistry.**v.53, p.1212-1223,1975.

GOTTLIEB, O. R.; KOKCTSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; DA ROCHA, A.I.; DA SILVA, M.L.; WILBERG, V.C. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazônica**. v.11,p.143, 1981.

GUNAWARDENA, Dhanushka; KARUNAWEERA, Niloo; LEE, Samiuela; VAN DER KOOY, Frank; HARMAN, David G.; RAJU, Ritesh; BENNETT, Louise; GYENGESI, Erika; SUCHER, Nikolaus J.; MUNCH, Gerald. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & Function**. v.6, n.3, p.910-919, 2015.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of betacaryophyllene. **II Farmaco**. v. 56, p.387-389, 2001.

HANCOCK, C.; BARLOW, H.; LACEY, H. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**. n.15, p. 166–176, 1964.

IBRAHIM, A.; KHALIFA, S. I.; KHAFAGI, I.; YOUSSEF, D. T.; KHAN, S.; MESBAH, M.; KHAN, I. Microbial metabolism of biologically active secondary metabolites from *Nerium oleander* L. **Chem. Pharm. Bull.** v.56, n.9, p.1253-1258, 2008.

ISHIGE, M.; MOTIDOME, M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further neolignans from *Ocotea Catharinensis*. **Phytochemistry**. v.30, p.4121-4128, 1991.

ISOE, S.; KATSUMURA, S.; SUONG, B. H.; SAKAN, T. Biogenetic type synthesis of grasshopper ketone and loliolide and a possible biogenesis of allenic carotenoids. **Tetrahedron Lett.** v.16, p.1089–92, 1971.

IWABUCHI, H.; YOSHIKURA, M.; KAMISAKO, W. Studies on the Sesquiterpenoids of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **III. Chemical Pharma Bulletin**. v.37, n 2, p. 509-510, 1989.

JO, Y.; KIM, M.; SHIN, M. H.; CHUNG, H. Y.; JUNG, J. H.; IM, K. S.; Antioxidative Phenolics from the Fresh Leaves of *Ternstroemia japônica*. **Journal Nature Produce**. v.69, p.1399-1403, 2006.

JUNG, J. H.; PUMMANGURA, S.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PATARAPANICH, C.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*. **Phytochemistry**. v.29, n.5, p.1667-70,1990.

KHAN, M. et al. Allelopathic effects of *Rhazya stricta* decne on seed germination and seedling growth of maize. **African Journal Agricultural Reseach**. v.6, n.30, p. 6391-6396, 2011.

KIM, Y. O.; JOHNSON, J. D.; LEE, E. J. Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three Phytolaccaceae species in South Korea. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 31, n. 5, p. 1175-1186, 2005.

LORDELLO, A. L. L.; YOSHIDA, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Phytochemistry**. v. 46, p. 741-744, 1997.

LORENZI, H.; Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, 4a ed.; Instituto Plantarum: São Paulo, v. 1, 143-144, 2002.

MACÍAS, F. A., GALINDO, J., CASTELLANO, D., VELASCO, R. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.48, p.5288–5296, 2000.

MACÍAS, F.A., LACRET, R., VARELA, R.M., NOGUEIRAS, C., MOLINILLO, J.M.G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal Chemistry Ecological**. v.36,p.396–404, 2010.

MACIAS, F. A. A.; OLIVEROS-BASTIDAS; MARIN, D.; CHINCHILLA, N.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. Evidence for an allelopathic interaction between rye and wild oats. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.62, n.39, p.9450-57, 2014.

MACHADO, L. F. DA S; KAISER, C. R.; COSTA, S. S.; GESTINARI, L. M.; SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3, p.441-452, 2010.

MARTÍN, A.; LUNA, J. D. Bioestadística para las ciencias de la salud; Ediciones Norma: Madrid, Spain, 1990.

MEZNI, F., MAAROUFI, A., MSALLEM, M., BOUSSAID, M., KHOUJA, M. L., KHALDI, A. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n. 39, p. 5266-5271, 2012.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G., GUALTIERI, S. C. J.; MACÍAS, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**. v.14, p.1-10, 2015.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Med**. v.78, p.1543–1548, 2012.

MONQUERO, P.A. Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas. São Carlos, SP: RiMA Editora, p.430, 2014.

NAGASHIMA, F.; KISHI, K; HAMADA, Y.; TAKAOKA, S.; ASAKAWAY, Y. ent-verticillane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jackiella javanica*. **Phytochemistry**, v.66, n.14, p.1662-1670, 2005.

- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. **Plant Physiol.** v. 31, p.94-111, 1956.
- NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews.** v.12, n.4, p.839-855, 2013.
- PINTO, J. J. O. et al. Controle de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p.767-777, 2008.
- PRIETO J. A.; PABON, L. C.; PATINO, O. J.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Chemical constituents and insecticidal and antifungal activities of the essential oils of leaves of two Colombian species of the genus *Ocotea* (Lauraceae). **Latin American Journal of Pharmacy.** v.29, n.7, p.1242-1245, 2010.
- SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; ADACHI, T.; Cyanogenic and phenylpropanoid glucosides from *Prunus grayana*. **Phytochemistry.** v.26, p.2363-2366, 1987
- TAKAKU, S., et. al. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology.** n. 35, p.525-532, 2007.
- TALZI, V. P. A <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR analysis of perfumes. **Russian Journal of Applied Chemistry.** v.79, n.1, p.107-116, 2006.
- TANVEER, A.; JABBAR, M. K; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R. N; JAVAID, M. M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Reseach.** v.72: p. 495–501, 2012.
- TELASCREA, M.; ARAÚJO, C.C.; CAVALHEIRO, A.J.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R., MORAES, P.L.R. Essential oils from leaves of *Cryptocarya spp* from the atlantic rain forest. **Química Nova.** v.31, n.3, p. 503-507, 2008.
- TSUBOI, S.; MAEDA, S.; TAKEDA, A.; A conveniente synthesis of (±)-Dimorphecolic acid and its analogs. **Bulletin Chemical Society Japan.** v.59, n.6, p.2050-2052,1986.
- ZHANG, H. M.; WANG, G.L; BAI, C. Q., LIU, P.; LIU, Z. M.; LIU, Q. Z.; WANG,Y. Y.; LIU, Z.L.; DU, S. S.; DENG, Z.W. A New Eudesmane sesquiterpene glucoside from *Liriope muscari* fibrous roots. **Molecules.** v.16, p.9017-9024, 2011.

## CAPÍTULO 3

**Extratos de folha de *Davilla elliptica* St. Hill  
(DILLENACEAE) e seus efeitos na germinação e no  
crescimento de *Euphorbia heterophylla* L. e *Panicum  
maximum* Jacq CV.**

Extratos de folha de *Davilla elliptica* St. Hill (DILLENACEAE) e seus efeitos na germinação e no crescimento de *Euphorbia heterophylla* L. e *Panicum maximum* Jacq CV.

## RESUMO

O aumento do uso de herbicidas convencionais para o controle de plantas infestantes tem levado a seleção de biótipos mais resistentes. Os aleloquímicos representam uma importante fonte para a descoberta de novos compostos com atividade fitotóxica. A espécie *Davilla elliptica* possui diversas propriedades farmacológicas já conhecidas, todavia não há estudos sobre o potencial herbicida dessa espécie em plantas infestantes. Objetivou-se avaliar o potencial herbicida de *D. elliptica* em plantas invasoras. A extração foi efetuada utilizando-se 200 g de pó de folhas secas de *D. elliptica* com 600 mL dos solventes (hexano, diclometano, acetato de etila, acetona e metanol). O extrato aquoso foi obtido por partição líquido-líquido utilizando 100g de pó. A germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum* foram avaliados utilizando as doses de 0.25, 0.5, 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos foliares de *D. elliptica*. Os extratos de folha acetônico, metanólico e aquoso das folhas afetaram a germinabilidade, o tempo médio e a velocidade média de germinação de sementes de capim-colonião. O extrato metanólico de folhas de *Davilla elíptica* apresentou maior potencial fitotóxico sobre o crescimento da raiz de *E. heterophylla* e *P. maximum*. A raiz foi o órgão mais afetado pelos extratos vegetais e o capim colonião foi a espécie alvo mais sensível aos extratos foliares de *D. elliptica*. Os aleloquímicos presentes nos extratos de folha de *D. elliptica* apresentam potencial fitotóxico no controle de *E. heterophylla* e *P. maximum*..

**Palavras-chaves:** Cerrado, herbicida, fitotoxidade.

Leaf extracts from *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae) and effect on germination and growth of *Euphorbia heterophylla* L. and *Panicum maximum* CV.

## ABSTRACT

Increased use herbicides to control weeds has led selection of more resistant biotypes against herbicides. Allelochemicals represent an important source for the discovery of new compounds with phytotoxic activity. The specie *Davilla elliptica* has many pharmacological properties already known, however there are no studies on the potential of this species herbicide on weeds. This study aimed to obtain information on the potential herbicide *D. elliptica* on invasive plants. The extraction was performed using 200 g of powder leaves of *D. elliptica* with 600 ml of solvents (hexane, diclometano, ethyl acetate, acetone and methanol). The aqueous extract was obtained by liquid-liquid partition using 100g of powder. The germination and initial seedling growth of *Euphorbia heterophylla* and *Panicum maximum* were evaluated using the doses 0.25, 0.5, 1 and 2 mg.mL<sup>-1</sup> of the leaf extract of *D. elliptica*. The extracts acetone, methanol and aqueous from leaf affected the germination, TMG and VMG colônia grass seeds. The ethanol extract of *Davilla elliptica* leaves presents greater potential phytotoxic in the growth of *E. heterophylla* root and *P. maximum*. Root was the most affected organ by plant extracts and colonial grass was the most sensitive target species concentrations of leaf extracts of *D. elliptica*. The allelochemicals present in *D. elliptica* leaf extracts have potential phytotoxic in control of *E. heterophylla* and *P. maximum*.

**Keywords:** Cerrado, herbicide, phytotoxicity.

## 1.INTRODUÇÃO

As plantas produzem, armazenam e liberam para o ambiente, inúmeras substâncias químicas com propriedades biológicas específicas. Oriundos do metabolismo primário e/ou secundário dos vegetais, essas substâncias afetam diferentes processos fisiológicos e metabólicos de diversos organismos (Wink, 2010). Estes compostos desempenham papel importante nas interações ecológicas entre plantas e o seu ambiente natural circundante, bem como nos ecossistemas agrícolas (Callaway; Ridenour, 2004). Além disso, a fitotoxidade dessas substâncias na germinação e no crescimento de plantas infestantes tem permitido o uso como pesticidas naturais, uma alternativa ao uso de herbicidas sintéticos (Kroymann, 2011).

Ecologicamente, diferentes fatores bióticos e abióticos afetam a produção dos aleloquímicos nas plantas, entre eles: intensidade luminosa, comprimento do dia, temperatura, idade dos órgãos vegetais e o fator genético (Souza et al., 2010). Os aleloquímicos podem estar presentes em todos os órgãos dos vegetais, onde são produzidos e armazenados. Entretanto, podem ser encontrados em concentração diferente em cada órgão vegetal (Gatti et al., 2010; Scognamiglio, et al., 2013). A quantidade e a via de emissão variam entre as espécies (Friedman, 1995). Em sua maioria são liberados no ambiente por meio da exsudação, vaporização, lixiviação ou decomposição (Fernandez et al., 2009).

No Brasil, o Cerrado é uma das formações vegetais com a segunda maior biodiversidade, estima-se que haja pelo menos 12.000 espécies de plantas superiores, sendo considerada a maior diversidade de espécies comparada a outras savanas (Forzza et al., 2010). Essas plantas estão submetidas a condições adversas como; inverno seco, solo ácido e ricos em alumínio, além do fogo, que ocorre naturalmente em curtos períodos, sendo um fator importante na biodiversidade do Cerrado (Moreira, 2000; Haridasan, 2001; Coutinho, 2002). Tais condições induzem as plantas a desenvolverem diferentes mecanismos de defesa, entre eles; a produção de compostos com atividades fitotóxica, inseticida, moluscicida, fungicida e antibacteriana (Marquis et al., 2002; Correa et al., 2008; Da Silva; Batalha, 2011; Novaes et al., 2013).

A família Dilleniaceae possui cerca de dez gêneros de ampla distribuição nos trópicos e subtropicais (Soares et al., 2005). A espécie *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae) ocorre naturalmente no Cerrado (Silva et al., 2001) e é conhecida popularmente como lixeirinha, lixeira, bugre, sambaibinha e muricizinho. Possui



diversas propriedades farmacológicas já conhecidas, entre elas: adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético (Rodrigues; Carvalho, 2001), antiinflamatório, antisséptico (Silva et al., 2001), antioxidante (Aaby et al., 2004), antibacteriano (Arantes et al., 2005) e fitotóxica na germinação de alface e gergelim (Gatti et al., 2007). Todavia, são poucos os estudos sobre o potencial herbicida dessa espécie, sobretudo em plantas infestantes.

O estudo fitoquímico a partir de extratos metanólico e etanólico de folha de *D. elliptica* detectou a presença de heterosídeos flavonóides e saponínicos, esteróides, triterpenóides, taninos, cumarinas, antraquinonas, ácido gálico, catequinas e resinas (Carlos et al., 2005; Soares et al., 2005). As características bioquímicas destes compostos naturais se relacionam com as funções que desempenham nos vegetais (Wink, 2010). Os terpenos, por exemplo, desempenham um papel importante nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (Zwenger; Basu, 2008).

Os estudos sobre as atividades biológicas destes compostos químicos isolados de *D. elliptica* têm sido concentrados, especificamente, em propriedades farmacológicas (Rodrigues; Carvalho, 2001; Aaby et al., 2004; Carlos et al., 2005). Logo, baseado no potencial fitoquímico da flora do Cerrado e das propriedades biológicas já conhecidas de *D. elliptica*, somado a escassez de informações a respeito do potencial herbicida dessa espécie em plantas infestantes, o presente estudo avaliou o potencial fitotóxico de extratos foliares de *D. elliptica* na germinação e no crescimento de *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e produção dos extratos**

O material vegetal (folhas) de *Davilla elliptica* St. Hill foram coletadas em agosto de 2012 (estação seca), na reserva de Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), Brasil. Um exemplar foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, voucher HUFSCar 8799.

Em seguida, as folhas foram secas em estufa a 40°C por 72 horas, e trituradas a pó em moinho elétrico. 200g do pó de folha foram extraídos utilizando 600 mL dos

solventes hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (Ac) e metanol (MeOH). As soluções foram submetidas a banho de ultrassom durante 30 minutos. Após filtragem a vácuo, o processo foi repetido. A solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida.

A obtenção do extrato aquoso foi realizado utilizando 100g do pó de folhas que foi submetido à extração em diclorometano/metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ) (1:1) (AIBU et al., 2004). Posteriormente, o extrato bruto foi diluído em metanol/água ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ) (95:5) e particionado com o solvente hexano, obtendo-se os extratos metanólicos e hexânicos de folha. O extrato metanólico foi suspenso em água destilada e particionados com acetato de etila, dando origem aos extratos de acetato de etila e aquosos de folha de *D. elliptica* (Otsuka, 2005). Nos ensaios de fitotoxicidade, utilizou-se apenas o extrato aquoso de folha da espécie doadora obtido da extração líquido-líquido.

## **2.2 Bioensaios de fitotoxicidade.**

### **2.2.1 Bioensaios de germinação**

A fitotoxicidade foi avaliada, utilizando-se os extratos de folha de *Davilla elliptica* sobre a germinação de sementes das espécies infestantes de culturas *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) e *Panicum maximum* Jacq CV. (capim-colonião). As sementes foram acondicionadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de germinação, umedecidas com 5 mL de água destilada (controle), ou com os extratos nas concentrações 0,25; 0,5; 1 e 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram utilizados 4 repetições. Cada réplica recebeu 25 diásporos das espécies-alvo. As placas de petri foram seladas com filme plástico e mantidos em câmara de germinação a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h/12 h luz/escuro para amendoim-bravo (Inoue et al., 2010) e com alternância de temperatura de 20-30°C e fotoperíodo de 16-8 h para capim-colonião (Tomaz et al., 2010). Foram realizadas leituras a cada 12 h nos cinco primeiros dias e, em intervalos de 24 h, até a germinação ser nula por três dias consecutivos. Como critério de germinação foi adotado a protrusão de qualquer parte do embrião. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação, o tempo (TMG) e a velocidade média (VMG) das sementes germinadas (Ranal; Santana, 2006).

### 2.2.2 Bioensaios de crescimento.

Sementes das espécies alvo foram colocadas para germinar em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de germinação umedecidas com água destilada. As placas foram mantidas em câmara de germinação a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 /12 h luz/escuro. Logo após atingir um comprimento da raiz de 2 mm, as sementes foram transferidas para caixas de plástico transparente (15 x 10 x 5 cm). Cada caixa continha duas folhas de papel de filtro umedecidas com 8 mL de água destilada (controle negativo), extrato de folhas de *D. elliptica* ou herbicida GOAL<sup>®</sup> (controle positivo), os 2 últimos nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram utilizadas quatro repetições contendo 10 plântulas cada, totalizando 40 indivíduos por tratamento. As caixas foram colocadas em sacos de plástico transparente e submetidas às mesmas condições de incubação citadas para o teste de germinação (Inoue et al., 2010; Carvalho et al., 2001; Tomaz et al., 2010). Após sete dias, as plântulas foram removidas, fotografadas e os comprimentos da parte aérea (do colo ao meristema apical caulinar) e da raiz primária (do colo ao meristema apical radicular) foram medidos com auxílio do software Image-Pro-Plus<sup>®</sup> 5.0. Na presença de plântulas com características anormais, essas foram fotografadas, caracterizadas e contabilizadas como descrito por RAS (2009).

### 2.2.3 Bioensaio de anatomia em raízes de *Euphorbia heterophylla*.

De acordo com o bioensaio de crescimento, as plântulas de amendoim-bravo foram submetidas às concentrações de 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato metanólico (MeOH) de folhas de *D. elliptica* e em água destilada (controle negativo). O experimento para avaliar o comprimento de células de metaxilema foi conduzido da mesma forma descrita para o bioensaio de crescimento. Após cinco dias da instalação do experimento, as plântulas foram retiradas das caixas, com auxílio de um estilete, foi removido o segmento da raiz primária que foi imerso, imediatamente, em álcool 70 % durante cinco dias. Após esse período, as raízes foram lavadas em água destilada e colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25 %), em estufa a 60 °C, durante 48 horas, período em que foi observada a clarificação do material. O método de coloração adotado foi de Fuchs com algumas modificações (Kraus; Arduin, 1997).

O material clarificado foi imerso em uma placa de petri (15 cm) contendo safranina ( $C_{20}H_{19}N_4C_1$ ) e soda cáustica (NaOH a 10 %), e mantidos em estufa, a 60 °C, por 24 horas. Após o procedimento de coloração, o material foi lavado novamente e fixado em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico acoplado com câmera fotográfica. Foram utilizadas cinco réplicas de raízes primárias por tratamento, crescidas nas diferentes concentrações do extrato de folha de *D. elliptica* extraídas com MeOH e do controle negativo. Com auxílio do microscópio, foi fotografado 50% do comprimento total de cada raiz, considerando a região central em direção ao colo, em uma amplitude de 20 vezes (Gatti et al., 2010). As células do metaxilema, no total 10 por fotografia, foram medidas por meio do programa Image Pro-Plus 5.0.

### **2.3 Análises estatísticas**

Inicialmente, os dados obtidos para cada bioensaio, considerando os parâmetros avaliados, foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando atendidas essas duas pressuposições, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ou Dunnett, a 0,05 de probabilidade. A ausência de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (comparações múltiplas) ou Mann-Whitney (comparação binária). Para os bioensaios de germinação e crescimento, quando o resultado da ANOVA foi significativo, procedeu-se à regressão linear ou quadrática. O ajuste do modelo foi testado a 0,05 de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Nos casos onde não foi possível o ajuste dos modelos ( $R^2 < 0,70\%$ ) ou quando os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, os valores foram apresentados em forma de tabela (Pimentel-Gomes, 1990).

### 3. RESULTADOS

Dos métodos de extração utilizados no presente estudo foram obtidos os respectivos extratos e rendimentos (tabela 1).

Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos de 200g de pó de folha de *D. elliptica* por meio da utilização de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O extrato aquoso foi obtido por partição líquido-líquido utilizando 100g de pó (Otsuka, 2005).

Rendimentos (g)	
Extratos	Folha
Hexânico	1,84
Diclorometânico	1,58
Acetato etílico	1,22
Acetônico	1,85
Metanólico	5,46
Aquoso	5,87

Os extratos hexânico, diclorometânico, acetato etílico, acetônico, metanólico e aquoso de folha de *Davilla elliptica* afetaram as espécies alvo em pelo menos um dos parâmetros avaliados para a germinação (Tabelas 2 e 3). As sementes de capim-colônia (*P. maximum*) foram mais susceptíveis ao efeito dos extratos foliares de *D. elliptica* do que as sementes de amendoim-bravo (*E. heterophylla*), visto que todos os extratos, exceto o hexânico, promoveram algum tipo de alteração na (%) germinação, TMG e na VMG (Tabela 3).

Os extratos foliares de *D. elliptica* afetaram os parâmetros de germinação avaliados para as sementes de amendoim-bravo, sobretudo na velocidade média de germinação quando submetida ao extrato bruto de hexano na concentrações de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (0,38 dias) para o qual foi verificado o maior tempo médio de germinação (2,57 dias). Não foi observada relação de dose-resposta entre os extratos foliares de *D. elliptica* avaliados em sementes de amendoim-bravo, sendo assim não houve ajuste nos modelos de regressão (Tabela 2).

As respostas fitotóxicas verificadas nas sementes de capim-colônia submetidas às concentrações dos extratos de folha de *D. elliptica* exibiram efeito de

inibição mais significativo sobre o TMG e VMG quando presentes nos extratos de diclorometano, acetato de etila (Tabela 3), acetonico, metanólico e aquoso (Figura 1 e 2). Os extratos de folha extraído com AcOEt e acetona (Figura 1) e de metanol e aquoso (Figura 2) produziram aumento linear no tempo médio de germinação de 0,34; 0,61; 0,39 e 0,28 dias e decréscimo linear na velocidade média de germinação de 0,04; 0,06; 0,04 e 0,04 dias respectivamente, a cada 1 mg.mL<sup>-1</sup> de solução adicionada (Figuras 1 e 2).

Tabela 2. Germinação de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), submetidos à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de *Davilla elliptica*, em diferentes concentrações.

Variáveis (Unidades)	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )					Estatística F(p)
	0	0.25	0.5	1	2	
<b>Extrato hexânico</b>						
G(%)	51 ± 3,91 a	59 ± 8,24 a	61 ± 9,45 a	55 ± 15,1 a	52 ± 8,64 a	1,318 (0,296)
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	2,06 ± 0,31 b	2,10 ± 0,28 b	2,57 ± 0,15 a	2,17 ± 0,18 b	<b>5,74 (0,003)</b>
VMG (d)	0,43 ± 0,02 a	0,49 ± 0,07 a	0,48 ± 0,06 a	0,38 ± 0,02 b	0,46 ± 0,04 a	<b>4,649 (0,008)</b>
<b>Extrato Diclorometânico</b>						
G(%)	51 ± 3,91 a	60 ± 11,7 a	54 ± 2,3 a	53 ± 14 a	40 ± 18,76 a	2,511 (0,073)
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	1,94 ± 0,45 a	2,22 ± 0,4 a	2 ± 0,24 a	2,32 ± 0,45 a	1,576 (0,219)
VMG (d)	0,43 ± 0,02 a	0,53 ± 0,12 ab	0,46 ± 0,08 b	0,5 ± 0,05 ab	0,44 ± 0,07 ab	1,985 (0,135)
<b>Extrato de Acetato de etila</b>						
G(%)	51 ± 3,91 a	52 ± 9,79 ab	57 ± 11 a	56 ± 18,18 ab	47 ± 11,48 b	0,781 (0,552)
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	2 ± 3 a	1,88 ± 0,16 b	2 ± 0,29 a	2,31 ± 0,21 a	<b>4,355 (0,01)</b>
VMG (d)	0,43 ± 0,02 b	0,5 ± 0,07 a	0,53 ± 0,5 a	48 ± 0,06 a	43 ± 0,03 b	<b>4,361 (0,01)</b>
<b>Extrato acetônico</b>						
G(%)	51 ± 3,91 a	52 ± 3,26 a	58 ± 7,65 a	46 ± 6,92 a	36 ± 14,23 b	<b>6,739 (0,001)</b>
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	1,98 ± 0,09 b	2,07 ± 0,19 b	2,3 ± 0,19 a	2,5 ± 0,22 a	<b>9,48 (0,0001)</b>
VMG (d)	0,43 ± 0,02 b	0,5 ± 0,02 a	0,48 ± 0,04 a	0,43 ± 0,03 b	0,43 ± 0,03 b	<b>6,213 (0,002)</b>
<b>Extrato Metanólico</b>						
G(%)	51 ± 3,91 b	51 ± 3,82 b	68 ± 6,53 a	55 ± 12,38 b	53 ± 11,48 b	<b>4,73 (0,007)</b>
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	2,21 ± 0,14 a	2,3 ± 0,26 a	2,5 ± 12,38 a	2,5 ± 0,26 a	2,886 (0,048)
VMG (d)	0,43 ± 0,02 a	0,45 ± 0,02 a	0,43 ± 0,05 a	0,4 ± 0,02 a	0,4 ± 0,04 a	2,822 (0,052)
<b>Extrato aquoso</b>						
G(%)	51 ± 3,91 a	62 ± 18,61 a	52 ± 11,31 a	51 ± 10,52 a	47 ± 15,1 a	1,259 (0,318)
TMG (d)	2,3 ± 0,107 a	2,2 ± 0,14 b	2,33 ± 0,14 a	2,24 ± 0,2 b	2,5 ± 0,15 a	<b>3,672 (0,021)</b>
VMG (d)	0,43 ± 0,02 a	0,45 ± 0,02 a	0,42 ± 0,02 a	0,44 ± 0,04 a	0,4 ± 0,02 b	<b>3,429 (0,027)</b>

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G: germinabilidade; TMG: tempo médio de germinação; VMG: velocidade média de germinação; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA; P<0,05).

Sob o efeito do extrato diclorometânico a velocidade e o tempo médio de germinação de capim-colonião foram afetados significativamente na maior concentrações avaliada ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Germinação de *Panicum maximum* (capim-colonião), submetidos á ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha de *Davilla elliptica*, em diferentes concentrações.

Variáveis (Unidades)	Concentrações ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )					Estatística F(p)
	0	0.25	0.5	1	2	
<b>Extrato hexânico</b>						
G(%)	79 ± 6 a	78 ± 10 a	75 ± 6 a	71 ± 22,9 a	78 ± 14,7 a	0.388 (0.815)
TMG (d)	2.4±0.16 a	2.46±0.27 a	2.61±0.07 a	2.7±0.23 a	2.5±0.28 a	2.143 (0.053)
VMG (d)	0.41±0.03 a	0.40±0.04 a	0.38±0.01 a	0.36±0.03 a	0.38±0.04 a	2.472 (0.077)
<b>Extrato Diclorometânico</b>						
G(%)	79 ± 6 a	83 ± 20.2 a	75 ± 11.9 a	78 ± 4 a	77 ± 8.24 a	0.436 (0.782)
TMG (d)	2.4±0.16 a	2.58 ± 0.09 a	2.62 ± 0.17 a	2.73 ± 0.33 b	2.76 ± 0.14 b	<b>3.46 (0.026)</b>
VMG (d)	0.41±0.03 a	0.38 ± 0.01 a	0.38 ± 0.02 a	0.37±0.04 a	0.36 ± 0.01 b	<b>3.522 (0.024)</b>
<b>Extrato de Acetato de etila</b>						
G(%)	79 ± 6 a	77 ± 8.24 a	76 ± 6.53 a	76 ± 12.6 a	70 ± 9.52 a	0.948 (0.541)

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G: germinabilidade; TMG: tempo médio de germinação; VMG: velocidade média de germinação; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

As sementes expostas às concentrações dos extratos acetônico, metanólico e aquoso de folha exibiram alteração de todos os parâmetros do processo germinativo avaliados, visto que houve decréscimo linear na germinabilidade, no tempo médio e na velocidade média de germinação (Figura 2).

Na presença dos extratos foliares de acetona, metanol e aquoso o número de sementes germinadas de capim-colonião foi reduzindo em relação ao controle (79%) a 42,12% (acetona), 54% (metanol) e 56% (aquoso) para cada  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  adicionado a soluções (Figura 1 e 2). De maneira geral, pode-se inferir que as sementes de capim-colonião foram mais sensíveis aos extratos de folha de *D. elliptica* quanto a porcentagem de germinação, TMG e a VMG (Figura 1 e 2). Além disso, os resultados mostram que os tratamentos, não somente aumentaram o tempo médio de germinação como também reduziram a velocidade de germinação e a germinabilidade das sementes de *Panicum maximum* (Figura 2).

O TMG, VMG e a porcentagem de sementes germinadas de capim-colonião foram mais afetados quando expostas as concentrações do extrato de folha acetônico (Figura 1).

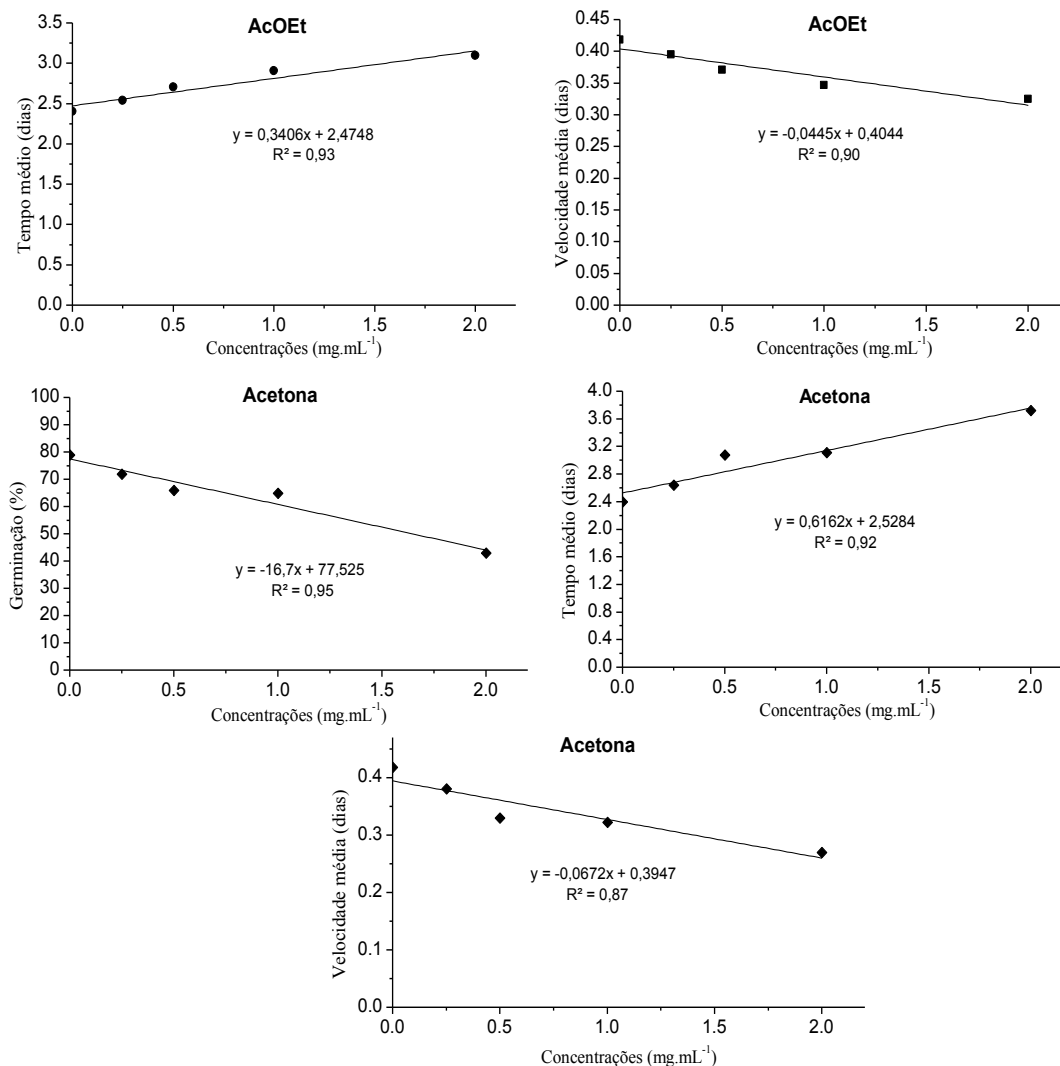


Figura 1. Germinação, tempo médio e velocidade média de germinação de sementes de capim-colonião (*Panicum maxumum*) submetidas ao efeito dos extratos brutos de folhas de *Davilla elliptica* extraídos com acetato de etila (AcOEt) e acetona, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Quando se avaliou o crescimento de plântulas de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e de capim-colonião (*P. maximum*) sob efeitos das concentrações dos extratos foliares de *Davilla elliptica*, notou-se que as sementes de capim-colonião foram mais sensíveis, sobretudo o sistema radicular dessa espécie alvo, para o qual foi observado a maior taxa de inibição (>-70%) na concentração de 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  do extrato metanólico. Resultado esse superior ao observado para o herbicida comercial GOAL (-59%). De maneira geral, os maiores valores de inibição foram produzidos pelos



extratos de polaridades mais altas (acetona, metanol e aquoso), tanto para a parte aérea quanto para o sistema radicular em plântulas de capim-colonião (Figura 3).

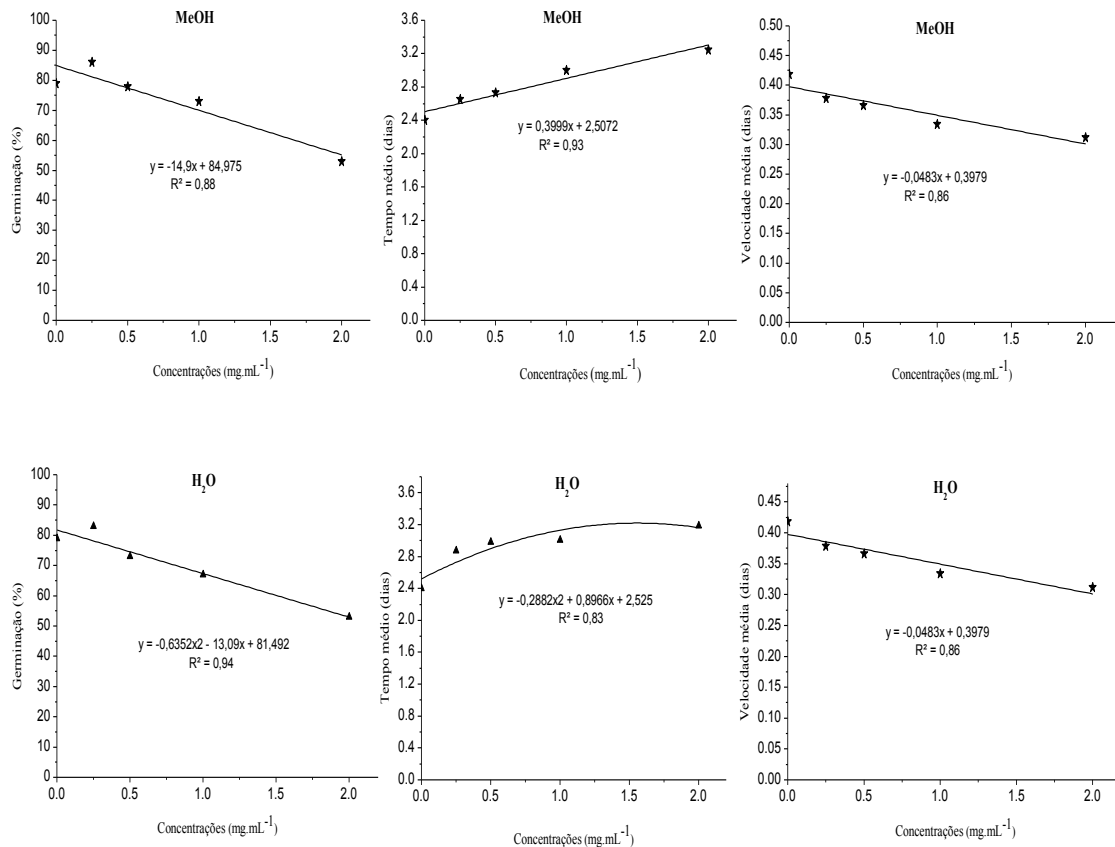


Figura 2. Germinação, tempo médio e velocidade média de sementes de capim-colonião (*Panicum maximum*) submetidas ao efeito dos extratos brutos de folhas de *Davilla elliptica* extraídos com metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O), nas concentrações de 0,25;0,5;1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

O crescimento da parte aérea em plântulas de amendoim-bravo sofreu estímulo no crescimento em relação ao controle negativo quando submetidos aos extratos de folha de *D.elliptica*. Resultado semelhante foi observado quando se avaliou as raízes dessa planta alvo crescida na presença dos extratos foliares de *D. elliptica*, no qual foi verificado estímulo do sistema radicular em relação ao controle (Figura 3). Excessão a esse fato foi observada nas raízes que cresceram na presença do extrato metanólico de folha, sobretudo, na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> com uma atividade inibitória de -50%, diferindo do herbicida comercial (-47%). Além disso, com o aumento da concentração

(0.25 mg.mL<sup>-1</sup> para 2 mg.mL<sup>-1</sup>), na presença do extrato de MeOH foi verificado um aumento na inibição em -30% (Figura 3).

No bioensaio de crescimento com plântulas de capim-colonião crescidas nas concentrações dos extratos foliares de *D. elliptica* foi observado, na parte aérea, valores de inibição que variaram de -10% (0.25 mg.mL<sup>-1</sup>) do extrato aquoso a -60% na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato acetônico. Os extratos de folha extraídos com AcOEt, MeOH e aquoso, na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>, produziram um efeito de inibição no crescimento da parte aérea de -31%, -51% e -30%, respectivamente (Figura 3). Com o aumento na concentração de 0.25 mg.mL<sup>-1</sup> para 2 mg.mL<sup>-1</sup> o extrato acetônico promoveu um acréscimo na inibição do crescimento da parte aérea de capim-colonião de -49%. Embora, os extratos foliares de *D. elliptica* exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de parte aérea em plântulas de capim-colonião os resultados produzidos pelos extratos vegetais apresentaram menor atividade fitotóxica em relação ao herbicida, no qual foi verificado um efeito inibitório da parte aérea entre -49% (0.25 mg.mL<sup>-1</sup>) a -75% (2 mg.mL<sup>-1</sup>) (Figura 3).

Em capim-colonião, o crescimento da raiz foi o parâmetro mais afetado pelos extratos vegetais de *D. elliptica*. A fitotoxicidade do sistema radicular foi observada entre os extratos de AcOEt, acetona, MeOH e aquoso, visto que a 2 mg.mL<sup>-1</sup> foram verificados os maiores valores de inibição no crescimento da raiz das plântulas de capim-colonião sendo, respectivamente, de -58%, -68%, -74% e -56% (Figura 3). Ademais, foi observado efeito de dose-resposta, com o aumento da concentração (0.25 mg.mL<sup>-1</sup> para 2 mg.mL<sup>-1</sup>), em que foram verificados, respectivamente um aumento na inibição de -34% (AcOEt), -37% (acetona), -53% (MeOH) e -35% (aquoso) (Figura 3).

Resultado semelhante ao herbicida comercial foi produzido pelo extrato de folha extraído com AcOEt, exceto na concentração 1 mg.mL<sup>-1</sup> em que o efeito inibidor do extrato sobre as raízes de capim-colonião (-48%), foi mais significativo do que o resultado obtido pelo herbicida (-39%) (Figura 3). Foi verificada atividade inibitória mais significativa, em relação ao herbicida comercial, nas raízes crescidas nas concentrações dos extratos acetônicos e metanólicos de folha de *D. elliptica*, uma vez que a atividade fitotóxica variou entre -31% a -68% (acetona), -21% a -74% (MeOH) e -29% a -59% (herbicida) (Figura 3).

Em geral, os extratos de folha de *D. elliptica* mostraram maior atividade fitotóxica sobre as plântulas de capim-colonião. A raiz foi o órgão vegetal mais

susceptível aos extratos vegetais. O maior potencial fitotóxico foi produzido pelos extratos acetonícos e metanólicos de folha de *D. elliptica* verificadas no crescimento de plântulas de capim-colonião (Figura 3).

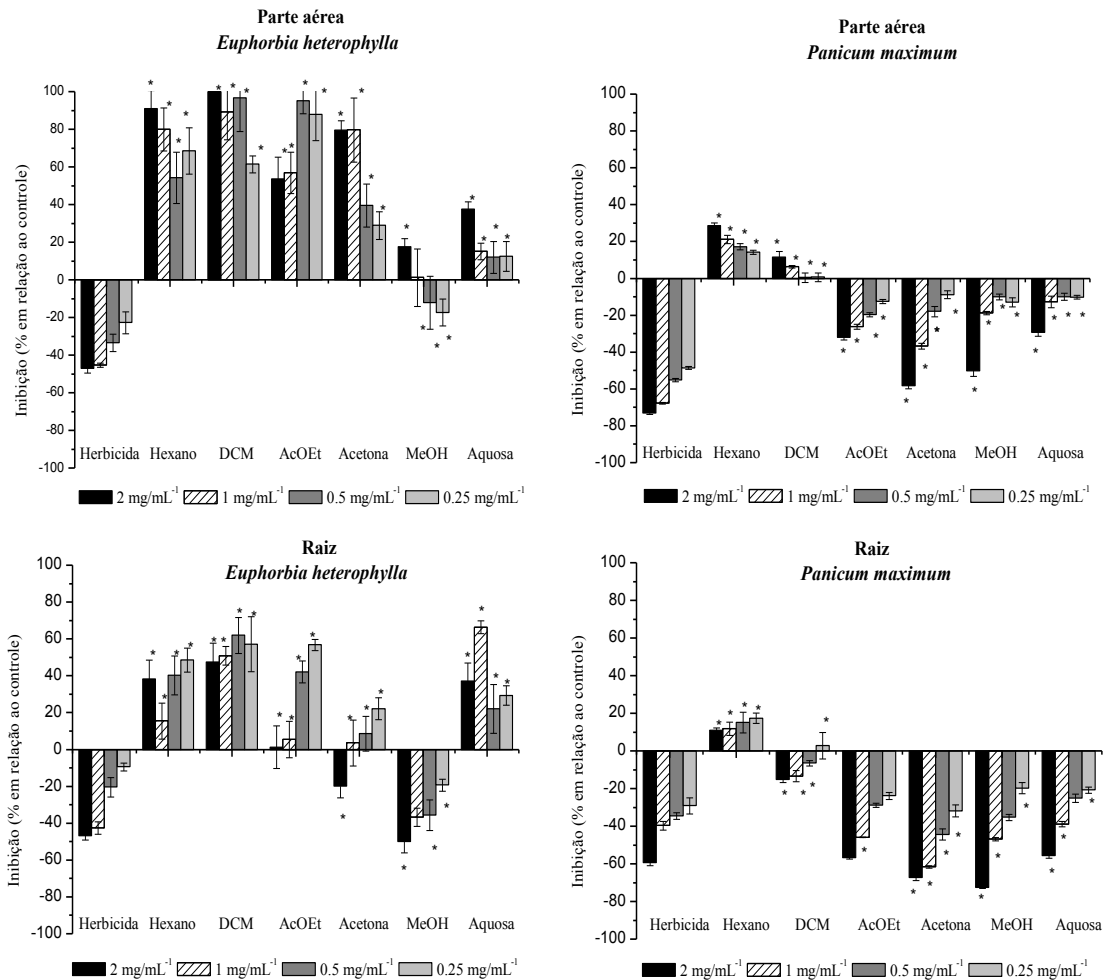


Figura 3. Efeito do herbicida GOAL e dos extratos de folha de *Davilla elliptica* sobre o crescimento de plântulas de *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo) e *Panicum maximum* (capim-colonião). Valores são expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle (água). Barras verticais representam o desvio padrão. (\*) Médias diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney, a 0,05 de significância.

O número de plântulas com algum tipo de anormalidade variou de acordo com o tipo de extrato e da espécie alvo. O percentual maior de plântulas com anormalidades foi observado no bioensaio com capim-colonião que mostrou uma variação de 36,2% a 100% de plantas anormais. Plântulas de amendoim-bravo

crescidas na presença dos extratos hexânico e diclorometânico apresentaram o menor percentual de plantas anormais 1,6% e 6,6%, respectivamente, diferindo significativamente dos demais extratos vegetais de *D. elliptica* (Tabela 4).

O extrato de folha de *D. elliptica* extraída com acetona foi o mais ativo em plântulas de amendoim-bravo, uma vez que 43% das plantas apresentaram anormalidades. Os resultados obtidos pelos extratos de folha AcOEt, MeOH e aquoso juntos somam 75% de plantas de amendoim-bravo com algum tipo de anormalidade (Tabela 4). Este resultado permite inferir que embora os extratos foliares de *D. elliptica* tenham exercido pouca influencia na germinação e no crescimento de amendoim-bravo (Tabela 2) e (Figura 3), provocaram algum tipo de anormalidade na parte aérea e/ou raiz dessa espécie alvo, comprometendo no final o seu desenvolvimento.

A ausência de plantas normais foi observada nos tratamentos contendo extrato de folha de AcOEt com 100% de plantas anormais. Em seguida, o extrato de DCM com 95% e o aquoso com 65% de anormalidades. O extrato metanólico apresentou o menor percentual de plântulas de capim-colonião anormais 36,2%, contudo, este resultado foi superior ao obtido para as plantas de amendoim-bravo submetidas ao mesmo extrato vegetal (Tabela 4).

Tabela 4. Percentagem de plântulas anormais de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-colonião (*P. maximum*) submetidas às concentrações dos extratos de folha de *Davilla elliptica* e tipos de anomalias identificados.

<i>Euphorbia heterophylla</i>		
Extratos	Plantas anormais (%)	Anomalias
Hexano	1,5 b	
DCM	6,6 b	
AcOEt	22,7 a	
Acetona	43 a	Raiz (necrosada, atrofiadas e sem raiz principal). Parte aérea (enrolamento do hipocótilo, atrofiado e necrose).
MeOH	23,2 a	
Aquoso	29,3 a	
<i>Panicum maximum</i>		
Hexano	48,1b	
DCM	95 a	
AcOEt	100 a	Raiz (atrofiadas, retorcidas, inversão gravitropica e sem raiz). Parte aérea (enrolamento do hipocótilo e atrofiado).
Acetona	38,7 b	
MeOH	36,2 b	
Aquoso	65 ab	

Valores em porcentagem seguidos por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Nas plântulas anormais foi identificada a presença de diferentes tipos de alterações na morfologia da parte aérea e/ou da raiz, como por exemplo; necrose na raiz e na parte aérea, enrolamento do hipocótilo, inversão gravitrópica, raízes retorcidas, ausência de raiz principal e atrofia (Figura 4). As plântulas de capim-colonião apresentaram o sistema radicular com maior porcentagem de danos quando submetidas aos extratos de folha de *Davilla elliptica*, uma vez que foi observado o maior número de plântulas com alterações no sistema radicular dessa espécie alvo (Figura 4).

As principais alterações observadas nas plântulas anormais de amendoim-bravo submetidas ação dos extratos de folha de *Davilla elliptica* foram à presença de sinais de necrose nas raízes, hipocótilo retorcido e raízes atrofiadas. O extrato metanólico foi o responsável pela maior parte das plântulas de amendoim-bravo com raízes necrosadas, correspondendo a 7% (Figura 4). O maior número de raízes com atrofia foi produzido pelo extrato de folha acetônico, em que 17,5% das plântulas de amendoim-bravo exibiram baixo desenvolvimento radicular. A presença de plantas com hipocótilo retorcido (27,5%) foi registrados para aquelas crescidas no extrato aquoso de folha de *D. elliptica* diferindo significativamente dos demais extratos vegetais (Figura 4).

No teste de crescimento com plântulas de capim-colonião foram observados seis diferentes tipos de anomalias (Tabela 4). Entretanto, na maioria dos casos, as plântulas anormais de capim-colonião crescidas na presença dos extratos vegetais de *D. elliptica* produziram efeitos danosos no sistema radicular, visto que foram observados, predominantemente a presença de raízes atrofiadas, raízes retorcidas e inversão gravitrópica (Figura 4).

O extrato aquoso foi responsável por 35% das plântulas de capim-colonião que exibiram raízes atrofiadas este resultado diferiu significativamente dos extratos de folha AcOEt (21%), acetona (15%) e metanólico (13%) (Figura 4). Entre os danos verificados nas plântulas de capim-colonião a presença de raízes retorcidas foi indubitavelmente a mais frequente, dado que na presença dos extratos de DCM e AcOEt foram verificados respectivamente 67% e 69% dos casos com raízes retorcidas (Figura 4). Não foram observadas diferenças significativas entre os extratos de folha de *D. elliptica* quando se avaliou a presença de raízes com inversão gravitrópica, plântulas com essa anormalidade foi mais frequente quando submetidas aos extratos hexânico (17%) e acetônico (20%) (Figura 4). Tanto as plântulas de amendoim-bravo

quanto as de capim-colonião apresentaram algum tipo de anormalidade quando submetidas aos extratos de folha de *D. elliptica*.

De acordo com os resultados obtidos no bioensaio de crescimento, as raízes de amendoim-bravo crescida na presença do extrato de folha extraída com MeOH produziu maior atividade inibitória, portanto o teste de anatomia das raízes de plântulas de amendoim-bravo corrobora com os resultados apresentados no teste de crescimento (Figura 3), uma vez que permitiu visualizar um dos efeitos desse extrato bruto a nível celular (Figura 6).

As concentrações de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato de folha MeOH produziu, nas raízes das plântulas de amendoim-bravo, os menores comprimentos médios das células do metaxilema ( $220 \text{ }\mu\text{m}$  e  $160 \text{ }\mu\text{m}$ , respectivamente), diferindo significativamente do controle (água) (Figura 5). As raízes submetidas a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  exibiram pouco efeito inibitório, já que o tamanho médio das células do metaxilema observado foi de  $430 \text{ }\mu\text{m}$  não diferindo do controle ( $520 \text{ }\mu\text{m}$ ) (Figura 5). Foi observado uma resposta dose-dependente do extrato de folha metanólico sobre o crescimento das células do metaxilema (Figura 6).

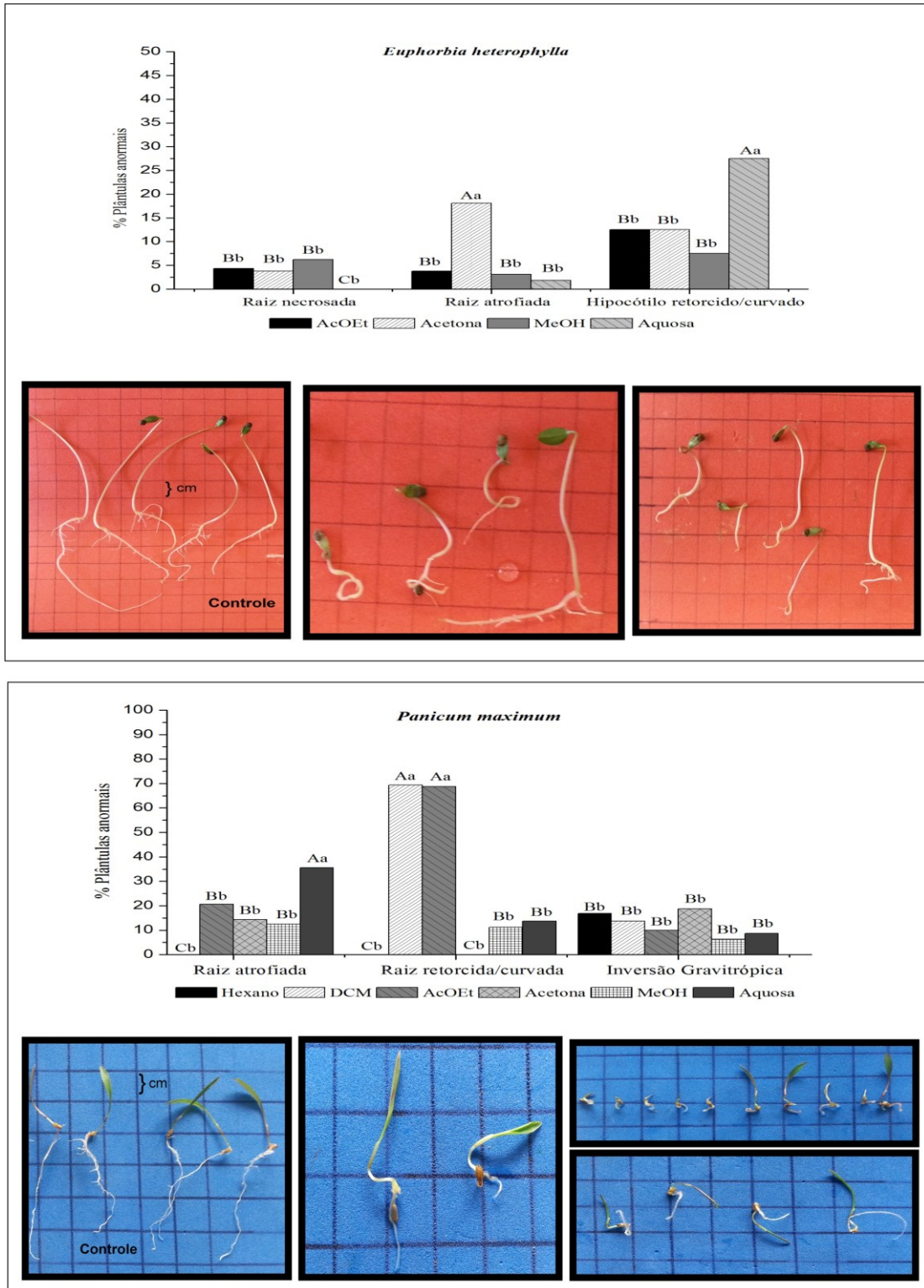


Figura 4. Principais anomalias encontradas nas plântulas anormais de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) e capim-colonião (*P. maximum*) submetidas ação dos extratos de folha de *Davilla elliptica*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para as anomalias e minúsculas para os extratos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. Escala= 1,0 cm.

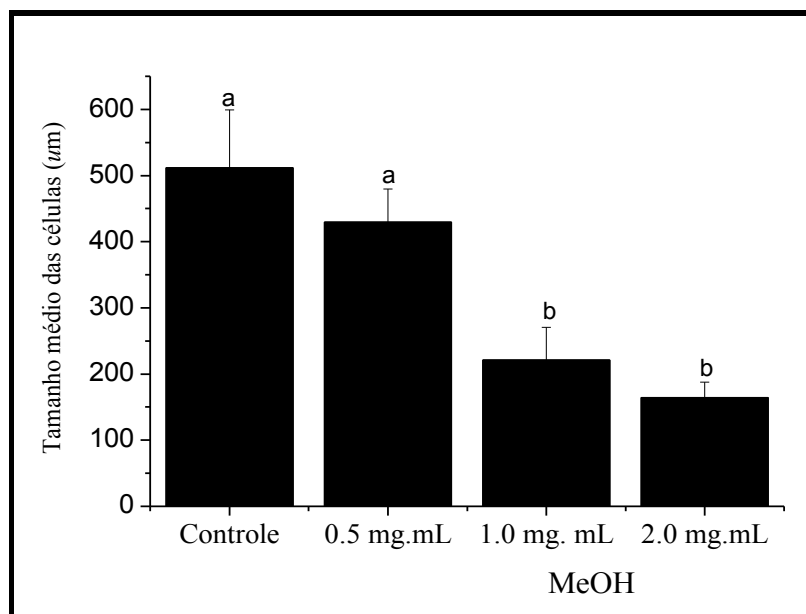


Figura 5. Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) crescidas em diferentes concentrações do extrato de MeOH de folhas de *Davilla elliptica*, e do controle (água). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

No controle teve predomínio para células pertencentes aos tamanhos entre 348 a 662  $\mu\text{m}$  correspondendo a 56% das células avaliadas, entretanto o maior número de observações (24%) exibiram células de 741  $\mu\text{m}$  (Figuras 6). O tamanho das células do metaxilema da raiz submetida a 0.5  $\text{mg.mL}^{-1}$  do extrato de folha extraído com metanol variou entre 230 a 800  $\mu\text{m}$  com predomínio de células (32%) com tamanho de 325 e 515  $\mu\text{m}$  (Figura 6). As raízes de amendoim-bravo que cresceram na presença das concentrações de 1 e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$ , exibiram maior atividade inibitória, uma vez que na dose de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  foi observado maior frequência de células com tamanhos entre 172 a 227  $\mu\text{m}$  que corresponde a 52% do numero total das células avaliadas e, na concentração de 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  com 60% entre 168 a 252  $\mu\text{m}$ . Além disso, nas concentrações 1 e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  foi observado os menores tamanhos nas células do metaxilema da raiz de amendoim-bravo, sendo 18% com 116  $\mu\text{m}$  e 6% com 84  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 6).



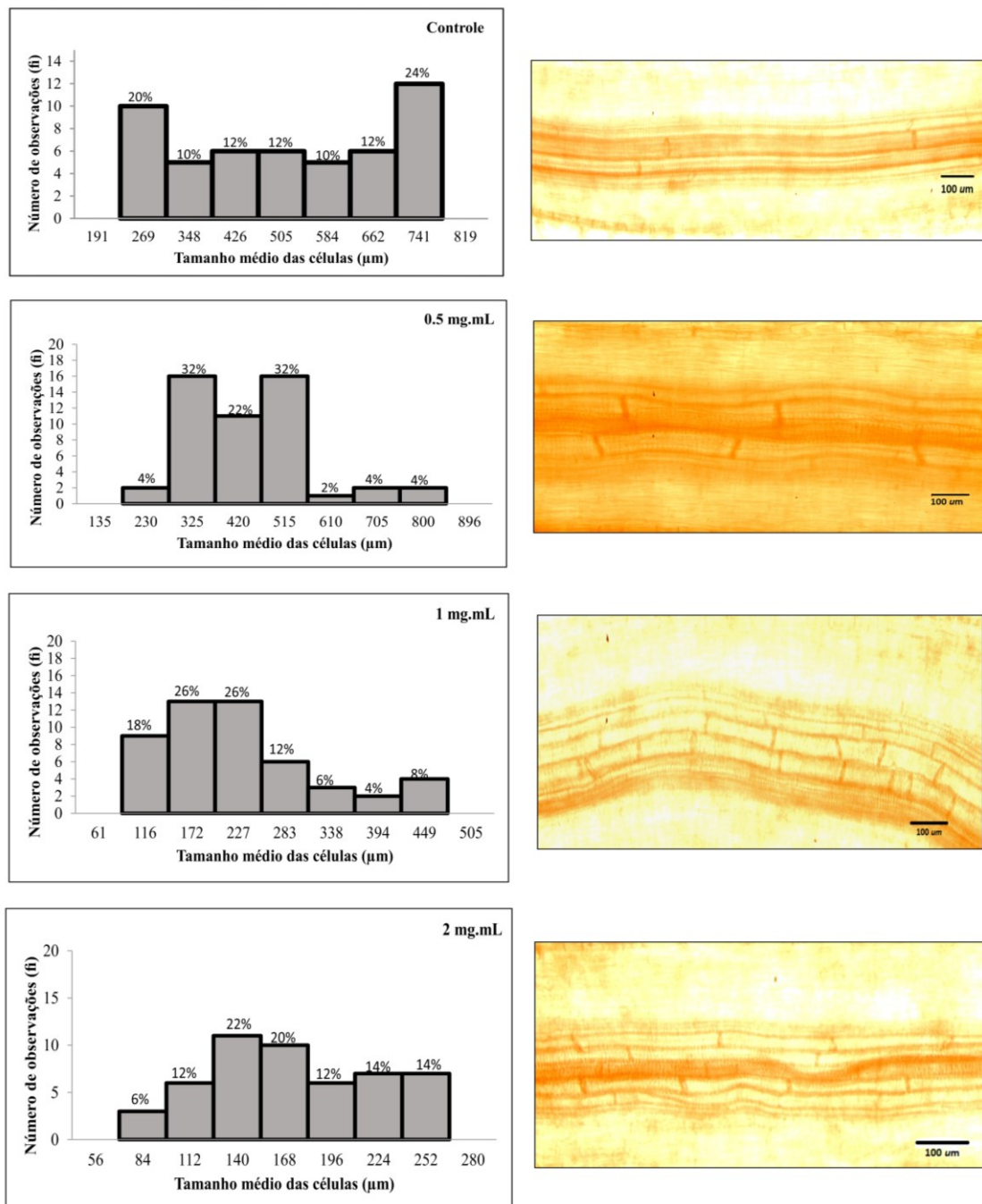


Figura 6. Histograma e fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de *E. heterophylla* crescidas no controle negativo e na presença das concentrações de 0.5, 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>, do extrato de MeOH das folhas de *D. elliptica*. O comprimento de cada barra é a frequência absoluta (fi). Sobre as colunas, a frequência percentual de classe. Escala=100μm.

#### 4. DISCUSSÃO

Os extratos de folha de *Davilla elliptica* apresentaram potencial fitotóxico nas espécies alvos avaliadas no presente estudo. A folha é parte da planta mais susceptível ao ataque de predadores, além disso, é o órgão vegetal mais ativo metabolicamente, portanto é razoável que elas apresentem maior diversidade de aleloquímicos com diferentes atividades biológicas (Jacobi; Ferreira, 1991; Borella; Pastorini, 2010), inclusive alelopáticas (Ribeiros et al., 2009). Nos extratos de folha de *D. elliptica* já foram detectados ácidos fenólicos, um ácido oxoretinóico, bem como uma série de flavonóides e O-glicosídeos (Rodrigues et al., 2008). Carlos et al. (2005), além de flavonóides e glicosídeos também isolaram triterpenos, esteróides, alcalóides, antraquinonas, ácido gálico, catequinas, taninos, saponinas e cumarinas. Sendo que alguns desses compostos são responsáveis por um grande número de propriedades farmacológicas e também apresentam propriedades aleloquímicas envolvidas na interação planta-planta (Zimdhal, 1999; Ferreira et al, 2000; Rodrigues et al., 2008). Por exemplo; os flavonóides representam uma importante classe de polifenóis e sua presença em vegetais parece estar relacionado com funções de defesa, controle de hormônios vegetais, inibição de enzimas e agentes alelopáticos (Alves; Santos, 2002). Ademais, a presença de flavonóides com propriedades fitotóxicas não é restrita a um determinado órgão vegetal, podendo aparecer também em outros órgãos da planta (Chaves et al., 2001), e no presente trabalho de pesquisa parece estar relacionado a atividade fitotóxica observada nos teste de germinação e crescimento.

Sabe-se que a germinação é o estágio do desenvolvimento vegetal menos sensível a ação dos aleloquímicos (Ferreira; Áquila, 2000). O presente trabalho corrobora com essa afirmação, já que foi o parâmetro avaliado que menos sofreu efeito dos extratos de folha de *D. elliptica*. A germinação sofre alteração quando na presença dos aleloquímicos resulta em efeitos sobre: a permeabilidade de membranas; a transcrição e tradução do DNA, o funcionamento dos mensageiros secundários, a respiração por sequestro de oxigênio (fenóis), a conformação de enzimas e de receptores ou pela combinação de todos (Ferreira; Áquila, 2000).

A maior atividade fitotóxica observada pelos extratos de folha de *D. elliptica* extraídas com solventes mais polares permite inferir que, provavelmente na natureza esses compostos aleloquímicos são liberados por lixiviação, em que a água da chuva ou gotas de orvalho transporta essas substancias para o solo (Borgati, 2010).

Substâncias fitotóxicas que são solúveis em água são transportadas da parte aérea e das raízes ou de resíduos vegetais em decomposição, podendo interferir no desenvolvimento de plantas vizinhas (Almeida et al., 2008). As saponinas, os taninos e os flavonoides, presentes em extratos de folha de *D. elliptica* (Carlos et al., 2005; Rodrigues et al., 2008) estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos fitotóxicos sobre outras plantas, podendo ser liberados em condições naturais, já que são hidrossolúveis (Rice, 1984; Ferreira e Aquila, 2000).

Ademais, os efeitos dos aleloquímicos podem ser observados não somente no número total de sementes germinadas, mas também na distribuição temporal da germinação, uma vez que provoca retardo do tempo médio da germinação (Ferreira e Aquila, 2000). A velocidade média de germinação quantifica o número de sementes germinadas por dia (Ferreira; Borghetti, 2004) e para Rodríguez (2003), permite avaliar o efeito de compostos em baixas concentrações quando estas não são tão eficazes para inibir a germinação. As plantas que apresentam germinação mais lenta podem desenvolver tamanho reduzido, menor capacidade de competir por recursos e, portanto menores chances de se estabelecer no ambiente (Souza et al., 2010). Assim como no presente estudo, outros trabalhos de pesquisas, utilizando outras espécies doadoras e alvo, também observaram alterações significativas na velocidade média e no tempo médio da germinação (Souza et al., 2010; Imatomi et al., 2013; Costa et al., 2015).

Os extratos foliares de *D. elliptica* produziram pouco efeito sobre os parâmetros de germinação avaliados em amendoim-bravo. No presente trabalho o capim-colonião foi a espécie alvo mais sensível aos extratos vegetais. Compostos com propriedades alelopáticas apresentam comportamento diferenciado sobre o desenvolvimento de uma planta receptora podendo em certas concentrações provocar alterações em uma espécie ou causar menos ou nenhuma inibição no desenvolvimento de outra (Xuan et al., 2005). As diferenças na sensibilidade exibidas por espécies alvo dependem de características fisiológicas, bioquímicas e genéticas na tolerância aos compostos que são específicas para cada espécie (Kobayashi, 2004). Além disso, a influência dos compostos com atividades alelopáticas sobre a germinação das sementes depende do tamanho e da permeabilidade do tegumento (Hanley; Whiting, 2005). Sementes grandes de espécies infestantes, geralmente são menos sensíveis aos

aleloquímicos, visto que a fitotoxicidade pode ser amenizada devido à baixa absorção, translocação ou degradação mais rápida desses compostos (Dayan, 2006).

A maior sensibilidade no desenvolvimento da raiz das espécies alvo crescidas nos extratos foliares de *D. elliptica* verificada no presente estudo corrobora com as informações presentes na literatura. Segundo Hoffmann et al. (2007) o sistema radicular das plantas é mais susceptível a ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende das divisões celulares, se estas forem inibidas o desenvolvimento normal será comprometido. Esses compostos oriundos do metabolismo primário ou secundário das plantas podem desencadear mudanças fisiológicas na relação água-plantas na rizosfera, promovendo distúrbios nas membranas das células das raízes causando diminuição significativa da biomassa vegetal e, conseqüentemente redução da área foliar (Reigosa et al., 2006). Os resultados do presente estudo corrobora com outros trabalhos de pesquisa registrados na literatura (Grisi et al., 2013; Grisi et al., 2014; Pereira et al., 2015; Anese et al., 2015; Habermann et al., 2015), em que a raiz foi o órgão mais afetado pela ação de extratos de plantas.

Assim como no teste de germinação, o crescimento de plântulas de capim-colômbio e de amendoim-bravo foi mais afetado quando crescidas nos extratos obtidos com os solventes mais polares, sobretudo o metanol e acetona. Os solventes metanol e acetona extraem compostos de maior polaridade como, por exemplo; os compostos fenólicos (Shi et al., 2005), já identificados em extratos de folha *D. elliptica* (Alves; Santos, 2002; Rodrigues et al., 2008). Este tipo de composto quando presente nos vegetais atua no controle de fito-hormônios e altera cadeias enzimáticas (Alves; Santos, 2002), além de afetar a elasticidade da parede celular e de bloquear a respiração mitocondrial (Weir et al., 2004; Oliveira et al., 2014). Não foram encontrados trabalhos de pesquisa que se refere ao potencial herbicida da espécie *D. elliptica* em espécies infestantes e sua possível indicação como fonte de agroquímicos naturais. Contudo, corroborando com o presente estudo diferentes pesquisadores, registraram atividades biológicas promissoras na fração metanólica de folhas dessa espécie. Carlos et al. (2005) observou o efeito imunoestimulatório em ratos para os extratos metanólico e etanólico das folhas. Michelin et al. (2005) descreveu a atividade antimicrobiana do metanol bruto extraídos das partes aéreas de *D. elliptica*. Conforme Michelin et al. (2005) nos extratos metanólicos da folha de *D. elliptica* foram isolados taninos, ácido gálico, catequinas e alguns flavonóides que, segundo Chaves et al.,

(2001), possui propriedades fitotóxicas. Assim sendo, os compostos presentes no extrato metanólico de *D. elliptica* apresentam diferentes atividades biológicas.

A redução observada no crescimento da raiz de amendoim-bravo provocada pelo tratamento com o extrato foliar de metanol pode estar associada com a inibição do alongamento das células, como foi observado para as células do metaxilema. Assim sendo, os compostos alelopáticos presentes no extrato metanólico de folha de *D. elliptica* podem interferir no equilíbrio de concentração de fito-hormônios, tais como; auxinas, etileno e citocininas. (Graña et al., 2013). Outros pesquisadores observaram a relação entre a inibição do crescimento da raiz de diferentes espécies alvo e a redução do alongamento das células do metaxilema (Anese et al., 2014; Grisi et al., 2014; Pereira et al., 2015; Anese et al., 2015).

As substâncias com propriedades alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais. A avaliação da normalidade das plântulas é um parâmetro importantíssimo, já que a presença de anormalidades pode comprometer a capacidade das plântulas de se estabelecer no ambiente (Brasil, 2009). As espécies alvo avaliadas no presente estudo apresentaram alterações morfológicas tanto na parte aérea quanto na raiz. O capim-colonião mostrou ser mais susceptível aos extratos vegetais das folhas de *D. elliptica* apresentando maior número de plântulas com anormalidades. Diferença na susceptibilidade de espécies alvo avaliadas em estudos fitotóxicos indica que não há um padrão de atividade, as espécies testadas respondem de forma distinta aos compostos de origem vegetal (Kobayashi, 2004; Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2014).

As raízes das espécies alvo testadas apresentaram maior número de alterações morfológicas. Devido o contato direto e prolongado com os extratos vegetais o sistema radicular se mostra mais sensível aos aleloquímicos (Correia et al., 2005). A presença de anormalidades em raízes parece ser um bom parâmetro para registro de fitotoxicidade, sendo muito comum a presença de danos ou alterações nos tecidos radiculares (Rabêlo et al., 2008; Pires; Oliveira, 2011; Habermann et al., 2015). Além de danos ao sistema radicular, as plântulas de amendoim-bravo também exibiram hipocótilo retorcido. Corroborando com o presente estudo Habermann et al. (2015) identificou em plântulas de amendoim-bravo a presença na parte aérea de hipocótilo retorcido. Embora, a parte aérea apresente uma camada de cutícula protetora, ausentes nas raízes primárias, esse órgão pode sofrer os efeitos da ação dos aleloquímicos (Yoshimura et al., 2011).

As espécies receptoras responderam de forma distinta aos extratos de folha de *D. elliptica*. Os extratos de *D. elliptica*, em linhas gerais, ao atrasarem a germinação das sementes e reduzirem o crescimento inicial das plântulas, apresentam-se como uma alternativa futura no controle de plantas infestantes. Assim sendo, acreditamos que os aleloquímicos presentes nos extratos foliares de *D. elliptica* tem grande potencial fitotóxico para futuros estudos que visem o isolamento e a identificação de compostos promissores.

## 5. CONCLUSÕES

Os extratos de folha de *Davilla elliptica* produziram atividade fitotóxica sobre o desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla* e de *Panicum maximum*.

O extrato metanólico de folhas de *Davilla elliptica* apresentou potencial fitotóxico sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla* e *P. maximum*.

Os extratos acetônico, metanólico e aquoso de folha de *D. elliptica* inibiram a porcentagem de germinação, tempo médio e a velocidade média de germinação de sementes de *P. maximum*.

Os extratos vegetais de *D. elliptica* não afetaram os padrões de germinação de *E. heterophylla*.

O capim-colonião foi a espécie alvo mais afetada pelos extratos de folha de *D. elliptica* em todos os parâmetros avaliados.

O menor crescimento radicular observado nas plântulas de amendoim-bravo pode estar relacionado com a diminuição no alongamento das células do metaxilema.

## 6. REFERENCIAS

AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.52, p.4595–4603, 2004.

AIBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinales* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrason Sonochem**.v.11, n.(3-4), p.261-265, 2004.

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

ALVES, S. M.; SANTOS, L. S. Natureza química dos agentes alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Eds.). Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. p.25-47.

ANESE, S.; GRISIP. U., JATOBÁ, L. J.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V. C.; GUALTIERI, S. C. J. Seasonal variation in phytotoxic of *Drymis brasiliensis* Miers. **Idesia**. v.32, n.3, p.109-116, 2014.

ANESE, S; JATOBÁ, L. J; GRISI, P. U; GUALTIERI, S. C. J; SANTOS, M. F. C; BERLINCK, R. G. S. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drymys brasiliensis* Miers roots. **Industrial Crops and Products**. v.74, p. 28–35, 2015.

ARANTES, V. P.; SATO, D. N.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; LEITE, C. Q. F. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Ciências Farmaceutica Básica Aplicada**, v. 26, n.3, p. 195-198, 2005.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência agrotecnologia** v. 34, n. 5, p. 1129-1135, 2010.

BORGATI, T. F. Síntese e atividade alelopática de carboxamidas indólicas. Belo Horizonte: UFMG, 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudanças. Regras para análise de sementes. Brasília: LANARV/SNAD/MA, p.188, 2009.

CALLAWAY, R. M.; RIDENOUR, W.M. Novelweapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**. v. 2, p. 436 – 443, 2004.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO, JR. C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.15, p.44-50, 2005.

CARVALHO, P. G. B.; BORGUETTI, F.; BUCKERIDGE, M. S.; MORHY, L.; FERREIRA, FILHO EXF. Temperature-dependent germination and endob-mannase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v.13, n.2, p.139-148, 2001.

CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influencia de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**. v.35, p.498-503, 2005.

CORRÊA, P. G.; PIMENTEL, R. M. M.; CORTEZ, J. S. A.; XAVIER, H. S. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciencias Cultura**. v.60, p.54–57, 2008.

COSTA, SAMARA MARIA LOPES, FERREIRA, MÁBELE DE CÁSSIA, PASIN, LILIANA AUXILIADORA AVELAR PEREIRA. Avaliação do potencial alelopático de ingá sobre o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas. **Acta Iguazu**. v.4, n.1, p. 1-13, 2015.

COUTINHO, L. M. O bioma do cerrado. In: Klein AL (Org) Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Editora da Unesp, São Paulo, 2002.

CHAVES, N.; SOSA, T.; ESCUDERO, J.C. Plant growth inhibiting flavonoids in exudates of *Cistus ladanifer* and in associated soils. **Journal of Chemical Ecology**. v.27, n.3, p.623-631, 2001.

DA SILVA D. M, BATALHA M. A. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology**. v.212, p.181–193, 2011.

DAYAN, F.E. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. **Planta**. v.224, p.339–346, 2006.

FERNANDEZ, C.; MONNIER, Y.; ORMENO, E.; BALDY, V.; GREFF, S.; PASQUALINI, V.; ME'VY, J. P.; BOUSQUET-ME'LOU, A. Variations in allelochemical composition of leachates of different organs and maturity stages of *Pinus halepensis*. **Journal Chemical Ecology**. v.35, p.970–979, 2009.

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, M. L.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; FERREIRA, R. C. Avaliação da atividade herbicida de algumas quinonas. **Acta Scientiarum**. v. 22, 2000, p. 999-1003.

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

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, A. A. JR; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, JR.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, JR.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: Kigel J, Galili G (eds) Seed development and germination. New York, Marcel Dekker, p. 629–644, 1995.



GATTI, A. B.; ANDRADE PEREZ, S. C. J. G.; FERREIRA, A. G. Avaliação da Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de Folhas de Espécies de Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 174-176, 2007.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN M.; DE ANDRADE G.; PEREZ, S.C. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artistolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanic Brasilian**. v.24, p.454-461, 2010.

GRAÑA, E., SOTELO, T., DÍAZ-TIELAS, C., ARANITI, F., KRASUSKA, U., BOGATEK, R., REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. **Journal Chemical Ecology**. v.39, p.271-282, 2013.

GRISI, P. U., GUALTIERI, S.C.J., PEREIRA, C.V., FORIM, M. R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extracts on weed control. **Planta Daninha**. v.31, p. 239-248, 2013.

GRISI P. U.; FORIM M. R.; COSTA E. S.; ANESE S.; FRANCO, M. F.; EBERLIN M. N.; GUALTIERI S. C. J. Phytotoxicity and Identification of Secondary Metabolites of *Sapindus saponaria* L. Leaf Extract. **Journal Plant Growth Regulation**. p.1-11, 2014.

HABERMANN, E.; PEREIRA, V. C.; IMATOMI, M.; PONTES, F. C.; GUALTIERI, S. C. J. Fitotoxicidade e fracionamento biodirigido dos extratos de cascas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O.Berg (Myrtaceae). **Biotemas**, v.28,n.1, p.37-44, 2015.

HANLEY, M. E.; WHITING, M. D. Insecticides and arable weeds: effects on germination and seedling growth. **Ecotoxicology**. v.14, p.483-490, 2005.

HARIDASAN, M. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. In: McClain ME, Victoria RL, Richey JE (eds) Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world. Oxford University Press, New York. 2001.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S. das; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. da L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n. 1, p. 11-21, 2007.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta botânica brasilica**. v. 27, n. 1, p.54-61, 2013.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, p. 735-741, 2010.

JACOBI, U. S.; FERREIRA, A. G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.26, p.935-943, 1991.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1-7, 2004.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropedica, EDUR, 1997.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 246-251, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. v.1, p.147-155, 2005.

MARQUIS, R. J.; MORAIS, H. C.; DINIZ, I. R. Interactions among cerrado plants and their herbivores: unique or typical. In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds) The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna. Columbia University Press, New York. 2002.

MICHELLIN, D. C., IHA, S., RINALDO, M., SANNOMYA, D., SANTOS, M., VILEGAS, L.C., SALGADO, V. H. R. N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.209–211, 2005.

MOREIRA, A. Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. **J. Biogeogr.**v.27, p.1021–1029, 2000.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry**. 12:839–855, 2013.

OLIVEIRA, A. K. M.; RIBEIRO, J. W. F.; MATIAS, R.; GUSMÃO, D. H.; PEREIRA, K. C. L. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rhedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**. v.9, p.550-553, 2011.

OLIVEIRA, A. K. M.; PEREIRA, K. C. L.; MULLER, J. A. I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**. v.32, p.41-47, 2014.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, editors. Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology. Humana Press; Estados Unidos. p.269-273, 2005.

PEREIRA, Viviane De Cassia, ANESE, Simoni, IMATOMI, Maristela, GRISI, Patrícia Umeda, MONTE CANEDO, Enzo, JULIANO GUALTIERI, Sonia Cristina, RODRIGUES-FILHO, Edson. ALLELOPATHIC POTENTIAL OF *Serjania lethalis*: EVIDENCE FROM *Sesamum indicum*. **Acta biology Colombia**. v.20, n.1, p.31-37, 2015.

PIMENTEL-GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 477p. 1990.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA, J. R. Biologia e Manejo de Plantas daninhas,. p. 124, 2011.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**. v. 29, p. 1-11, 2006.

RABÊLO, G. O.; FERREIRA, A. L. da S.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Bidens pilosa* L. na germinação e no desenvolvimento de espécies cultivadas. **Revista Científica da Faminas**, v. 4, n. 1, p. 33-43, 2008.

REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. Allelopathy: a physiological process with ecological implications. Holanda: Springer. p. 127-139, 2006.

Regras para análise de sementes (RAS). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; p. 399, 2009.

RIBEIRO, JOSÉ PEDRO N.; MATSUMOTO, REGINALDO S.; TAKAO, LEANDRO K.; VOLTARELLI, VALQUÍRIA M. e LIMA, MARIA INÊS S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira Botânica**. v.32, n.1, p.183-188, 2009.

RICE, E.L. 1984. Allelopathy. 2ª ed. New York, Academic Press.

RODRIGUES VEG, CARVALHO DA. Plantas medicinais no domínio dos cerrados.Lavras/MG: UFLA, 2001.

RODRIGUÉZ, M. T. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**. v. 41, n. 3, p. 2-3. 2003.

RODRIGUES, CLENILSON M.; RINALDO, DANIEL; SANNOMIYA, MIRIAM; SANTOS, LOURDES C. DOS; MONTORO, PAOLA; PIACENTE, SONIA; PIZZA, COSIMO; VILEGAS, WAGNER. High-performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemistry Anal**. v.19, p.17–24,2008.

SCOGNAMIGLIO, MONICA; D'ABROSCA, BRIGIDA; ESPOSITO, ASSUNTA; PACIFICO, SEVERINA; MONACO, PIETRO; FIORENTINO, ANTONIO. Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. **Phytochemistry**. v.12, p.803–830, 2013.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA, JR M. C.; MEDEIROS, M. B. (Org.) Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Brasília/DF: WWF, 2001.

SOARES M. L.; REZENDE M. H.; FERREIRA H. D.; FIGUEIREDO A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA M.T.F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). 2005.

SOUZA, F. M.; GANDOLFI, S.; PEREZ, S. C. J. G. A.; RODRIGUES, R. R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae), **Acta Botânica Basílica**. v.24, p.169-174, 2010.

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. **Plantas Daninhas**. v.28, n.3, p.689-697, 2010.

SHI, J.; NAWAZ, H.; POHORLY, J.; MITTAL, G.; KAKUDA, I.; JIANG, Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. **Food Reviews International**, v. 21, p. 139-166, 2005.

TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L. C.; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim-tanzânia. **Revista brasileira de Sementes**. v. 32, p. 80-87, 2010.

XUAN, T. D.; SHINKICHI, T.; KHANH, T. D.; CHUNG, I. M. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, p.197-206, 2005.

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.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, 2 ed. Edited by Wink M. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

YOSHIMURA, H.; SAWA, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal of chemical Ecology**, v.37, p.320-328, 2011.

ZIMDHAL, R. L. Fundamentals of weed science. New York: Academic Press, 1999. 556p.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. v. 3, p. 1-7, 2008.

## CAPÍTULO 4

**Atividade larvicida e ovicida de extratos de *Ocotea pulchella* Nees & Mart. e *Davilla elliptica* St. Hill sobre o *Aedes aegypti* L.**

Atividade larvicida e ovicida de extratos de *Ocotea pulchella* Nees & Mart. e *Davilla elliptica* St. Hill sobre o *Aedes aegypti* L.

## RESUMO

*Aedes aegypti* é responsável pela transmissão dos vírus da dengue, febre amarela, chikungunya e zika. O controle de mosquitos vetores por meio de inseticidas de origem botânica tem demonstrado eficiência sobre ovos, larvas e adultos. Desse modo, o presente projeto teve como objetivo avaliar a atividade larvicida e ovicida dos extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* foram ensaiados em *A. aegypti*. As larvas terceiro instar foram submetidas às concentrações de 3, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> de cada um dos extratos. O efeito ovicida foi avaliado utilizando as concentrações letais obtidas no teste larvicida. Os dados de mortalidade foram submetidos à Análise de Probit para a determinação das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. A mortalidade larval máxima foi obtida pelos extratos hexânico e diclorometânico de raiz de *O. pulchella* na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup>. O efeito acumulado dos extratos foi mais acentuado nas larvas expostas aos extratos diclorometânico de folha e de caule de *O. pulchella* após 48 h ( $R_2=0,94$  e  $R_2=0,97$ ). Os menores valores das CL<sub>50</sub> (0,009 mg.mL<sup>-1</sup>) e CL<sub>90</sub> (0,040 mg.mL<sup>-1</sup>) foram estimados para larvas submetidas ao extrato de raiz de *O. pulchella* obtido com diclorometano. A taxa de eclosão foi afetada pelo extrato diclorometânico de raiz e o tempo médio e a velocidade média de germinação foram alterados pelo extrato hexano da raiz de *O. pulchella*. O extrato diclorometânico de raiz de *Ocotea pulchella* exibiu maior potencialidade no controle de larvas e ovos de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** Larvas, ovos, controle, bioinseticida, *Aedes aegypti*.

Larvicidal and ovicidal activity extracts from *Ocotea pulchella* Nees & Mart.  
and *Davilla elliptica* St. Hill on the *Aedes aegypti* L.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is responsible for transmitting dengue virus, yellow fever, chikungunya and zika. Control of vector mosquitoes by means of botanical origin of insecticides has demonstrated efficacy on eggs, larvae and adults. Thus, larvicidal and ovicidal activity of the extracts of leaf, stem and root *Ocotea pulchella* and *Davilla elliptica* were tested *Aedes aegypti*. Bioassays were carried according the method of the World Health Organization. L3 larvae were treated with concentrations; 3, 2, 1, 0.5 and 0.25 mg.mL<sup>-1</sup>. The ovicidal effect was evaluated using the lethal concentrations obtained from test larvicide. Mortality data were submitted to Probit analysis for determining the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>. Larval mortality was produced by the hexane and dichloromethane root extracts from *O. pulchella* at a concentration 3 mg.mL<sup>-1</sup>. The cumulative effect of the extracts was sharper in larvae exposed dichloromethane extracts from leaf and stem after 48 hours (R<sup>2</sup> = 0.94 and R<sup>2</sup> = 0.97). The lowest values of LC<sub>50</sub> = 0.009 mg.mL<sup>-1</sup> and LC<sub>90</sub> = 0.040 mg.mL<sup>-1</sup> were estimated for the larvae subjected root extract from *O. pulchella* dichloromethane. The hatch rate and TME and VME were affected by dichloromethane from root extract have been changed the hexane extract of *O. pulchella* root. Extract root of dichloromethane from *Ocotea pulchella* showed higher potential to control larvae and eggs of *Aedes aegypti*.

**Keywords:** larvae, eggs, control, botanical insecticide, *Aedes aegypti*.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* afeta milhões de pessoas em todo mundo sendo o principal responsável pela transmissão dos vírus que provocam a dengue, febre amarela, chikungunya e a zika, sendo assim um problema de saúde pública mundial (Vasconcelos, 2015). O principal método de controle é comumente realizado sobre as larvas, por meio de pesticidas sintéticos (Salokhe et al., 2010). A busca de novas estratégias, como produtos de origem vegetal, para controlar insetos vetores de doenças é urgente devido à prevalência de resistência do vetor aos inseticidas sintéticos, problema de toxicidade, por serem não biodegradáveis, além dos efeitos sobre organismos não-alvo (Jantan et al., 2005).

Nos últimos anos, houve um aumento global tanto na distribuição de *A. aegypti* quanto da epidemia do vírus da dengue, além de novos casos de doenças provocadas pelos vírus zika e chikungunya (Vasconcelos, 2015). A emergência e re-emergência de epidemias provocadas por populações de *A. aegypti* é devido a múltiplos fatores, tais como aumento da população, maior migração de pessoas, aumento da temperatura e umidade, falta de infraestrutura, acúmulo de resíduos no ambiente, como objetos descartáveis liberados de forma inadequada, armazenamento de água em recipientes abertos, além da falta de recursos financeiros para o controle e medidas preventivas mais eficazes (Hopp; Foley, 2003; Mackenzie et al., 2004; Abbas et al., 2014).

Em geral, o controle de espécies de insetos vetores de doenças tem sido realizado, principalmente, por meio de inseticidas sintéticos. Embora, de eficácia comprovada, o uso demasiado desses compostos químicos, proporcionou uma seleção de populações resistentes a determinados produtos de maneira que aumentou o número de casos de infecções provocadas pelo *A. aegypti* (Candido et al., 2013). Pesquisadores tem demonstrado o desenvolvimento da resistência em *A. aegypti* a produtos químicos sintéticos, como organofosforados e carbamatos (Rawlins, 1998; Olivares-Pérez et al., 2011). O desenvolvimento de populações de *A. aegypti* resistentes foram relatados em diferentes continentes e países, como na América Latina (Rodríguez et al., 2007; Macoris et al., 2007; Lima et al., 2011) nas Antilhas Francesas (Marcombe et al., 2009), África (Constante et al., 2012) e Malásia (Rong et al., 2012). Os metabólitos secundários sintetizados por plantas, incluindo terpenos, flavonóides, alcalóides, fenóis entre outros compostos relacionados são apontados por suas propriedades inseticidas (Adeyemi, 2010). Portanto, o uso de compostos oriundos do metabolito



secundário de plantas com potencial inseticida tem despertado o interesse por estudos com extratos de plantas com o propósito de reduzir os danos gerados pelo uso de compostos sintéticos, no meio ambiente e na saúde humana (Candido et al., 2013).

A possível coevolução entre insetos e plantas, provavelmente foi um dos fatores que permitiu aos vegetais o desenvolvimento de estratégias de defesa contra o ataque desses invertebrados, entre elas a defesa química com a produção de metabólitos secundários com propriedades repelentes, inseticidas e impalatáveis (Freitas et al., 2009; Candido et al., 2013).

Neste contexto, foram selecionadas duas espécies de diferentes famílias para avaliação do potencial inseticida utilizando como espécie alvo *Aedes aegypti*. A primeira com cerca de dez gêneros, a espécie *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. A *D. elliptica* é tipicamente encontrada no Cerrado, onde há várias outras espécies pertencentes a esse gênero (Soares et al., 2005). Entre as atividades biológicas já identificada nessa espécie está o efeito anti-inflamatório e antisséptico (Silva et al., 2001), diurético, adstringente, tônico, laxativo e sedativo (Rodrigues e Carvalho, 2001). No entanto, não há estudos sobre atividade inseticida de *D. elliptica* em *A.aegypti*. A segunda espécie *Ocotea pulchella* (Lauraceae), ocorre na América do Sul e no Brasil está distribuída nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Quinet et. al., 2010). O gênero *Ocotea* apresenta um grande número de espécies com diferentes propriedades medicinais (Lorenzi, 2002), antirreumáticas, purgativa, tônica, herbicida (Borges, 1993; Carmo, 2002; Camargo et al. 2013; Carmo, 2007) e inseticida (Araujo, 2012).

A presença de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas comerciais e o aumento no número de casos por dengue, chikungunya e zika, tem despertado a busca por alternativas efetivas e de baixa toxicidade para o meio ambiente no controle desse vetor (Jantan et al., 2005), como a investigação de extratos de plantas e substâncias naturais com atividade larvicida. Logo, avaliou-se o potencial larvicida e ovicida de extratos de folha, caule e raiz de *D. elliptica* e *O. pulchella* em *A. aegypti*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta da população de *Aedes aegypti*

Amostras da população de *A. aegypti* foram coletadas nos municípios de Campina Grande ( $7^{\circ} 13' 51''$  S,  $35^{\circ} 52' 54''$  O) e Esperança ( $7^{\circ} 01' 59''$  S,  $35^{\circ} 51' 26''$  O), Paraíba. As coletas e o estabelecimento de linhagens em laboratório ocorreram entre os meses de Janeiro e Agosto de 2013. Os ovos foram coletados por meio de 50 ovitrampas (Figura 1), que foram instaladas no intra e peridomicílio de residências distribuídas em 10 bairros, onde foram instaladas cinco armadilhas por bairro. O material coletado em campo foi conduzido para o laboratório de Entomologia do Núcleo de Sistemática e Bioecologia de Insetos, Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

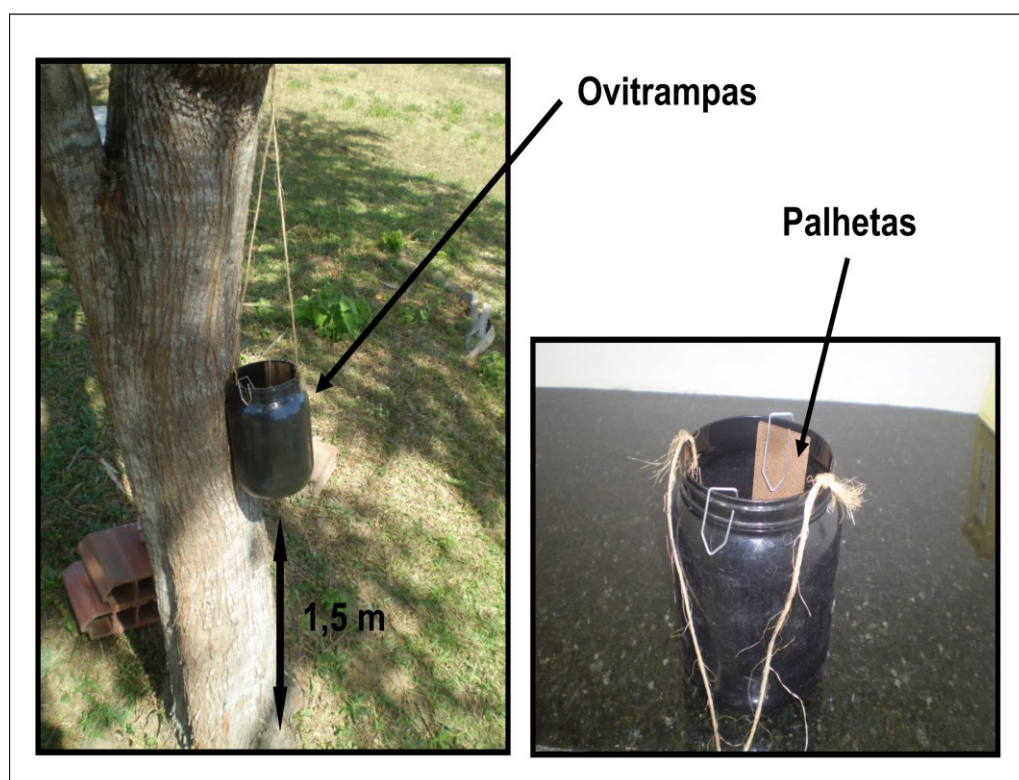


Figura 1. Armadilha para coleta de ovos de *Aedes aegypti* em campo. Autor: Lafayette P. Candido, 2014.

## 2.2 Criação e manutenção de *A. aegypti* em laboratório.

Os bioensaios foram conduzidos em laboratório em temperatura ambiente. As palhetas de Eucatex, contendo ovos de *A. aegypti* provenientes do campo foram colocadas para secar por 48 h e, em seguida, acondicionadas em bandejas plásticas de cor branca (40 x 27 x 7,5 cm) com um terço de sua capacidade preenchida com água destilada. Após a eclosão, ração para peixe ornamental (Goldfish crescimento) foram adicionadas 100 mg/bandeja. Os insetos adultos foram mantidos em uma gaiola de armação de madeira revestida por tecido tipo organza (60 x 40 x 30 cm) contendo aproximadamente 400 indivíduos. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 20%; e às fêmeas foi proporcionado o repasto sanguíneo em codornas (*Coturnix japonica*), três vezes por semana, durante 20 min. Após o repasto, foram introduzidos no interior da gaiola, três copos descartáveis de 200 mL, contendo água destilada, cada copo com um funil plástico revestido por um papel filtro para servir como substrato de oviposição.

## 2.3 Obtenção e preparo dos extratos

As folhas, caules e raízes de *Ocotea pulchella* Nees & Mart. e *Davilla elliptica* St. Hill foram obtidas em Agosto 2012 (estação seca), na reserva de Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' O), Brasil. Voucher das espécies foram depositados no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com os números de registro HUFSCar 8798 e HUFSCar 8799.

Após a coleta os diferentes órgãos vegetais foram secos em estufa a 40°C por 72 horas e triturados a pó em moinho elétrico. O pó (200g) de todos os materiais (folha, caule e raiz) foram extraídos utilizando 600 mL dos solventes hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (Ac) e metanol (MeOH). As soluções foram submetidas a banho de ultrassom durante 30 min. Após filtragem a vácuo, o processo foi repetido. A solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida.

Para o extrato aquoso foi utilizado 100 g do pó de cada material vegetal de ambas as espécies que foram submetidos à extração em diclorometano/metanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH) (1:1) (Aibu et al., 2004). Posteriormente, cada extrato bruto foi

diluído em CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (95:5) e particionado com hexano, obtendo-se os extratos metanólicos e hexânicos de folha, caule e raízes. Os extratos metanólicos foram suspensos em água destilada e particionados com acetato de etila, dando origem aos extratos de acetato de etila e aquosos de folhas, caule e raízes de *O. pulchella* e *D. elliptica* (Otsuka, 2005). Para os bioensaios com larvas e ovos de *A. aegypti*, foram utilizados apenas os extratos aquosos de folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica* produzidos por extração líquido-líquido.

## 2.4 Bioensaios

### 2.4.1 Bioensaio com larvas de *Aedes aegypti*

O teste larvicida foi realizado de acordo com a metodologia da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), com algumas adaptações. A atividade biológica dos extratos dos espécimes utilizados foi avaliada em laboratório, em larvas de terceiro instar (L<sub>3</sub>) tardio e/ou quarto instar (L<sub>4</sub>) inicial das populações de *A. aegypti* para o diagnóstico da atividade larvicida e obtenção das concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>). Inicialmente foi realizado um pré-teste na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos de folha, caule e raiz de *O. pulchella* e *D. elliptica* que foram diluídas em 300 µl de DMSO. Utilizou-se como controle positivo o DMSO e a água como testemunha. As larvas foram distribuídas em copos plásticos de polietileno com capacidade de 50 mL, contendo 30 mL de água destilada menos as concentrações dos produtos vegetais. Para cada concentração havia quatro replicas contendo 15 indivíduos por repetição, totalizando 60 larvas. A mortalidade foi avaliada a cada 12 horas, por 48 h de exposição. Foram contabilizadas como mortas as larvas que ao toque do bastão não demonstraram reação ou movimento.

Posteriormente, os extratos que exibiram maior atividade larvicida no pré-teste a 3 mg.mL<sup>-1</sup> foram selecionados e avaliados nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup> nos intervalos de 24 e 48 horas sob as mesmas condições do ensaio realizado a 3 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.4.2 Bioensaio com ovos de *Aedes aegypti*

Para a atividade ovicida o método utilizado foi ligeiramente modificado de Su e Mulla (1998). O efeito ovicida dos extratos vegetais foi estabelecido com o uso dos menores valores das  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , determinados no teste larvicida, após 48 horas de exposição aos produtos vegetais. Ovos de *A. aegypti* foram recolhidos de uma população de laboratório (Rockfeller), fornecido pelo laboratório de Entomologia do Núcleo de Sistemática e Bioecologia da Universidade Estadual da Paraíba. Os extratos hexânicos e diclorometânico da raiz de *Ocotea pulchella* foram selecionados e solubilizados em 200  $\mu$ L de DMSO e diluídos em água destilada, da solução estoque se obteve as concentrações  $CL_{50}$  (0,216  $\text{mg.mL}^{-1}$  de hexano e 0,207  $\text{mg.mL}^{-1}$  de diclorometano) e  $CL_{90}$  ( 0,246  $\text{mg.mL}^{-1}$  de hexano e 0,237  $\text{mg.mL}^{-1}$  de diclorometano) (Tabela 2). Com auxílio de uma lupa os ovos foram contabilizados e separados. Foram utilizadas quatro réplicas, cada uma contendo 100 ovos de *A. aegypti* que foram transferidos para placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo 2 mL das soluções. Após 48 h de tratamento, retiraram-se as soluções e em seguida os ovos foram colocados para secar por 24 h. Quando secos, foram transferidos para copos de polietileno de 100 mL contendo 80 mL de água destilada. Durante sete dias foram observados e determinado o número de larvas eclodidas. Como controle utilizou-se água destilada. As taxas de eclosão foram avaliadas pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eclosão} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas eclodidas}}{\text{N}^\circ \text{ total de ovos}} \times 100$$

Também foram avaliados os parâmetros; velocidade média de eclosão (VME) e o tempo médio de eclosão (TME).

#### 2.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos bioensaios com larvas e ovos de *A. aegypti* foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando atendidas essas duas pressuposições, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade. A ausência de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (comparações múltiplas) ou Mann-Whitney

(comparação binária). Para o teste larvicida quando o resultado da ANOVA foi significativo, procedeu-se à regressão linear ou quadrática. O ajuste do modelo foi testado a 0,05 de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Nos casos onde não foi possível o ajuste dos modelos ( $R^2 < 0,70\%$ ) ou quando os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, os valores foram apresentados em forma de tabela. Para se estimar a mortalidade máxima das larvas em função do tempo de exposição aos extratos foi necessário derivar a equação: derivada da função potência (Pessoa, 2014). Dados de mortalidade de larvas foram submetidos à análise de Probit através do programa POLO-PC, para a determinação das concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ).

### 3. RESULTADOS

Na concentração de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$ , praticamente todos os extratos vegetais de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* produziram efeito inseticida sobre estágio larval de *Aedes aegypti*. A atividade larvicida variou de acordo com o órgão vegetal, com o solvente utilizado na extração, com a espécie doadora e com o tempo de exposição (Figura 2). Os extratos hexânico e diclorometânico da raiz de *O. pulchella* produziram maior atividade larvicida em 24 h de tratamento.

De maneira geral, na concentração de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  os extratos vegetais de *O. pulchella* produziram maior atividade larvicida, sobretudo, após 24 h de exposição das larvas de *A. aegypti* aos produtos vegetais. As maiores taxas de mortalidade, observadas após 24 horas, foram verificadas nas larvas de *A. aegypti* submetidas aos extratos de folha e raiz de *O. pulchella* extraídos com hexano e diclorometano, uma vez que a mortalidade observada foi de 86% e 59% (folha) e de 98% e 98% em (raiz), respectivamente (Figura 2). A mortalidade verificada nos extratos de raiz de *O. pulchella* variou entre 3% a 98%, sendo os extratos mais ativos aqueles extraídos com hexano, DCM e AcOEt. As larvas de *A. aegypti* expostas durante 24 h ao extrato de caule acetônico de *D. elliptica* exibiram uma toxicidade significativa, em relação à atividade observada nos demais extratos dessa espécie, dado que 45% das larvas presente nesse extrato foram mortas (Figura 2).

Quando se avaliou a atividade larvicida dos extratos vegetais de *O. pulchella* e *D. elliptica* após 48 h, observou-se um aumento significativo na toxicidade dos extratos sobre às larvas L<sub>3</sub> de *A. aegypti* exibida por praticamente todos os extratos brutos (Figura 2). O aumento no período de exposição de 24 para 48 horas das larvas de *A. aegypti* presentes nos extratos brutos de caule de *O. pulchella* resultou em taxas de mortalidades mais significativas, já que foi verificado um aumento na porcentagem de larvas mortas de 38% (hexano), 51% (DCM), 62% (AcOEt), 54% (acetona), 36% (metanol) e para o extrato aquoso de 0% após 24 h para 10% no intervalo de 48 h (Figura 2).

As larvas submetidas aos extratos de folha, caule e raiz de *D. elliptica* exibiram maior susceptibilidade aos extratos brutos quando se avaliou o efeito desses produtos após 48 horas. Foi verificado aumento significativo na mortalidade larval quando presentes nos extratos brutos de hexano (24%) e aquoso (37%) obtidos de folha; hexano (26%) e acetona (21%) de caule; AcOEt (45%), acetona (27%) e metanol (23%) extraído da raiz e de *D. elliptica* (Figura 2). Os extratos brutos de hexano e diclorometano extraído de raiz de *O. pulchella* não foram avaliados sobre o estágio larval de *A. aegypti* durante 48 h, uma vez que foi observado nas larvas submetidas a esses extratos uma mortalidade de quase 100% após 24 h de exposição (Figura 2).

Os resultados da análise do efeito acumulado dos extratos brutos sobre o estágio larval de *A. aegypti* a cada 12 h, mostrou-se coerente com os resultados anteriormente abordados a respeito da relação entre o tempo de exposição e o aumento na atividade larvicida. Foram observados nos extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila de folha; hexânico e diclorometânico de caule e acetato de etila e acetônico de raiz de *O. pulchella* que, a cada acréscimo de 12 h no período de exposição resultava em um aumento na taxa de mortalidade larval (Figura 3). Foram expressos graficamente apenas os dados em que os valores de  $R > 90$ .

Observou-se um acréscimo significativo, em relação à mortalidade, já nas primeiras 12 h de tratamento, as larvas submetidas aos extratos de hexano de folha com valor de 22% (Figura 3 A) e diclorometano de folha com valor de 20% (Figura 3 B) e aumentou de forma linear no extrato de acetato de etila com o aumento da exposição para 48 h, em que foi observada uma mortalidade de 37% e caso o período de exposição persistisse até o valor teórico de 58,6 h a mortalidade máxima estimada seria de 39% (Figura 3C).

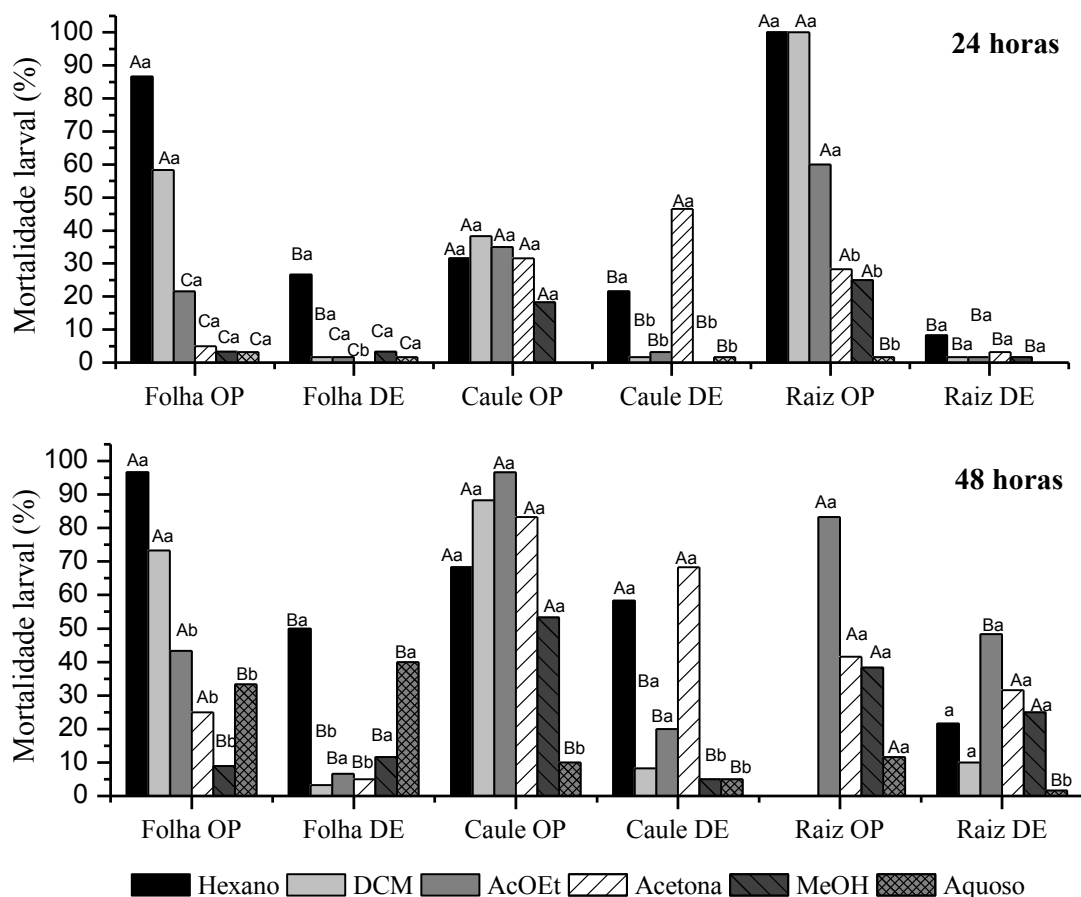


Figura 2. Efeito dos extratos de *Ocotea pulchella* (OP) e *Davilla elliptica* (DE), na concentração de  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , sobre a mortalidade de larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para os órgãos vegetais e minúsculas para os extratos, não diferem entre si, pelo teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis a 0,05 de probabilidade.

As larvas submetidas ao extrato hexânico de folha exibiram maior mortalidade, já que houve um acréscimo no número de larvas mortas de 86% em 36 horas de tratamento, além disso, no tempo estimado de 39,42 horas foi observada uma mortalidade de 99,98% (Figura 3A). Nos extratos hexânico e diclorometânico de caule, a atividade larvicida foi potencializada a cada 12 horas de tratamento, dado que houve um acréscimo significativo na mortalidade larval em 24 e 36 horas de exposição de 33% e 37%, respectivamente (Figura 3 D e E). Ademais, se a exposição das larvas aos extratos hexânico e diclorometânico persistisse até o valor teórico estimado de 50,69 e 58,63 horas, respectivamente a máxima mortalidade de larvas de *A. aegypti* atingida seria de 70,6% e 74,7%.



A taxa de mortalidade também foi dependente do tempo de exposição na presença dos extratos de raiz extraídos com acetato de etila e acetona. Nas primeiras 24 horas de tratamento a toxicidade do extrato de acetato de etila provocou uma mortalidade acumulada de 60% e após 48 horas de 80% (Figura 3F). O contato prologando das larvas de *A. aegypti* ao extrato acetônico da raiz exibiu um aumento na mortalidade de aproximadamente 10% após 48 horas de exposição (Figura 3G).

A mortalidade cresceu em função do tempo nas larvas submetidas a concentração de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  dos extratos de hexânico de folha e hexânico de caule de *D. elliptica* (Figura 4). O valor de  $R= 0,96$  observado para o extrato de hexânico de folha indica uma alta correlação entre o aumento na mortalidade larval em função do maior tempo de exposição. Após 12 horas de tratamento a mortalidade atingida foi de 1% das larvas expostas, aumentando para 50% após 48 h. O valor teórico estimado para máxima mortalidade larval em 67,44 h foi de 55% das larvas mortas (Figura 4A). O extrato hexânico de caule também produziu uma mortalidade mais acentuada quando as larvas foram expostas por mais tempo a ele. Nas primeiras 24 h a toxicidade do extrato resultou em uma mortalidade acumulada de 22%, ao manter essas larvas expostas por mais 12 horas, a taxa de mortalidade cresceu em 35%. Caso o período de exposição das larvas  $L_3$  de *A. aegypti* fosse avaliado por mais 20 horas, ou seja, totalizando 56 h, a mortalidade máxima teórica acumulada seria de 63% (Figura 4).

Os extratos vegetais de *D. elliptica* e *O. pulchella* avaliados na concentração de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  que produziram maior atividade larvicida no intervalo de 24 h, foram avaliados em concentrações menores, variando entre  $0,25$  a  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Com os resultados obtidos evidenciou-se atividade dos extratos diclorometânico e acetônico de caule e de acetato de etila e acetônico obtidos das raízes de *O. pulchella* sobre a mortalidade média de larvas  $L_3$  de *A. aegypti* (Figura 5).

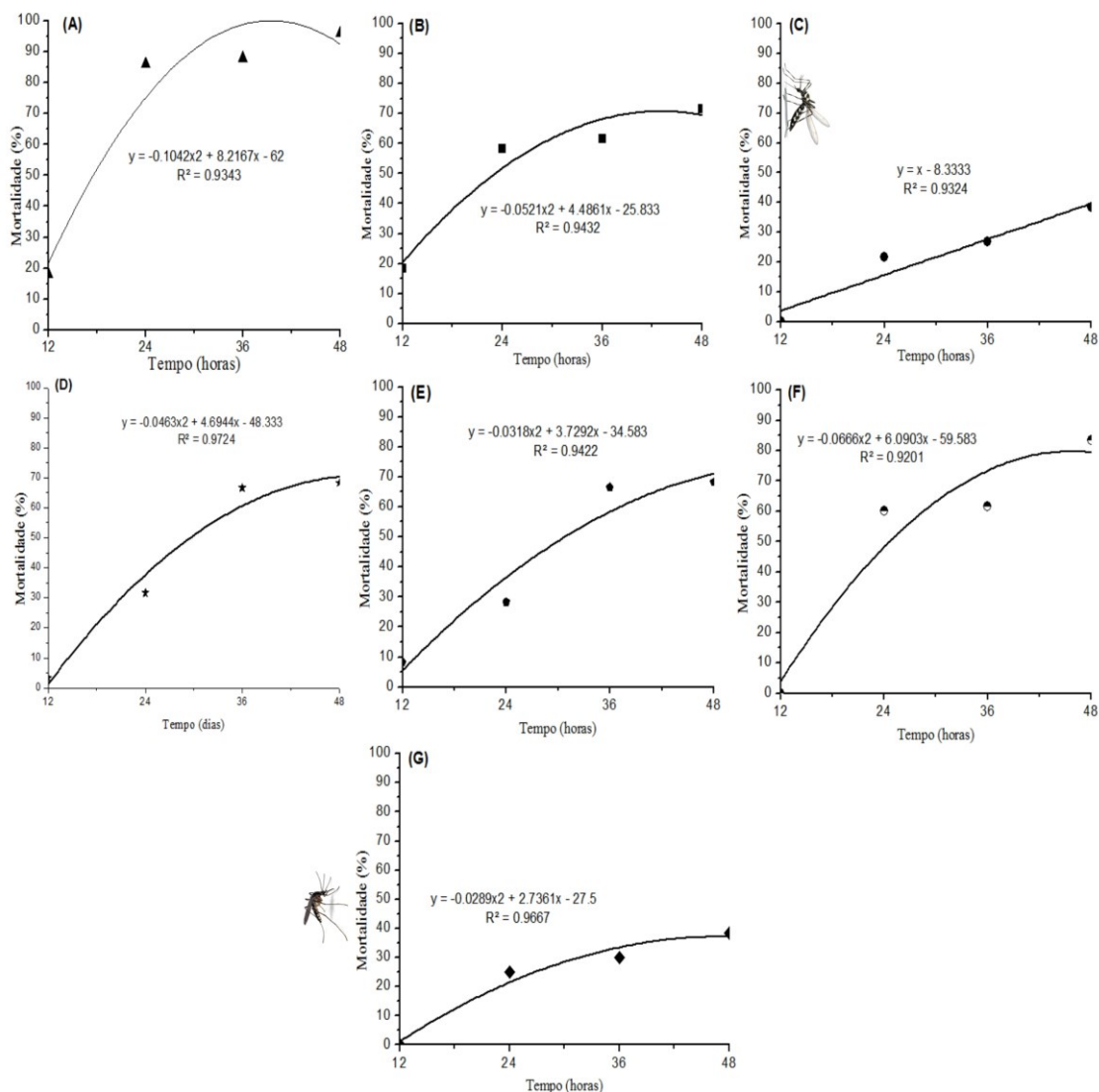


Figura 3. Mortalidade acumulada em larvas (L<sub>3</sub>) de *Aedes aegypti* submetidas a concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos hexânico (A), diclorometânico (B) e acetato de etila de folha (C); hexânico (D) e dioclorometânico (E) de caule e acetato de etila (F) e acetônico (G) de raiz de *Ocotea pulchella*.

Foi observado uma mortalidade máxima 35% e 30% de larvas submetidas aos extratos brutos de caule extraídos com DCM e acetona, respectivamente, na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup>, em 24 horas de experimento (Figura 5 A e B). Com o aumento na concentração e do tempo de exposição foi verificado um efeito conjunto que resultou em uma maior atividade larvicida, uma vez que após 48 h, na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos de caule (DCM e acetona) foram observados uma mortalidade de 48% e 70%, respectivamente (Figura 5).

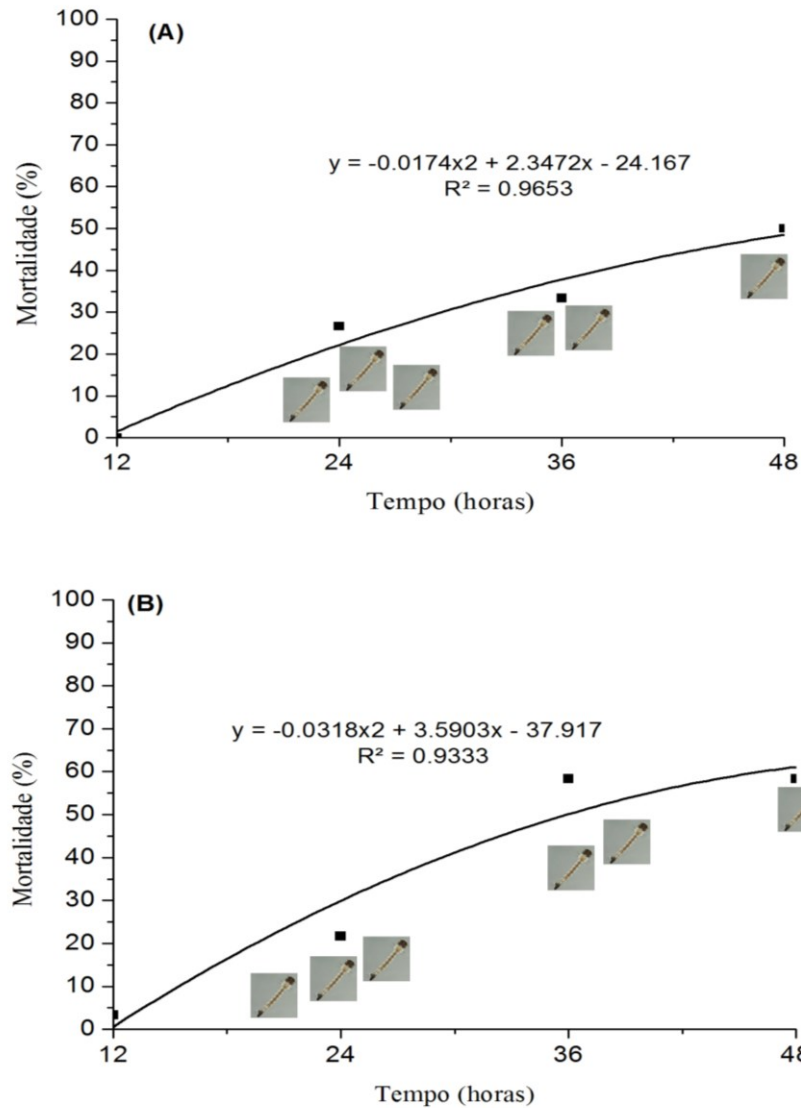


Figura 4. Mortalidade acumulada em larvas ( $L_3$ ) de *Aedes aegypti* submetidas a concentração de  $3\text{mg.mL}^{-1}$  dos extratos hexânico de folha (A) e hexânico de caule (B) de *Davilla elliptica*.

Assim, como os extratos de caule de *O.pulchella*, verificou-se uma interação entre a concentração e o tempo de exposição sobre a mortalidade das larvas de *A. egypti* submetidas aos extratos de AcOEt e acetona de raiz, de modo que a cada  $1\text{mg.mL}^{-1}$  adicionados aos tratamentos as larvas  $L_3$  se tornavam mais sensíveis aos extratos quando expostas por 24 h (Figura 5 C e D). Além disso, a atividade larvicida dos extratos foi potencializada quando as larvas foram expostas por um período de 48 h, uma vez que a mortalidade máxima observada foi 48% e 70%, respectivamente, na concentração de  $3\text{mg.mL}^{-1}$  (Figura 5 C e D).

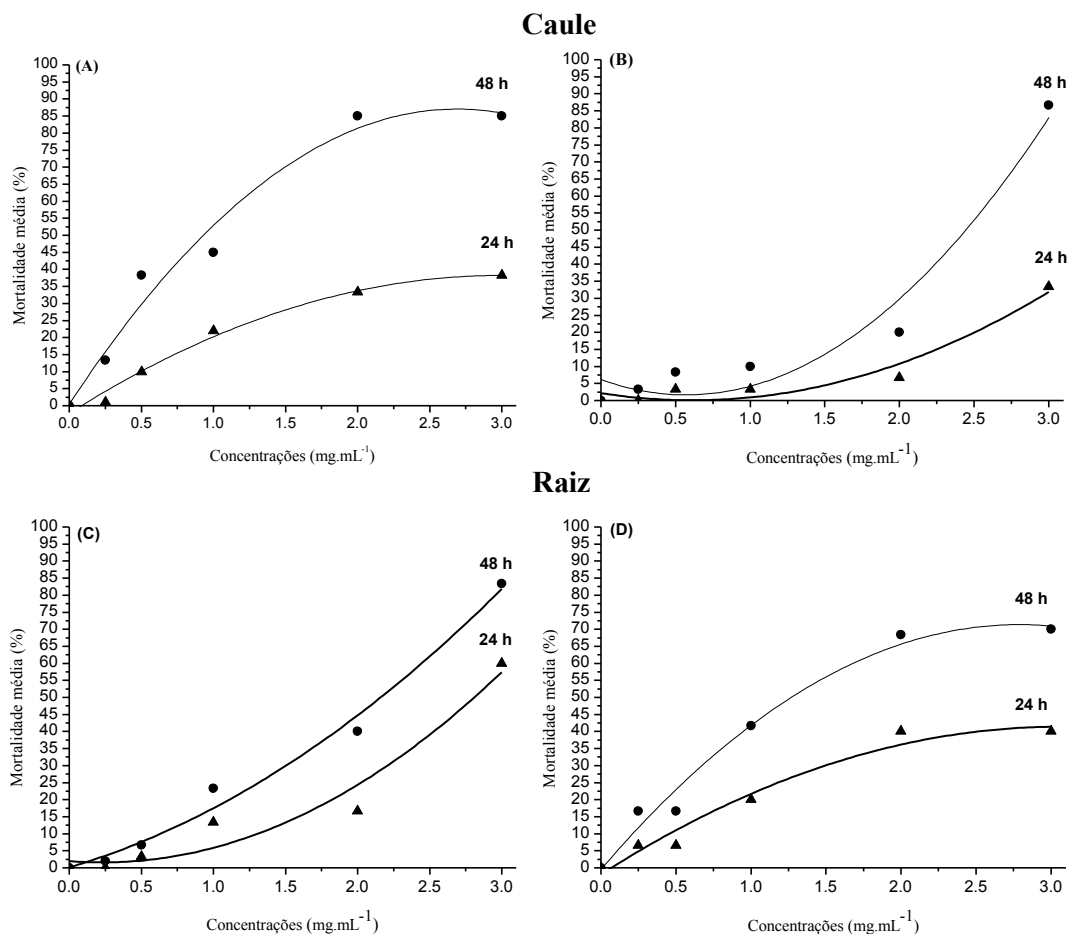


Figura 5. Resposta das larvas de *Aedes aegypti* submetidas aos extratos diclorometânico (A) e acetônico (B) de caule e acetato de etila (C) e acetônico (D) de raiz de *Ocotea pulchella* em diferentes concentrações ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e tempos de exposição ( $y = \blacktriangle$  24 horas;  $y = \bullet$  48 horas). Equações obtidas na análise de regressão: (A)  $y = 0,0804x^2 + 0,7161x - 1,1$ ,  $R^2 = 0,9748$ ;  $y' = 0,0045x^2 + 2,8259x - 3,125$ ,  $R^2 = 0,9527$ ; (B)  $y = 0,3348x^2 - 1,5795x + 1,575$ ,  $R^2 = 0,8748$ ;  $y' = 0,8571x^2 - 3,9929x + 4,1$ ,  $R^2 = 0,8845$ ; (C)  $y = 0,5804x^2 - 2,5196x + 2,35$ ,  $R^2 = 0,9218$ ;  $y' = 0,7277x^2 - 2,958x + 2,775$ ,  $R^2 = 0,9049$ ; (D)  $y = 0,125x^2 + 0,4679x - 0,7$ ,  $R^2 = 0,9227$ ;  $y' = 0,0848x^2 + 1,6777x - 1,825$ ,  $R^2 = 0,9413$ .

Os demais extratos vegetais de *O. pulchella* não induziram significativamente a mortalidade de larvas em função da concentração e do tempo de exposição e, conseqüentemente, não houve ajuste nos modelos de regressão linear ou quadrática. Contudo, para as larvas expostas ao extrato de folha extraído com diclorometano e hexânico de raiz, durante 24 h, nas concentrações de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram

observados os menores e maiores valores da mortalidade média (1,7 e 8,7) e (13,5 e 15) (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade média de larvas (L<sub>3</sub>) de *Aedes aegypti* submetidas à ação de diferentes extratos brutos obtidos de folha e raiz de *Ocotea pulchella* em diferentes concentrações.

(t)	Concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )					Estatística
	0.25	0.5	0.1	2	3	F(p)
<b>Extrato Diclorometanico de Folha</b>						
<b>24h</b>	1,7±0,8 b	2,7 ± 2,4 a	5,2 ± 4,1 a	3,7 ± 1,4 a	8,7 ± 5,5 a	<b>3,242 (0,032)</b>
<b>48h</b>	8 ± 2,1 a	6,7 ± 3,6 a	10,5 ± 1,8 a	7,7 ± 2 a	11 ± 3,6 a	2,184 (0,107)
<b>Extrato Hexanico de Raiz</b>						
<b>24h</b>	13,5±1,2 b	15± 0 a	15 ± 0 a	15 ± 0 a	15 ± 0 a	<b>4,629 (0,008)</b>
<b>Extrato Diclorometanico de Raiz</b>						
<b>24h</b>	14,5±5,1 a	14,5 ± 13,2 a	15 ± 8,24 a	15 ± 3,26 a	15 ± 4,61 a	2,857 (0,05)

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA; P<0,05).

As concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> obtidas no teste com larvas de *A. aegypti* submetidas aos extratos de folha, caule e raiz de *O. pulchella* variaram em resposta ao tipo de extrato utilizado e ao período de exposição. Essa diferença entre os extratos brutos de *O. pulchella* pode ser confirmada quando se compara os valores mínimos dos coeficientes angulares da reta de regressão e a sobreposição dos intervalos de confiança desses produtos, no qual foram bastante distintos (Tabela 2). De um modo geral, os menores valores das CL<sub>50s</sub> e CL<sub>90s</sub> foram exibidos pelas larvas expostas aos extratos vegetais durante 48 h, exceto as larvas submetidas as concentrações do extrato de raiz diclorometano, em que as menores doses letais foram obtidas após 24 h de tratamento (Tabela 2).

Entre os extratos avaliados as menores concentrações letais capazes de provocar mortalidade larval de 50% e 90% foram produzidas pelos extratos de raiz extraídos com hexano e diclorometano durante 24 e 48 horas de exposição. O extrato diclorometano de raiz mostrou maior atividade larvicida, uma vez que são necessárias menores concentrações desse produto para induzir a mortalidade de 50% (CL<sub>50</sub>= 0,009 mg.mL<sup>-1</sup>) e 90% (CL<sub>90</sub>=0,040 mg.mL<sup>-1</sup>) das larvas de *A. aegypti* após 24 h (Tabela 2).

Entre os extratos vegetais avaliados aqueles em que o solvente utilizado na extração foi o diclorometano, foi observado maior potencial larvicida, uma vez que foram estimadas as menores concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) em 24 e 48 h de exposição (Tabela 2). Em seguida, os extratos hexânico extraído de folha e de raiz de *O. pulchella*, nos intervalos de 24 e 48 h, produziram os menores valores das doses

letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ), em relação as concentrações estimadas para os extratos obtidos com acetona. Assim sendo, os resultados expressos na Tabela 2 permitem inferir que são necessárias altas concentrações dos extratos de caule e raiz extraídos com acetona para reduzir a população larval de *A. aegypti* em 50% e 90%.

A atividade ovicida foi avaliada utilizando as menores doses letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ), estimadas no teste com larvas de *A. aegypti* (Tabela 2). Assim como no teste larvicida (Tabela 2), os ovos de *A. aegypti*, presentes nas concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ), estimadas nos tratamentos com extrato de raiz diclorometanico, afetaram a taxa de eclosão das larvas desse mosquito, sobretudo nos ovos submetidos a  $CL_{50}$ , em que houve diferença significativa entre o controle (água) (Tabela 3). Foi observado nas doses letais estimadas pelo extrato de raiz hexanico um estímulo na eclosão de larvas  $L_1$  de *A. aegypti*, já que a taxa de eclosão observada na  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  atingiu valores maiores quando comparado com o percentual de eclosão larval exibido pelo controle (Tabela 3).

Além disso, o tempo médio (TME) e a velocidade média de eclosão (VME) foram as variáveis mais afetadas em pelo menos uma das concentrações letais avaliados em ovos de *A. aegypti* (Tabelas 3). O TME sofreu acréscimo significativo, em relação ao controle (1,6 dias), nos ovos de *A. aegypti* presentes na dose letal ( $CL_{50}$ ) do extrato de raiz extraído com diclorometano ( $0,207 \text{ mg.mL}^{-1}=2,4$  dias). Embora a  $CL_{90}=0,237 \text{ mg.mL}^{-1}$  tenha induzindo um aumento no tempo médio de eclosão das larvas para dois dias, esse resultado não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Tabela 3). Como anteriormente observado, as doses letais do extrato hexânico não reduziram o número total de larvas eclodidas, todavia retardou significativamente o tempo de eclosão, uma vez que foram observados os maiores tempo médio de eclosão ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  ambos de 2,8 dias) (Tabela 3).

Tabela 2. Concentrações letais em  $\text{mg.mL}^{-1}$  obtidas no teste larvicida utilizando os extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* sobre *Aedes aegypti* durante 24 e 48 horas de exposição aos extratos vegetais.

	Folha			Caule			Raiz		
		Hexano	Diclorometano	Acetona	Hexano	Diclorometano	Acetona		
<b>24 h</b>	CL <sub>50</sub>	1,715	1,246	3,769	0,218	0,009	1,680		
	IC	1,715-2,663	1,245-2,45	2,71-6,383	.....	.....	1,680-3,169		
	CL <sub>90</sub>	3,147	5,655	10,553	0,248	0,040	8,465		
	IC	3,147-7,740	5,656-35,346	7,702-50,867	.....	.....	8,465-46,051		
	$X^2$	78,301	185,07	164,87	11,87	16,1329	111,95		
	$\alpha$	4,242±0,457	1,493±0,234	1,866±0,369	23,12±593,602	1,712±0,823	1,394±0,216		
<b>48 h</b>	CL <sub>50</sub>	1,396	0,625	1,886	0,216	0,207	1,036		
	IC	1,396-2,32	0,625-1,033	1,732-3,982	.....	.....	1,036-1,815		
	CL <sub>90</sub>	3,177	2,276	5,413	0,246	0,237	4,581		
	IC	3,177-8,932	2,276-5,829	4,295-28,42	.....	.....	4,581-18,902		
	$X^2$	72,115	48,507	89,288	6,1594	2,0833	38,733		
	$\alpha$	3,107±0,295	2,127±0,203	2,566±0,281	22,76±505,954	21,78±790,469	1,697±0,191		

\*Concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>), intervalos de confiança a 95% (IC), chi-quadrado ( $x^2$ ) e ( $\alpha$ ) coeficiente angular.

Portanto, a VME também sofreu influencia das doses letais do extrato da raiz (hexano), já que os valores observados foram significativamente menores que o do controle (0,61 dias), sobretudo na CL<sub>90</sub> (0,37 dias) (Tabela 3). Tal resultado mostra que o extrato hexânico de raiz não só induziu um aumento no tempo médio de eclosão, como também reduziu a velocidade de eclosão das larvas por dia (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de eclosão (%) E; tempo médio (TME) e velocidade média de eclosão (VME), em dias, de ovos de *Aedes aegypti* submetidos á ação dos extratos da raiz de *Ocotea pulchella*, extraído com hexano e diclorometano nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>).

Variáveis	Concentrações letais (mg.mL <sup>-1</sup> )					Estatística	
	Controle	Hexano		Diclorometano		F(p)	H(p)
		CL <sub>50</sub> (0,216)	CL <sub>90</sub> (0,246)	CL <sub>50</sub> (0,207)	CL <sub>90</sub> (0,237)		
(%) E	18±10 b	47,5 ± 33a	35,5±13,5a	2,7± 2,3c	9,7±9,06 bc	<b>6,621 (0,008)</b>	
TME	1,6±0,3b	2,8 ±0,85a	2,8± 0,95a	2,4 ± 1,19a	2,0±0,78b		<b>10,1 (0,042)</b>
VME	0,61±0,1a	0,38±0,12b	0,37±0,09b	0,52±0,33a	0,57±0,29a		<b>9,144 (0,047)</b>

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; F: estatística do teste F- valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA; P<0,05); H: estatística do teste de Kruskal-Wallis; P: probabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

A dengue, a chikungunya e o zika têm em comum o transmissor; o mosquito *Aedes aegypti*. Nos últimos anos o numero de casos de dengue vem aumentando no Brasil e também foram registrados novos casos por Chikungunya e o zika (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O controle químico, por meio de inseticidas sintéticos tem mostrado pouca eficácia devido o desenvolvimento de populações resistentes (Rawlins, 1998; Beserra et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Marcombe et al., 2009; Gambarra et al., 2013; Diniz et al., 2014). Outros métodos têm sido usados como alternativa no combate a proliferação do *Aedes aegypti* e novos estudos têm surgido como ferramentas capazes de auxiliar no controle desse inseto, como uso de substancias de origem vegetal (Jansen; Beebe, 2010). Estudos têm provado que os fitoquímicos obtidos de diferentes plantas apresentam efeito ovicida, larvicida, adulticida e repelentes contra *A. aegypti* (Cheng et al., 2004; Govindarajan, 2009; Govindarajan e Karuppanan, 2011; Bansal et al., 2012; Mandal, 2012; Ali et al., 2013; Candido; Beserra, 2015).



Os extratos vegetais de *O. pulchella* mostraram maior potencialidade no controle de larvas L<sub>3</sub> de *A. aegypti* em relação aos extratos de *D. elliptica* durante 24 horas de tratamento. Para o controle de mosquitos vetores de doenças humanas os extratos vegetais ou óleos essenciais de plantas devem atuar como repelente, ovicida, larvicida ou adulticida, no entanto, a eficácia do extrato da planta irá depender da espécie avaliada, do período de coleta e da parte da planta estudada (Shalan et al., 2005). Embora, as espécies avaliadas no presente estudo são tipicamente encontradas no Cerrado e foram coletadas no mesmo período, o comportamento larvicida dos extratos vegetais de *O. pulchella* e *D. elliptica* variaram de acordo com o órgão vegetal e com tempo de exposição das larvas aos produtos.

Nos ambientes naturais os vegetais estão expostos a um grande número de inimigos naturais, como os insetos. As plantas por serem sésseis desenvolveram mecanismos de defesa, entre eles a presença de compostos com propriedades inseticidas (Taiz; Zeiger, 2013).

A toxicidade observada nas larvas de terceiro instar de *A. aegypti* submetidas aos extratos de *O. pulchella*, deve-se a seu aspecto fitoquímico. Foi verificado em estudos envolvendo espécies do gênero *Ocotea* a presença de constituintes químicos da classe dos flavonóides, dos esteróides, dos triterpenos, das saponinas e dos taninos, além de óleos essenciais (Toledo, 2000; Farago, 2002; Montrucchio, 2012) e de alcalóides (Castro, 1993; Lordello, 1997; Zanin e Lordello, 2007; Da Silva, 2010). Na espécie *O. pulchella* foram observadas a presença de leucoantocianidinas, glicosídeos, flavonoides, esteroides, triterpenos e glicosídeos antocianina (Araujo, 2012). Os alcaloides, composto fenólicos, saponinas e flavonoides são substâncias do metabolismo secundário relacionados com a defesa química. Os terpenos já são bem conhecidos por suas atividades inseticidas (Viegas Jr., 2003), o terpenóide espatulenol verificados nos extratos foliares de *Callicarpa americana* são potentes repelentes de mosquito (Cantrell et al., 2005). Alguns alcaloides apresentaram ação deterrente contra diversas espécies de insetos (Petroski e Stanley, 2009). Trindade et al. (2008), observaram 100% de mortalidade em larvas de *Plutella xylostella* submetidas ao extrato da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* e essa atividade inseticida foi associada à presença dos alcaloides identificados nesta planta.

Ademais, foi isolado um alcaloide (S-dicentrina) do extrato etanólico do caule de *Ocotea velloziana* que atua impedindo as divisões celulares durante o desenvolvimento larval e, conseqüentemente mostrou atividade larvicida sobre *A.*

*aegypti* (Da Silva, 2010). Com base nisso a atividade larvicida verificada no presente trabalho, possivelmente estar relacionado com a presença de alguns desses compostos presentes nos extratos de *O. pulchella* bioensaiadas com *A. aegypti*.

O potencial larvicida de diferentes extratos vegetais foi verificado por outros pesquisadores em diferentes espécies do gênero *Aedes*. Govindarajan (2009) avaliou os extratos de *C. fistula*, extraídas com diferentes solventes; metanol, benzeno, acetona e observou atividade larvicida, ovicida e atividades repelentes desses extratos contra *A. aegypti*. Govindarajan et al. (2008) também observaram que os extratos de *Azadirachta indica* com diferentes solventes; benzeno, clorofórmio, acetato de etila e o metanol produziram uma atividade larvicida, ovicida e atrativo da oviposição em *Aedes stephensi*.

Os extratos de folha e raiz de *O. pulchella* apresentaram atividade larvicida mais pronunciada, sobretudo hexano e diclorometano. Segundo WU et al. (2009) folhas e raízes são normalmente as principais fontes de metabólitos secundários. Diferenças na intensidade da atividade biológica em função da polaridade já foram observadas por Souza Filho et al. (2010). Compostos com baixa polaridade estão presentes nos extratos vegetais extraídos com n-hexano, como por exemplo; os monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos que apresentaram alta atividade biológica (Nishida et al., 2005; Zapata et al., 2009; Duraipandiyar et al., 2012). A fração hexânica do extrato das raízes de *D. brasiliensis* revelou uma forte atividade inseticida sobre o pulgão-preto dos citros (Anese, 2014). Extratos de *Myroxylon balsamum* analisadas em larvas no terceiro instar de *A. aegypti* exibiram atividade larvicida mais acentuada quando presentes no extrato hexânico (Simas et al., 2004). Além disso, esses compostos estão envolvidos em diferentes atividades biológicas, entre elas no mecanismo de defesa das plantas (Jansen; Groot, 2004).

A presente atividade do extrato de raiz de *O. pulchella* em larvas L<sub>3</sub> de *A. aegypti* expostas durante 24 horas, corrobora com as informações na literatura sobre os aspectos morfofisiológicos desse órgão vegetal (Taiz; Zeiger, 2013). A raiz é uma das principais entradas de nutrientes e água e, o contato direto com o solo a tornar mais susceptível ao ataque de microorganismos (fungos e bactérias), nematelmintos ou de compostos alelopáticos (Rezende et al., 2011). Os extratos brutos radiculares apresentam grande quantidade de substâncias e, muitos dos compostos com diferentes atividades biológicas relevantes têm sido localizados quase de maneira exclusiva em raízes (Flores et al. 1987; Oliveros-Bastidas et al., 2009). Além disso, estudos

realizados com extratos de raízes de plantas do Cerrado foi observado diferentes atividades inseticidas (Silva et al., 2004; Costa et al., 2012; Egydio et al., 2013) inclusive em extrato de raiz de *O.velloziana* sobre larvas de *A. aegypti* (Garcez et al., 2009). Não foram encontrados registros na literatura sobre a atividade inseticida de raízes de *O.pulchella*, portanto, é necessário mais investigações sobre o potencial inseticida deste órgão.

O intervalo de 48 h permitiu maior contato dos produtos vegetais com as larvas de *A. aegypti*, tornando-a mais susceptível aos extratos. O contato direto (tópico) é uma das principais formas de modo de ação de derivados de plantas (Knaak e Fiuza, 2010). Por meio do maior contato direto, os compostos vegetais podem interagir com o tegumento do inseto, além de atuar sobre enzimas e sobre o sistema nervoso (Isman, 2006), provocando maior toxicidade.

Os menores valores das concentrações letais capazes de provocar mortalidade de 50% e 90% da população larval foram exibidos pelos extratos de raiz extraídos com diclorometano e, em seguida o hexano. Porém, não foram encontrados trabalhos de pesquisa com valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  obtidas por extrato de raiz de *O. pulchella* frente a larvas de *A. aegypti*. Entretanto, Araujo (2012), ao avaliar o potencial do extrato de acetato de etila e hidro alcóolico extraídos de folhas de *O. pulchella* verificou atividade larvicida significativa frente a larvas  $L_3$  de *A. aegypti*. Valores semelhantes ao presente estudo foram encontrados em saponina isolada de *Annona squamosa* (Kumar et al., 2011) em larvas de *A. aegypti* e observaram valores da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 0,219 e 0,394  $mg, mL^{-1}$ , respectivamente. Simas et al. (2004) observaram  $CL_{50}$  de 104,6  $mg/mL$  e 71,3  $mg/mL$  sobre larvas de *A. aegypti* submetidas aos óleos essenciais de *O. gratissimum* e *O. tenuiflorum*, respectivamente, sendo esses valores maiores do que o obtido pelo presente estudo. Sendo assim, menores concentrações do extrato hexânico e diclorometânico de raiz de *O. pulchella* foram capazes de provocar um efeito letal de 50% e 90% das larvas de *A. aegypti*.

Em virtude de suas sucessivas ecdises, os compostos inseticidas podem atuar, entre outras, inibindo a síntese da quitina durante o estágio mais suscetível do inseto; a fase larval, uma vez que induz a mortalidade devido a maformações da nova cutícula (Da Silva, 2010). Os produtos naturais derivados de plantas podem se manifestar sobre o desenvolvimento dos insetos de diversas maneiras; por repelência, inibição de oviposição e da alimentação, por bloqueio de neurotransmissão e, conseqüentemente

distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e por fim mortalidade (Roel, 2001; Maciel et al., 2010).

Sabe-se que o ovo de *A. aegypti* é a forma mais resistente do ciclo biológico (Jasen; Beebe, 2010). Tal resistência se deve a presença nos ovos de uma cutícula serosa constituída por quitina, além da produção de lipídeos importantes para o processo de impermeabilização (Rezende et al., 2008). Entretanto, no presente estudo houve redução no número de larvas eclodidas nos ovos de *A. aegypti* submetidas nas CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do extrato diclorometânico de raiz de *O. pulchella* e atraso no tempo médio e na velocidade de média de eclosão quando submetidos as concentrações letais do extrato hexânico. Não foram encontrados trabalhos de pesquisa sobre a atividade ovicida de *O. pulchella* em *A. aegypti*. Estudos com extratos de plantas e sua atividade em ovos de *A. aegypti* foram avaliados por diferentes pesquisadores (Govindarajan et al., 2008; Samidurai et al., 2009; Waricoo, 2011; Candido e Beserra, 2015). Desse modo, as doses letais dos extratos hexânico e diclometânico de raízes de *O. pulchella* não só reduziram o número de larvas eclodidas como também provocaram atraso na eclosão larvas/dia, portanto, com a redução no numero de larvas há um menor numero de insetos adultos.

A busca por novas estratégias com produtos naturais para o controle de insetos vetores de doenças é desejável devido à prevalência de resistência do vetor aos inseticidas sintéticos e de problemas de toxicidade sobre organismos não-alvo (Jantan et al., 2005). No presente estudo, os extratos vegetais de *O.pulchella* e *D. elliptica* exibiram propriedades larvicida e ovicida em *A. aegypti*. Contudo, novos estudos são necessários para identificar os principais componentes químicos dos extratos que são responsáveis pela atividade larvicida e inibição na eclosão de larvas de *A. aegypti*.

## 5. CONCLUSÕES

Os extratos de folha, caule e raiz de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* mostraram potencial para efetuar o controle de larvas de *Aedes aegypti*.

A espécie *Ocotea pulchella* exibiu maior atividade larvicida, sobretudo nas larvas submetidas aos extratos de raiz.

Os extratos hexânico e diclorometânico de raiz de *Ocotea pulchella* mostraram maior potencial larvicida, uma vez que exibiram os menores valores das concentrações letais.

Os extratos de raiz de *Ocotea pulchella* não só inibiram a eclosão como também atrasou o tempo médio e a velocidade média de larvas eclodidas.

## 6. REFERENCIAS

ABBAS, ASGHAR; ABBAS, RAO ZAHID; ALI KHAN, JUNAID; IQBAL, ZAFAR; BHATTI, MUHAMMAD MEHMOOD HAYAT; SINDHU, ZIA-U-DIN AND ZIA, MUHAMMAD ANJUM. Integrated Strategies for the Control and Prevention of Dengue Vectors with Particular Reference to *Aedes aegypti*. **Pak Vet J.** v.34,n.1,p.1-10, 2014.

ADEYEMI, M. M. H. The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. **African Journal of Pure and Applied Chemistry.** v.4, p. 243-246, 2010.

AIBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinales* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrason Sonochem.** v.11, n.(3-4), p.261-265, 2004.

ALI MYS, KUMAR, S. R, BEULA, J. M. Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Asian Pacific Journal Tropical Disease.** v.3, p.196-201, 2013.

ANESE, S. Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis* Miers e identificação de compostos com atividade fitotóxica e inseticida. Tese, Universidade Federal de São Carlos, 2014.

ARAÚJO, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.

BANSAL, S. K.; KV SINGH, S SHARMA; MRK SHERWANI. Laboratory observations on the larvicidal efficacy of three plant species against mosquito vectors of malaria, Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever (DF/DHF) and lymphatic filariasis in the semi-arid desert. **Journal Environmental Biology.** v.33, p.617-621, 2012.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO JR. F. P. Resistência de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefôs na Paraíba. **Neotropical Entomology.** Piracicaba, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

- BORGES, E. E. L.; Lopes, E. S.; Silva, G. F. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. I - árvores. **Revista Árvore**. v.17, p.69-84, 1993.
- CAMARGO, M. J. DE et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova**, v.36, n.7, p.1008-1013, 2013.
- CANDIDO, L. P.; CAVALCANTI, M. T.; BESERRA, E. B. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.46, n.4, 2013.
- CANDIDO, L. P.; BESERRA, E. B. Repellent activity of *Cnidioscolus phyllacanthus* Mart. and *Ricinus communis* L. extracts against *Aedes aegypti* L. oviposition behavior. **Biotemas**. v.28, n.4, p.105-112, 2015.
- CARMO, F. M. S. Substâncias alelopáticas de algumas espécies arbóreas nativas do município de Viçosa, MG, Brasil. Tese de Doutorado. UNESP. Rio Claro.SP, 2002.
- CARMO, F. M. S.; LIMA, E. E.; BORGES; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta botanic Brazilian**. v.21, n.3, p.697-705, 2007.
- CASTRO, O. C. In Phytochemical Potential of Tropical Plants; K. R. Downum, J. Romeo, H. Stafford, ed. Plenum Press, New York, Chapt. 3, 1993.
- CANTRELL, C. L.; KLUN, J. A.; BRYSON, C. T.; KOBALSY, M.; DUKE, S. O. Isolation and Identification of Mosquito Bite Deterrent Terpenoids from Leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) Beautyberry. **Journal Agriculture Food Chemistry**. In press, 2005.
- CONSTANT, VA, GE BENJAMIN, K CHRISTOPHER, M JONES, D WEETMAN AND H RANSON. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. **Journal Emerging Infectious Disease**. v.18, p.1508-1511, 2012.
- COSTA, M. S.; PINHEIRO, DO.; SERRÃO, J. E.; PEREIRA, M. J. B. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**. v.41, p.311-314, 2012.
- CHENG, S. S.; JY LIU, K. H.; TSAI, W. J.; CHEN; S. T. CHANG. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.52, p.4395-4400, 2004.
- DA SILVA, L. M. G. E. Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea vellosiana* (Meisn.) Mez. e *Aiouea trinervis* (Meisn.). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Tese, p.110, 2010.

DINIZ, M. M. C. S.; HENRIQUES, A. D. S.; LEANDRO, R. S.; AQUIAR, D. L.; BESERRA, E. B. To evaluate the resistance of *Aedes aegypti* to temephos Fersol 1G (temephos 1% w/w) associated with the adaptive disadvantage of insect populations in the absence of selection pressure. **Revista Saúde Pública**. v.48, n.5, p.775-782, 2014.

DURAI PANDIYAN, V.; AL-HARBI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, C. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. **BMC Complementary and Alternative Medicine**.v. 12, p. 1-6, 2012.

EGYDIO, A. P.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemistry System Ecology**. v.46, p.145–151, 2013.

FARAGO, P. V. Estudo morfo-anatômico e fitoquímico de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, família Lauraceae, da região dos campos gerais, Ponta Grossa, Paraná Dissertation. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002.

FLORES, H. E.; HOY, M. W.; PICKARD, J. J. Secondary metabolites from root cultures. **Trends Biotechnol**. v.5, p.64–68, 1987.

FREITAS, A. C.; LIMA, M. P.; FERREIRA, A. G.; TADEI, W. P.; PINTO, A. C. S. Constituintes Químicos do caule de *Spathelia excelsa* (RUTACEAE) e atividade frente a *Aedes aegypti*. **Quimica Nova**. v.32, n.8, p.2068-2072, 2009.

GAMBARRA, W. P. T.; MARTINS, W. F. S.; FILHO, M. L. L.; ALBUQUERQUE, I. M. C.; APOLINÁRIO, O. K. S.; BESERRA, E. B. Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v.46, n.2, Uberaba, 2013.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; HAMERSKI, L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresour Technology**. v.100, p.6647–6650, 2009.

GOVINDARAJAN, M.; JEBANESAN, A.; REETHA, D.; AMSATH, R.; PUSHPANATHAN T, SAMIDURAI K. Antibacterial activity of *Acalypha indica* L. **European Review Medical Pharmacology Science**. v.12, n.5, p.299–302, 2008.

GOVINDARAJAN, M. Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **European Review Medical Pharmacology**. v.132, p.99-103, 2009.

GOVINDARAJAN, M.; KARUPPANNAN, P. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector *Aedes aegypti* (Linn) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**. v.4, p.24-28, 2011.

HOPP, M. J.; FOLEY, J. A. Worldwide fluctuation in dengue fever cases related to climate variability. **Climate Reseach**. v.25, p.85-94, 2003.

ISMAN, M. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**. v.51, p.45-66, 2006.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**. v.12, p.272-279, 2010.

JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**. v. 21, p. 449-477, 2004.

JANTAN, I.; YALVEMA, M. F.; AHMAD, N. W.; JAMAL, J.A. Insecticidal activities of the leaf oils of eight *Cinnamomum species* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Pharmaceutical Biology**. v.43, p.526–532, 2005.

KUMAR, S. VIJAYA; MANI, PANAGAL; BASTIN, T. M. M; JOHN, R. ARUN KUMAR, G. RAVIKUMAR. Larvicidal, oviposition deterrent and repellent activity of *Annona squamosa* extracts against hazardous mosquito vectors. **International Journal of Pharmacy & Technology**. v.3, n.3, p.3143-3155, 2011.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 5, p. 120-132, 2010.

LEORA Software. POLO-PC, probit or logit analysis. Berkeley (CA), 1987.

LIMA, E. P.; PAIVA, M. H. S.; ARAÚJO, A.; DA SILVA, E. V. G.; DA SILVA, U. M.; DE OLIVEIRA, L. N.; SANTANA, A. E. G.; BARBOSA, C. N.; NETO, C. C.; GOULART, M.; WILDING, C. S.; AYRES, C. F. J.; SANTOS, M. A.V.D. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasite Vectors Journal**. v.4, p.1-13, 2011.

LORDELLO, A. L. L.; YOSHIDA, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Phytochemistry**. v. 46, p. 741-744, 1997.

LORENZI, H.; Árvores Brasileiras – **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, 4ª ed.; Instituto Plantarum: São Paulo, v. 1, p.143-144, 2002.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; AMÓRA, S. S. A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, p. 105-112, 2010.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R., Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of *Japanese encephalitis*, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**. v.10, p.98-109, 2004.

MACORIS, M. D. D. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; OTRERA, V. C. G.; DE CARVALHO, L. R.; JÚNIOR, A. L. C.; BROGDO, W. G. Association of insecticide



use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz.** v.102, p.895-900, 2007.

MANDAL S. Mosquito vector management with botanicals-the most effective weapons in controlling mosquito-borne diseases. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine.** v.2, p.336, 2012.

MARCOMBE, S.; POUPARDIN, R.; DARRIET, F.; REYNAUD, S.; BONNET, J.; STRODE, C.; BRENGUES, C.; YÉBAKIMA, A.; RANSON, H.; CORBEL, V.; DAVID, J.P. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. **BMC Genomics.** v.10, p.494, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>. Acesso em 22 de janeiro de 2016.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medicine.** v.78, p.1543–1548, 2012.

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal Chemical Ecology.** v. 31, p. 1187-2030, 2005.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. J.; MACÍAS, F.A.; FERNÁNDEZ, C. C.; MARÍN, D.; MOLINILLO, J. M. G. Exudados dela raiz y su relevancia actual en las interacciones alelopaticas. **Química nova.** v. 32, n. 1, p. 198-213, 2009.

OLIVARES-PÉREZ J, S ROJAS-HERNÁNDEZ, MT VALENCIA-ALMAZAN, I GUTIÉRREZ- SEGURA AND EJ MÍRELES-MARTÍNEZ. Prevalence of resistant strains of *Rhipicephalus microplus* to acaricides in cattle ranch in the tropical region of Tecpan of galeana, Guerrero Mexico. **Pakistan Veterinary Journal.** v.31, p.366-368, 2011.

OTSUKA H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, editors. Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology. Humana Press; Estados Unidos. p.269-273, 2005.

PESSOA, R. S. Matemática Biológica. Programa de Pós- graduação em Engenharia Biomédica, Univasp, São José dos Campos, 2014.

PETROSKI, R. J; STANLEY, D. W. Natural Compounds for Pest and Weed Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.57, n.18, p.8171–8179, 2009.

PIMENTEL-GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 477p. 1990.

QUINET, A., BAITELLO, J.B., MORAES, P.L.R. de 2010. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008480>).

- RAWLINS, S. C. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. **Pan American Journal Public Health**. v.4, p.243-251, 1998.
- REZENDE, G. L.; MARTINS, A. J.; GENTILE, C; FARNESI, L. C.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**. v.8, p.82, 2008.
- REZENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; REZENDE, D. M. L. C. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi). **Bioscience Journal**. v. 27, p. 460-472, 2011.
- RODRIGUES, V. E. G, CARVALHO, D. A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras/MG: UFLA, 2001.
- RODRÍGUEZ, M. M; J. A. BISSET; D. FERNÁNDEZ. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. **Journal American Mosquito Control Association**.v.23, p.420-429, 2007.
- ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v. 1, p.43-50, 2001.
- RONG, L. S.; ANN, A.T.; AHMAD, N.W.; LIM, L. H.; AZIRUN, M. S. Insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) at a dengue endemic site in Shah Alam, Selangor, Malaysia. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**. v.43, p.34-47, 2012.
- SALOKHE, S. G.; MUKHERJEE, S. N.; DESHPANDE, S. G.; GHULEV, P.; MATHAD, J. R. Effect of sub-lethal concentrations of insect growth regulator, lufenuron on larval growth and development of *Aedes aegypti*. **Current science**, v. 99, n.9, 2010.
- SAMIDURAI, K.; JEBANESAN, A.; SARAVANAKUMAR, A.; GOVINDARAJAN, M.; PUSHPANATHAN, T. Larvicidal, Ovicidal and Repellent Activities of *Pemphis acidula* Forst. (Lythraceae) Against Filarial and Dengue Vector Mosquitoes. **Academic Journal of Entomology**. v.2, n.2, p.62-66, 2009.
- SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA, JR M. C.; MEDEIROS, M. B (Org.). Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Brasília/DF: WWF, 2001.
- SILVA, H. H, G.; IONIZETE, G. S.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; CARMECI, N. E. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v.37, p.396–399, 2004.

- SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA, F. A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão de dengue – atividade de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**. v.27, p.46-49, 2004.
- SOARES, M. L.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D.; FIGUEIREDO, A.D.L.; BUSTAMANTE, K.G.L.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil.(Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.352-360, 2005.
- 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**. v. 28, p. 743-751, 2010.
- SU T.; MULLA, M. S. Ovicidal activity of nem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). **Journal American Mosquito Control Association**. v.14, p.204-209, 1998.
- SHAALAN, E.A.S.; CANYONB, D.; YOUNESC, M.W.F.; ABDEL-WAHABA, H.; MANSOURA, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**. v.31, p.1149–1166, 2005.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p.819, 2013.
- TOLEDO, M.G.T. Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2000.
- TRINDADE, R. C. P. et al. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43, n.12, p.1813-1816, dez. 2008.
- VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Panamericana Amaz Saude**. v.6, n.2, 2015.
- VIEGAS JR. C. Terpenos com Atividade Inseticida: Uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos. **Química Nova**. v.26, n.3, p. 390-400, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guildelines for laboratory and Field testing of mosquito larvicides. Geneva. 2005.
- WARIKOO, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Oviposition-altering and ovicidal potentials of ive essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. **Parasitology Resource**, v. 109, p. 1125-1131, 2011.
- WU, A.P.; YU, H.; GAO, S.O.; HUANG, Z.Y.; HE, W.M.; MIAO, S.L.; DONG, M. Differential below ground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. **Trees Structure Function**. v.23, p.11–17, 2009.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinicos do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Quimica Nova**. v.30, p.92–98, 2007.

ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VINUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**. v.30, p.119-125, 2009.

## **INFORMAÇÕES SUPLEMENTAR-ANEXOS**

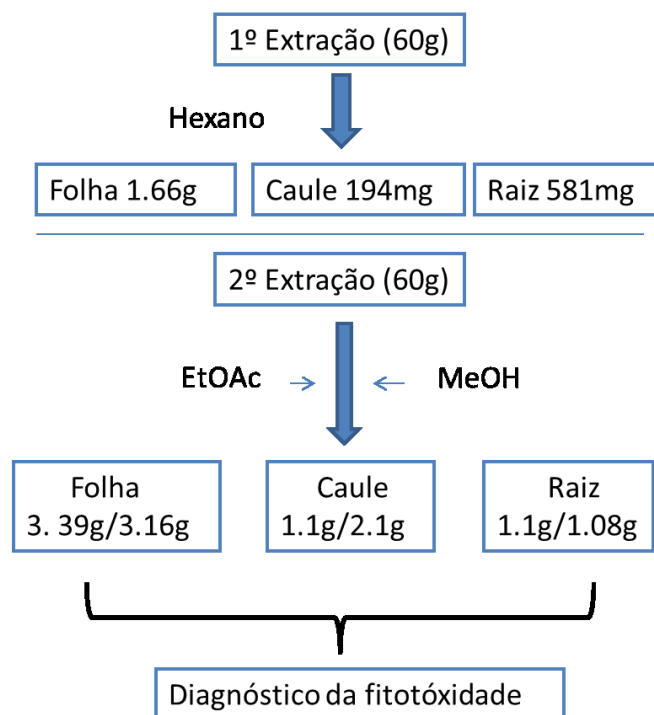


Figura 1A. Esquema das extrações do material vegetal de *Ocotea pulchella* e seus respectivos redimentos referente ao trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

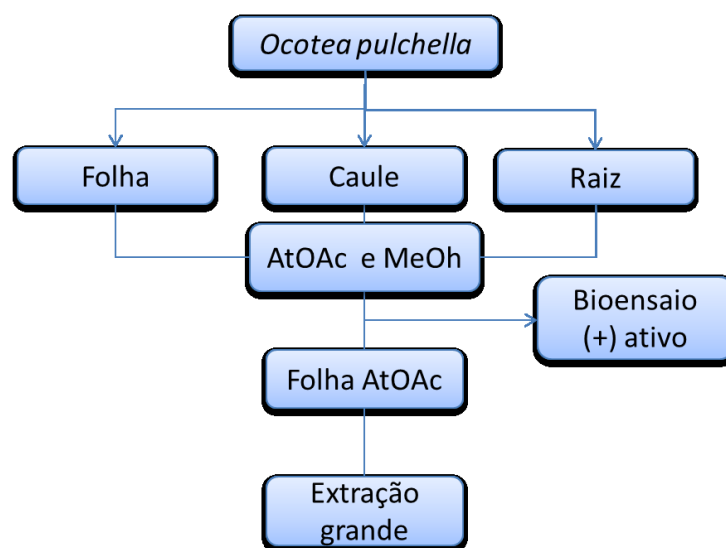


Figura 2A. Fluxograma de obtenção dos extratos vegetais de *Ocotea pulchella* referente ao trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

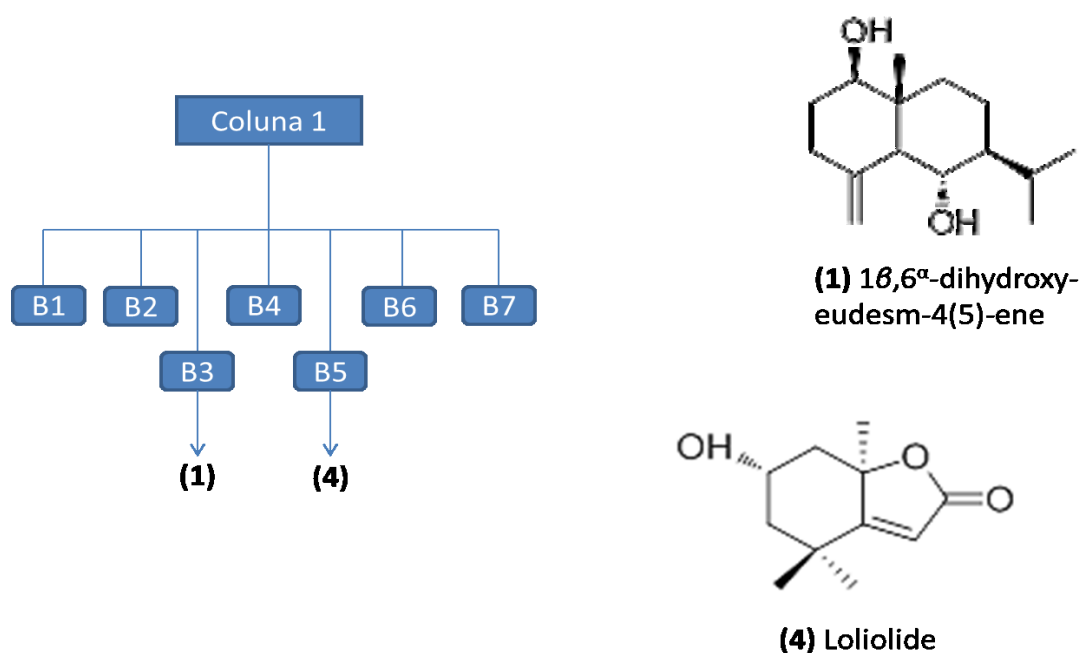


Figura 3A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (B) 60% e 40% metanol para o isolamento dos compostos 1 e 4 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

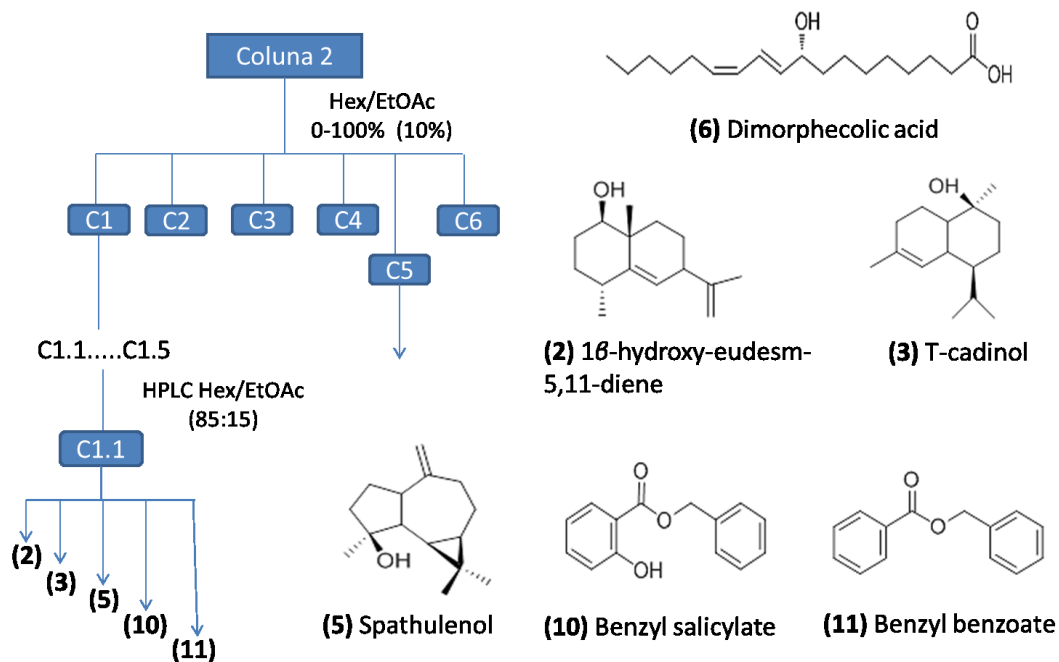


Figura 4A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (C) 80% metanol para o isolamento dos compostos 2, 3, 5, 6, 10 e 11 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

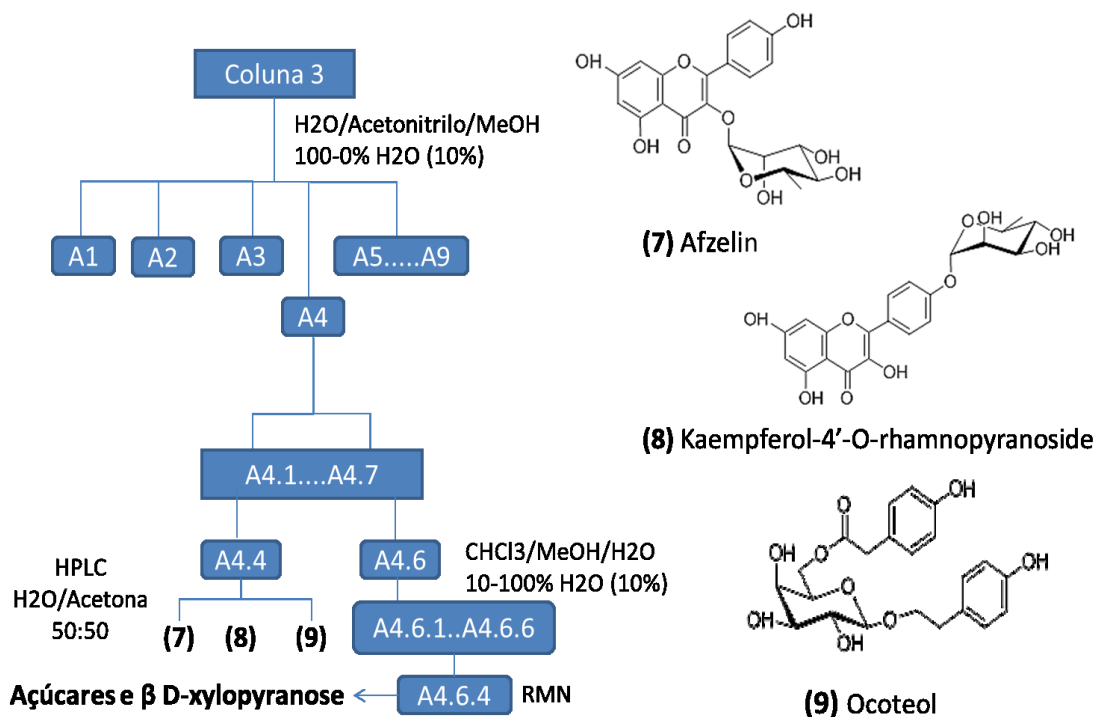


Figura 5A. Esquema de cromatografia de coluna realizado com a fração (A) 20% metanol para o isolamento dos compostos 7, 8, e 9 do extrato de folha de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

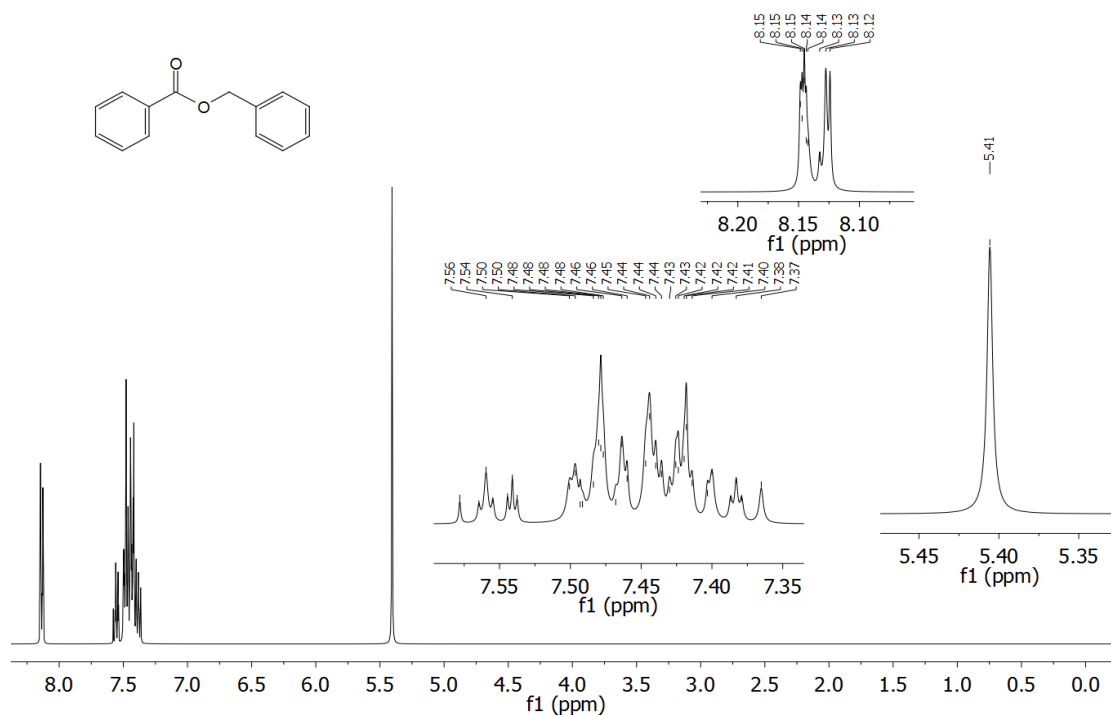


Figura 6A. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto Benzoato de benzilo isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.



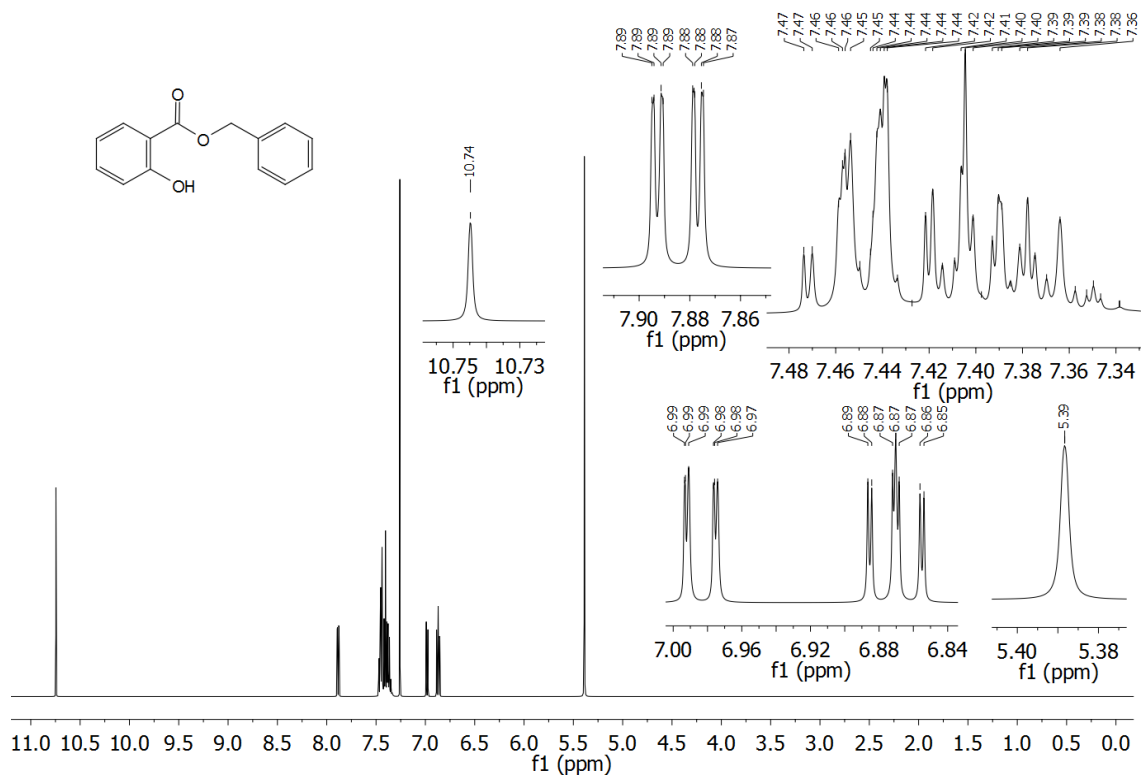


Figura 7A. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do composto Salicilato de benzilo isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

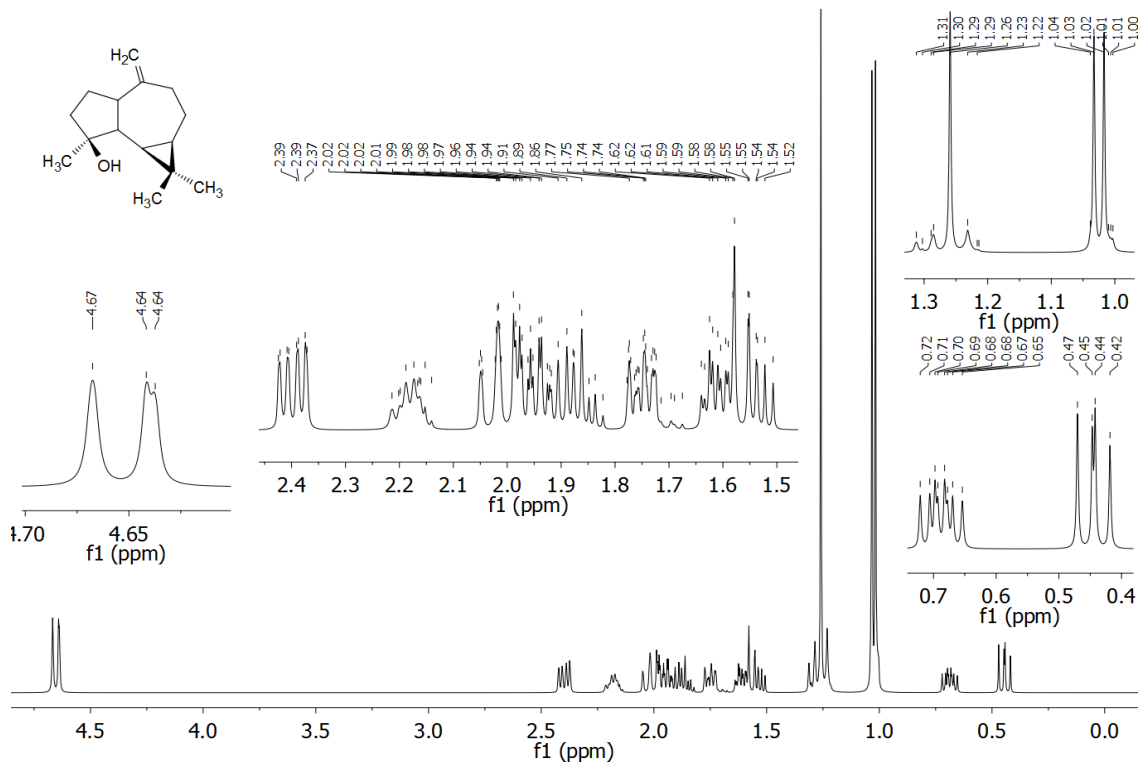


Figura 8A. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do composto Spathulenol isolado da subfração C1.1 oriunda da fração (C) 80% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

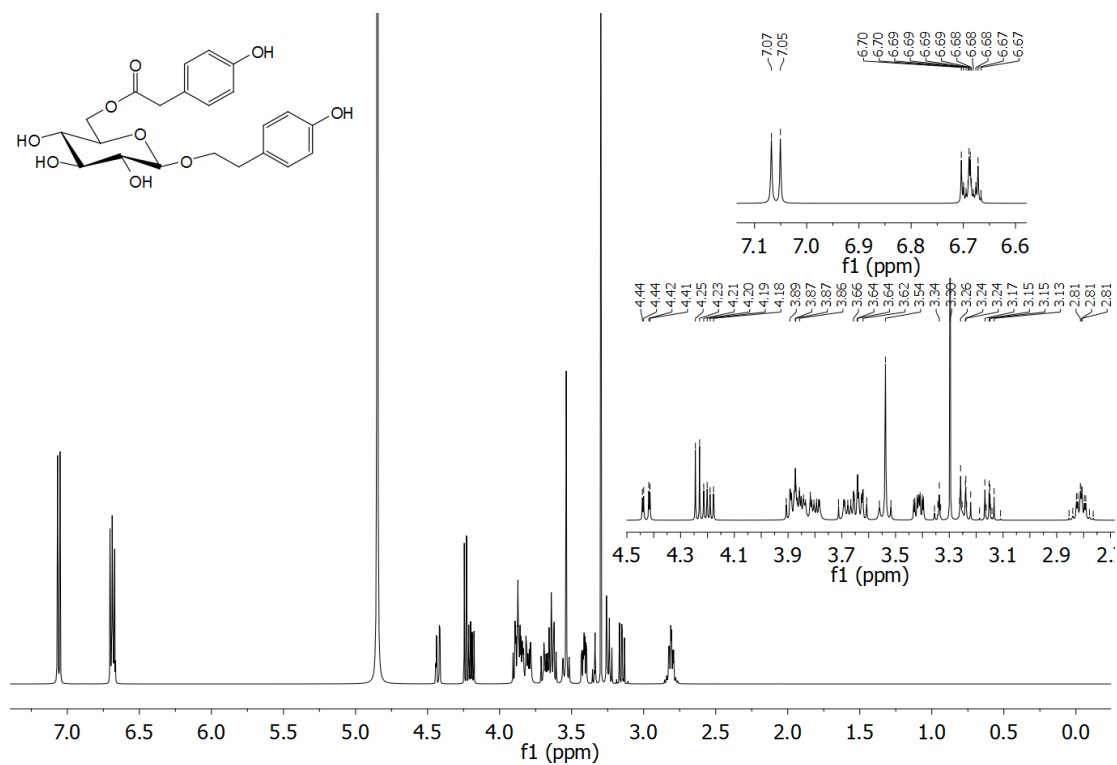


Figura 9A. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

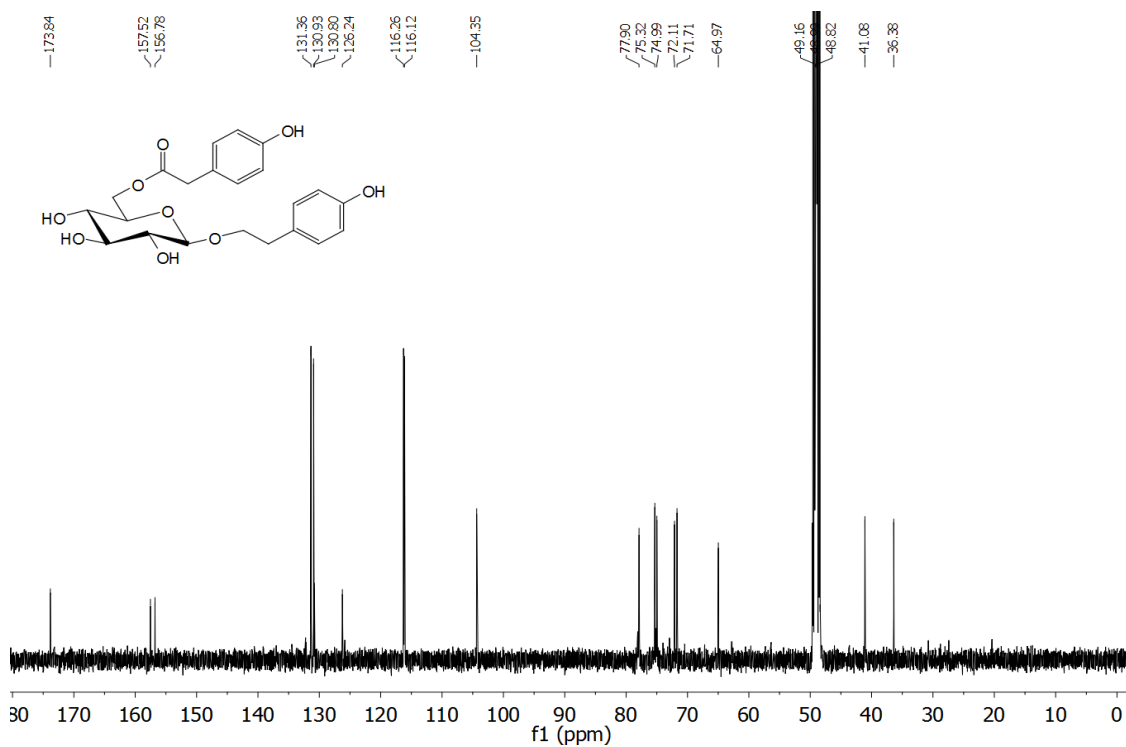


Figura 10A. Espectro de carbono do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

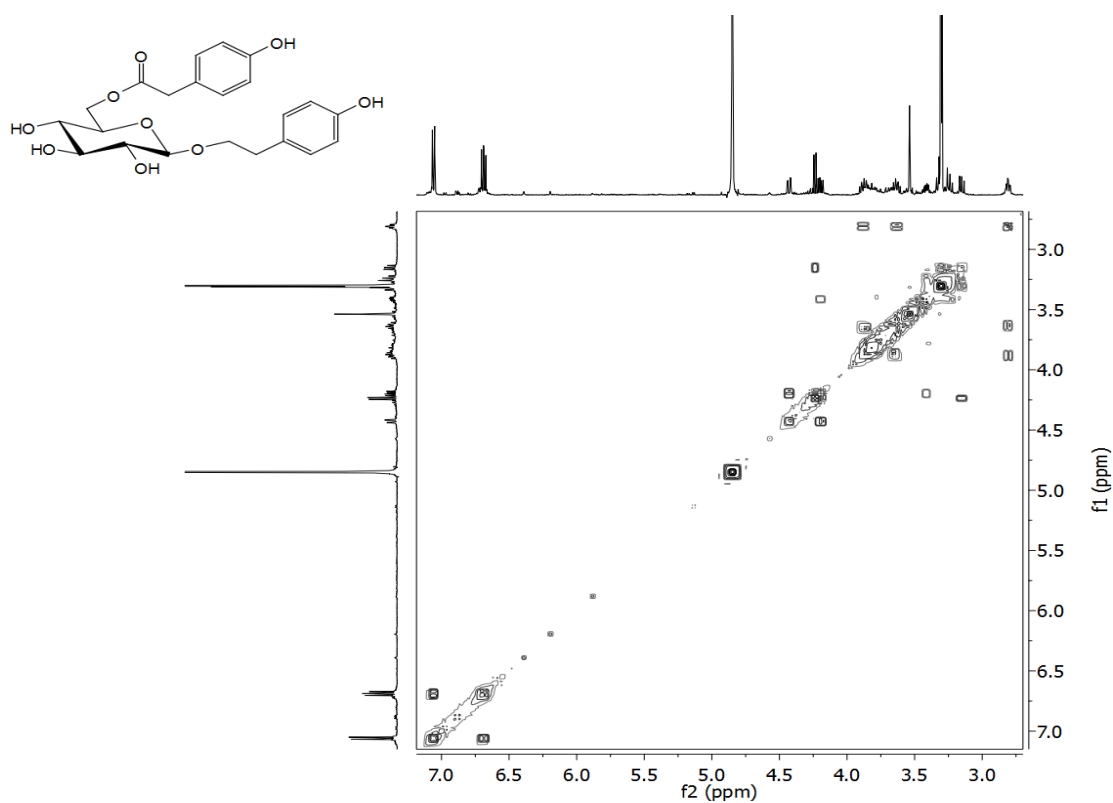


Figura 11A. COSY do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

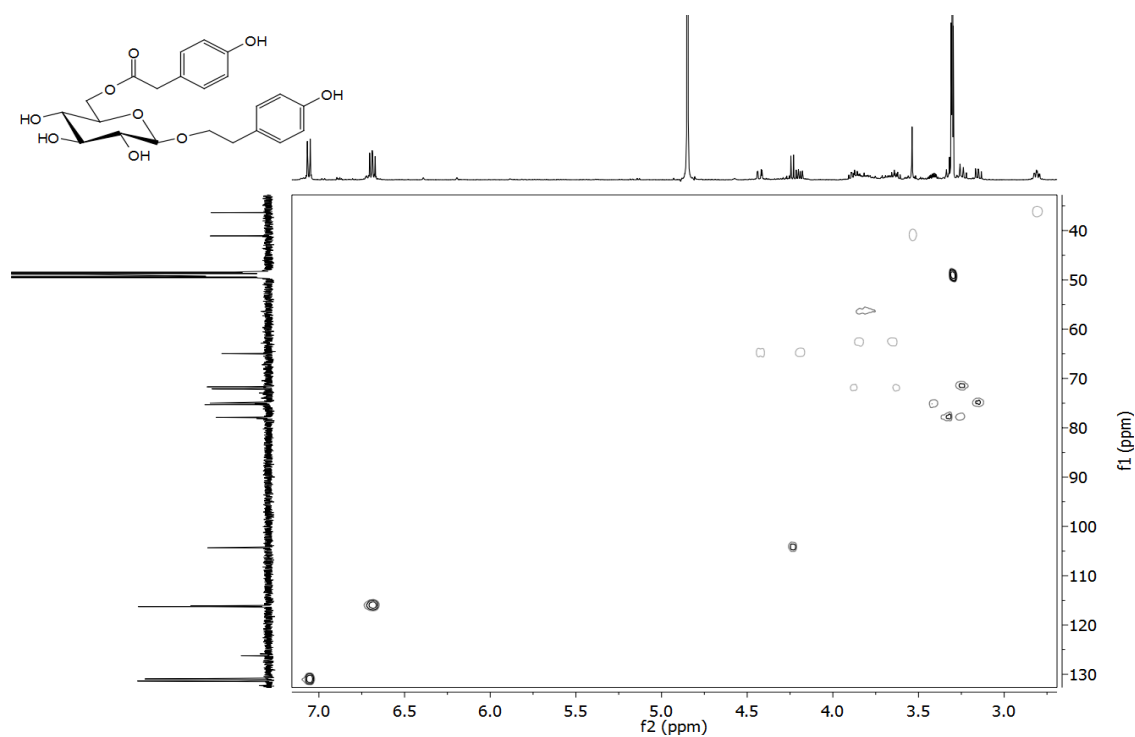


Figura 12A. HSQC do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

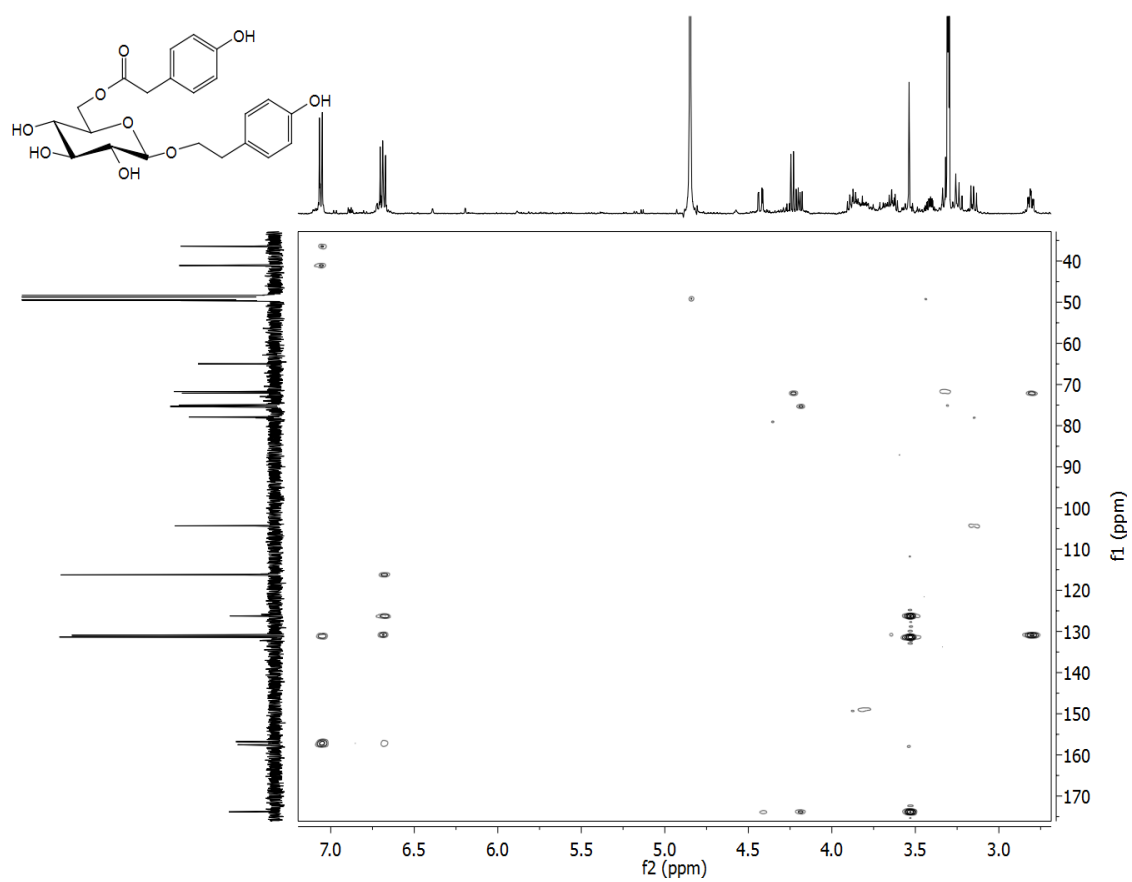


Figura 13A. HMBC do composto Ocoteol isolado da subfração A4.4 oriunda da fração (A) 20% metanol de folhas de *Ocotea pulchella*. Trabalho de pesquisa descrito no capítulo 2.

## CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de folha de *Ocotea pulchella* e *Davilla elliptica* possuem fitoquímicos com atividade herbicida.

A espécie *O. pulchella* mostrou maior potencial fitotóxico em sementes de espécies bioindicadoras e infestantes.

Os compostos spatulenol, benzil salicilate e benzil benzoate identificados no extrato de acetato de etila de folha são os responsáveis pela atividade fitotóxica exibida por *O. pulchella*.

O extrato diclorometânico de raiz de *O. pulchella* exibiu maior potencial no controle de larvas e ovos de *Aedes aegypti*.