



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL DA BAHIA  
CAMPUS JORGE AMADO  
CENTRO DE FORMAÇÃO EM CIÊNCIAS AGROFLORESTAIS  
ENGENHARIA AGRÍCOLA E AMBIENTAL

JAMINE DA COSTA NUNES

**Bioatividade do Óleo Essencial de *Protium heptaphyllum* (aubl.) Marchand em  
Células Meristemáticas de *Lactuca sativa* L.**

ITABUNA

2023

JAMINE DA COSTA NUNES

Bioatividade do Óleo Essencial de *Protium heptaphyllum* (aubl.) Marchand em  
Células Meristemáticas de *Lactuca sativa* L.

Monografia submetida ao Centro de  
Formação em Ciências Agroflorestais  
da Universidade Federal do Sul da  
Bahia, com vistas a obtenção do título  
de bacharel em Engenharia Agrícola e  
Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Khétrin Silva Maciel

ITABUNA  
2023

**Catálogo na Publicação (CIP)**  
**Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB)**  
**Sistema de Bibliotecas (SIBI)**

N972b Nunes, Jamine da Costa, 1997-

Bioatividade do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.)  
*Marchand* em células meristemáticas de *Lactuca sativa* L. / Jamine  
da Costa Nunes. – Itabuna: UFSB, 2023.-  
37f.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Sul da Bahia.  
Campus Jorge Amado, Centro de Formação em Ciências  
Agroflorestais, Engenharia Agrícola e Ambiental, 2023.  
Orientadora: Dra. Khétrin Silva Maciel.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Almacéga. 3. Alelopatia. 4.  
Ecologia vegetal. I. Título. II. Maciel, Khétrin Silva.

CDD – 577.14

**Elaborada por Raquel da Silva Santos – CRB-5ª Região/ 1922**

JAMINE DA COSTA NUNES

BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PROTIUM HEPTAPHYLLUM* (AUBL.)  
MARCHAND EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *LACTUCA SATIVA* L.

Monografia submetida ao Centro de  
Formação em Ciências Agroflorestais  
da Universidade Federal do Sul da  
Bahia, com vistas a obtenção do título  
de bacharel em Engenharia Agrícola e  
Ambiental.

Aprovado: 17 de novembro de 2023

Documento assinado digitalmente

gov.br

KHETRIN SILVA MACIEL

Data: 17/11/2023 14:23:43-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Khétrin Silva Maciel

(Orientadora)

Universidade Federal do Sul da Bahia/UF SB

Documento assinado digitalmente

gov.br

RAFAEL HENRIQUE DE FREITAS NORONHA

Data: 20/11/2023 13:49:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Rafael Henrique de Freitas Noronha

Membro Convidado

Universidade Federal do Sul da Bahia/UF SB

Documento assinado digitalmente

gov.br

JANNAINA VELASQUES DA COSTA PINTO

Data: 20/11/2023 11:41:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jannaina Velasques da Costa Pinto

Membro Convidado

Universidade Federal do Sul da Bahia/UF SB

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Monografia ao meu pai Gedeon Santos Nunes, à minha mãe Enilde Pereira da Costa Nunes, e à minha avó Idalcina Ana de Jesus Santos, que serviram de inspiração e motivação nessa ardua jornada, me ensinaram a lidar com as adversidades e me encorajaram a ser uma mulher empoderada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita bondade e por tornar meus sonhos possíveis;

A Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), por me possibilitar a concretização da minha graduação;

Aos meus pais Gedeon e Enilde, por todo amor, dedicação e por serem meu alicerce em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos, Gleisson, Gislaíne, Geaure e Grazielle pelo companherismo, amizade e por todo suporte;

A Reuther Soares, por todo apoio, ajuda, paciência e por me impulsinar a ser melhor a cada dia e não desistir de lutar;

Aos meus tios, tias, primas, primos e meus avós (Idalcina e José *in memoriam*), por serem fortaleza, e também por todo incentivo e ajuda;

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Khétrin Silva Maciel, pela paciência, compreensão, apoio e por compartilhar seu conhecimento;

Aos professores da graduação por compartilharem seus conhecimentos, por sempre me apoiarem e incetivarem;

Aos meus colegas do curso de Engenharia Agrícola e Ambiental, por toda amizade, colaboração e ajuda;

Aos servidores da UFSB, por toda ajuda e apoio;

A todos os meus amigos que me deram conselhos, me apoiaram e se mantiveram ao meu lado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

Sou muito grata a todos vocês!

## RESUMO

A alelopatia é o efeito de uma planta sobre outra por intermédio da produção de compostos químicos que são liberados no ambiente ao redor da planta. Objetivou-se com este trabalho, identificar os efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand em células meristemáticas de *Lactuca sativa* L. (alface). O experimento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade no Centro de Formação em Ciências Agroflorestais e utilizou o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand extraído em três diferentes temperaturas de vapor (80, 90 e 100 °C) pelo método de hidrodestilação que utiliza o aparelho Clevenger. Para a realização do bioensaio vegetal, foram utilizadas sementes de alface, cultivar Aurélia da TopSeed® comprada em comércio local no município de Itabuna-BA e cada óleo foi emulsionado com Tween 80, na proporção 1:1 e dissolvido em água destilada para a obtenção de soluções com concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50% (v/v). A composição química do óleo foi analisada pela cromatografia gasosa de alta resolução com cromatógrafo gasoso. Realizou-se uma avaliação macroscópica, baseada no acompanhamento da germinação e vigor das sementes, e para as avaliações citotóxicas, lâminas de vidro foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética a 2%. Foram observadas 5000 células meristemáticas analisando as fases do ciclo celular e anormalidades nucleares. A exposição das sementes de alface ao óleo essencial apresenta efeito inibitório em relação ao desenvolvimento das plântulas, tal inibição ocorreu devido aos aleloquímicos presentes no óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. Quanto à cito e genotoxicidade, há maiores alterações nucleares e cromossômicas nas células em seus processos de divisões.

**Palavras-chave:** Alface. Germinação. Fitotoxicidade. Mata Atlântica.

## ABSTRACT

Allelopathy is the effect of one plant on another through the production of chemical compounds that are released into the environment around the plant. The objective of this work was to identify the allelopathic effects of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand in meristematic cells of *Lactuca sativa* L. (lettuce). The experiment was carried out in the Biodiversity Laboratory at the Agroforestry Sciences Training Center and used the essential oil of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand extracted at three different steam temperatures (80, 90 and 100 °C) by the hydrodistillation method that uses the Clevenger device. To carry out the plant bioassay, lettuce seeds were used, cultivating Aurélia from TopSeed®, purchased from a local store in the city of Itabuna-BA and each oil was emulsified with Tween 80, in a 1:1 ratio and dissolved in distilled water to obtain of solutions with concentrations 0.0; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25; 1.50% (v/v). The chemical composition of the oil was analyzed by high-resolution gas chromatography with a gas chromatograph. A macroscopic evaluation was carried out, based on monitoring the germination and vigor of the seeds, and for cytotoxic evaluations, glass slides were prepared using the crushing technique and stained with 2% acetic orcein. 5000 meristematic cells were observed analyzing the phases of the cell cycle and nuclear abnormalities. The exposure of lettuce seeds to essential oil has an inhibitory effect in relation to the development of seedlings, this inhibition occurred due to the allelochemicals present in the essential oil of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. As for cyto- and genotoxicity, there are greater nuclear and chromosomal changes in cells during their division processes.

**Keywords:** Putty. Germination. Phytotoxicity. Atlantic forest.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1	Óleo essencial.....	11
2.2	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand.....	12
2.3	Alelopatia.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A família Burseraceae apresenta distribuição pantropical, composta por 21 gêneros e de 700 espécies distribuídas principalmente na América do Sul (Estevam *et al.*, 2018). Esta família é amplamente representada pelo gênero *Protium*, com 135 espécies.

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, conhecido como almácega, almecegueira e almecegueira-cheirosa, originou-se na América do Sul e pode ser facilmente encontrado na Floresta Amazônica. Esta espécie exsuda uma resina oleosa amorfa, chamada "breu-branco-verdadeiro" que é obtida do caule e apresenta aroma agradável e amplamente utilizado na aromaterapia, na medicina popular, como analgésico, curativo e expectorante (Nogueira *et al.*, 2019). As informações disponíveis sobre a atividade alelopática dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* são escassas.

As plantas produzem os óleos essenciais (OEs) em seus vários órgãos como uma mistura complexa de metabólitos secundários, como mono-, sesquit- e diterpenóides além de hidrocarbonetos (Assaeed *et al.*, 2020; El-gawad *et al.*, 2019a). Os OEs foram descritos como potentes agentes biológicos, como fitotóxico (El-gawad *et al.*, 2019b; El-gawad *et al.*, 2018), antimicrobiano (Deng *et al.*, 2020), antiinflamatório, antipirético (Elshamy *et al.*, 2020), antiúlcera (Arunachalam *et al.*, 2017) e hepatoprotetor (Damtie *et al.*, 2019). As bioatividades potenciais dos óleos essenciais estão diretamente correlacionados com a qualidade e a quantidade de seus constituintes químicos (El-gawad *et al.*, 2019b).

Os óleos essenciais apresentam uma composição relativamente complexa, podendo possuir entre dezenas a centenas de compostos, e em geral o fitoconstituente em maior concentração é aquele ao qual se atribui à atividade biológica. Estes compostos bioativos fazem parte da constituição de diferentes grupos químicos como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e terpenos sendo que, os compostos terpênicos são considerados os mais abundantes (Felipe; Bicas, 2017).

A alelopatia é o efeito de uma planta sobre outra por intermédio da produção de compostos químicos que são liberados no meio ambiente. Esses compostos, chamados de aleloquímicos ou metabólitos secundários, estão presentes em todos os tecidos das plantas, tanto em órgãos vegetativos quanto em reprodutivos, sendo

que ambos têm potencial para armazenar esses metabólitos. Os aleloquímicos produzidos por diferentes plantas afetam a divisão celular, diferenciação, transdução de sinal, expressão gênica, permeabilidade da membrana celular, estrutura da parede, e podem afetar funções fisiológicas como germinação de sementes, respiração, fotossíntese, absorção de íons, atividade enzimática, estado hídrico, transpiração, abertura estomática, níveis hormonais, podendo também induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (Macías *et al.*, 2019).

Em contrapartida, essas substâncias podem desempenhar função de proteção, prevenção na decomposição das sementes, redução da dormência, produção de gemas, além de influenciar nas relações com as demais plantas, microrganismos e insetos. Muitas plantas medicinais demonstram atividades alelopáticas, pois os mesmos constituintes químicos responsáveis pelas atividades medicinais são ativos, influenciando positiva ou negativamente no crescimento de outras plantas. Essas plantas podem então apresentar-se como uma ferramenta alternativa no controle de plantas infestantes em cultivos agrícolas (Almeida *et al.*, 2019). Com isso, podem configurar como alternativa ecológica e reduzir agroquímicos, sendo utilizadas como bioherbicidas (Gharibvandi *et al.*, 2022).

O potencial alelopático de plantas são investigados por meio de bioensaios vegetais com espécies modelo como a *Lactuca sativa* L. (alface). Essa planta é aplicada como bioindicador de toxicidade por ter sementes pequenas e numerosas, número e caracterização cromossômica bem elucidados, facilitando a pesquisa em laboratório, além de ser facilmente obtida em casas rurais (Aragão *et al.*, 2015).

Um ensaio biológico comumente utilizado para validar o efeito causado pelo vegetal está baseado na avaliação de células meristemáticas de raízes e análise do ciclo celular, permitindo a observação de alterações durante a mitose e possibilitando identificar se o composto vegetal apresenta ação citotóxica, genotóxica, mutagênica ou até mesmo cancerígena (Leme; Marin-Morales, 2009).

Considerando que a almecega é uma espécie de grande relevância, porém, pouco se sabe sobre os seus efeitos alelopáticos, objetivou-se estudar a alelopatia da *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, analisando a bioatividade do seu óleo em células meristemáticas de *Lactuca sativa* L.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Óleo essencial

Os óleos essenciais são compostos majoritariamente por terpenos e seus derivados. Os terpenos são compostos orgânicos que ocorrem amplamente na natureza e são responsáveis pelos aromas e fragrâncias encontrados em muitas plantas. Os óleos essenciais são produzidos pela plantas como metabólitos secundários, desempenhando vários papéis, como a atração de polinizadores, defesa contra herbívoros e proteção contra patógenos (Felipe; Bicas, 2017).

Os metabólitos secundários podem ser sintetizados em todos os órgãos do vegetal e armazenados em células secretoras especializadas, como os tricomas glandulares, glândulas de secreção nas superfícies das folhas e caules, as cavidades, espaços de armazenamento, e os canais secretores, estruturas que transportam os compostos para diferentes partes da planta (Andrade, 2013).

As plantas medicinais destacam-se como plantas produtoras de óleos essenciais, tendo propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (Miranda *et al.*, 2015). Desse modo observa-se que existe versatilidade dos compostos produzidos pelas plantas, que podem ser usados como aromatizantes, pesticidas ou medicamentos, especialmente os óleos essenciais, que podem ser aplicados de diversas formas na indústria e na medicina.

Os óleos, em sua complexidade, consistem em uma combinação variada de compostos orgânicos voláteis, o que significa que eles têm a tendência de evaporar facilmente em temperaturas ambiente, esses compostos são responsáveis por dar o odor característico à planta de onde o óleo essencial é extraído. São fatores genéticos que determinam a composição dos óleos essenciais, entretanto, alguns fatores ambientais, como a época de colheita, o processo de secagem e o armazenamento do material vegetal a ser extraído, podem influenciar sobre a composição e teor do óleo essencial (Perovic *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais obtidos de plantas medicinais aromáticas contêm diversos compostos químicos. Esses compostos podem ser usados como aleloquímicos, ou seja, substâncias que afetam o crescimento de outras plantas, com o propósito de melhorar a germinação e o desenvolvimento de diferentes

espécies vegetais (Perovic *et al.*, 2021).

Derivado das plantas, os óleos essenciais, podem inibir a germinação de outras espécies vegetais. Isso se manifesta em mudanças no comprimento das raízes das plantas afetadas, na velocidade de germinação e até mesmo na quantidade de sementes que germinam (Lozada *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2015). Ou seja, os óleos essenciais podem ser usados para melhorar o crescimento de outras plantas, mas também podem inibir a germinação de algumas espécies.

É possível obter o óleo essencial através de diversos métodos de extração, entre eles: a hidrodestilação, que é um processo que envolve a imersão do material vegetal em água destilada ou desmineralizada. Diferentes partes da planta, como caule, folhas, flores, raízes, frutos, resina ou tronco, podem ser usadas (Radzi; Kasim, 2020). O material é aquecido em altas temperaturas usando uma manta térmica até atingir o ponto de ebulição. A água como um suporte para proteger os compostos voláteis do dano causado pelo calor. Durante o processo, o ponto de fusão dos compostos varia, mas o ponto de ebulição permanece constante, geralmente em torno de 100 °C. Os compostos voláteis de baixa massa molecular são arrastados pela água e depois condensados em um separador, formando uma mistura de hidrolato e óleo essencial, essa mistura pode ser separada por decantação simples (Suresh *et al.*, 2021).

Paralelamente, o uso de solventes orgânicos, como álcool ou hexano, são utilizados para dissolver os óleos essenciais presentes nas plantas. Posteriormente, os solventes são evaporados, deixando para trás os óleos essenciais concentrados (Araújo, 2016).

## **2.2 *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand**

A família Burseraceae apresenta uma notável diversidade botânica, o que proporciona oportunidades significativas, visto que os óleos essenciais tem importância econômica para diversas espécies de plantas. Alguns membros da família Burseraceae apresentam grandes quantidades de constituintes que são particularmente importantes na indústria farmacêutica (Nogueira *et al.*, 2019). Isso indica que essas plantas têm um potencial econômico específico nesse setor.

As plantas pertencentes à família Burseraceae são frequentemente

empregadas no tratamento de lesões e úlceras, além de exibirem propriedades anti-inflamatórias e ação repelente. Os monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos derivados de espécies do gênero *Protium* são amplamente reconhecidos por suas notáveis propriedades biológicas, destacando-se por suas ações anti-inflamatórias e acaricidas (Moraes *et al.* 2013). Além disso a presença de metabólitos secundários, desempenham um papel na adaptação e sobrevivência da planta, no qual podem atuar como defesa contra herbívoros ou até mesmo atração de polinizadores.

Os óleos essenciais extraídos das espécies *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subespécie *ulei* (Swat) Daly (PHU) e *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subespécie *heptaphyllum* (PHH), apresentam compostos bioativos advindos dos metabólitos secundários da planta, que podem estar associados aos compostos químicos terpinoleno, p-cimen-8-ol, limoneno, p-cimeno, n-tetradecano, diidro-4-careno,  $\alpha$ -felandreno (Marques *et al.*, 2010), os quais fazem com que a *Protium* apresente propriedades analgésicas, expectorantes, antiinflamatórias e repelente de insetos. Assim como a resina que é utilizada na indústria de verniz, impermeabilização de embarcações e até mesmo como incenso (Bandeira *et al.*, 2002).

Os componentes químicos pertencentes a essa espécie são, em grande maioria terpenos e Bandeira *et al.* (2002), através das coletas realizadas no Ceará, realizou a análise fitoquímica do óleo essencial da resina de *P. Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, indentificando 86,4% de monoterpenos, sendo o terpinoleno (28,5%) o principal constituinte, seguido pelo  $\alpha$ -pineno (10,5%) e  $\alpha$ -felandreno (16,7%), esses constituintes são responsáveis por dar as características aromáticas e antiinflamatórias das plantas.

Os metabólitos secundários são os compostos químicos produzidos pelas plantas, incluindo os monoterpenos que são responsáveis pelo aroma característico de muitos óleos essenciais e têm propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Bandeira *et al.* 2002). O terpinoleno que é um monoterpeno com um aroma fresco e cítrico que pode conferir propriedades relaxantes ou sedativas. Os sesquiterpenos que também contribuem para o aroma dos óleos essenciais e têm propriedades terapêuticas diversas (Felipe; Bicas, 2017). Alguns sesquiterpenos têm atividades anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras (Brandão *et al.*, 2008).

### 2.3 Alelopatia

A alelopatia é definida como um processo no qual um determinado vegetal libera produtos químicos provenientes do seu metabolismo secundário no ambiente ao seu redor. Esses compostos químicos têm a capacidade de impedir a germinação e o desenvolvimento de outras plantas que estão relativamente próximas. Ou seja, as substâncias liberadas por uma planta podem afetar negativamente o crescimento da vegetação circundante (Soares, 2000). Essas características podem incluir propriedades inibidoras, antioxidantes, antifúngicas, anti-inflamatórias e outras quando essas plantas interagem com outras espécies vegetais (Lozada *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2015).

Assim a interação dos compostos químicos no ecossistema pode ter diferentes efeitos, podendo ser benéfica (fomentadora) ou prejudicial (inibitória). Isso significa que algumas plantas produzem substâncias que podem beneficiar o crescimento de certas plantas próximas, enquanto outras podem inibir o crescimento de outras plantas próximas. Pode ser considerada ainda como uma prática ecológica, pois descreve como as plantas interagem no ambiente natural (Lu *et al.*, 2020; Mahmoodzadeh *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2021).

Dessa maneira, é uma prática relevante e seu estudo, especialmente em relação às plantas dominantes, é essencial para entender e manejar as espécies em um ecossistema. Diferentes espécies de plantas têm níveis variados de resistência aos compostos químicos liberados por outras plantas. Alguns vegetais, como *Lactuca sativa* L. (alface), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), são especialmente sensíveis a esses compostos e são usadas como indicadores para avaliar a atividade alelopática no ambiente.

Para que uma planta seja usada como planta teste na avaliação da atividade alelopática requer critérios específicos, incluindo germinação rápida e uniforme, além de ser sensível o suficiente para mostrar uma resposta mesmo em concentrações baixas das substâncias alelopáticas (Ferreira & Áquila, 2000; Gabor & Veatch, 1981).

Pode se constatar os efeitos alelopáticos sobre a qualidade das sementes, devido a utilização do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira), o qual exibiu efeito alelopático inibitório na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), resultando na diminuição do potencial germinativo e vigor a

medida do aumento da concentração. Além disso, percebeu-se elevado número de plântulas anormais a partir de 0,75% de concentração (Pereira, 2021).

A metodologia adotada por Almeida et al. (2019) para identificar os efeitos alelopáticos de extratos voláteis de óleos essenciais de colônia (*Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss), na germinação e no comprimento radicular sobre as sementes bioindicadoras de tomate (*Lycopersicon esculentum*), se deu pela utilização de cinco concentrações de cada óleo (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0%, v/v), as quais resultaram em inibição na germinação quando utilizado o óleo de colônia na concentração de 1%, tal como reduziu o IVG, e além disso as concentrações de 0,75% e 1% inibiram totalmente o comprimento radicular e o comprimento da parte aérea das plântulas de tomate, representando um maior efeito alelopático advindo do óleo de colônia.

Os óleos essenciais extraídos da goiaba e do nim não demonstraram diminuição na taxa de germinação em comparação com as diferentes concentrações testadas. Entretanto, o óleo de nim teve um efeito alelopático inibitório somente no crescimento da parte aérea das plântulas de tomate (Almeida et al., 2019).

Fora a germinação, o potencial alelopático pode ser observado também com o fomento no desenvolvimento de organismos, o qual foi indicado por Alves et al. (2004), que utilizaram o óleo essencial de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf. ex. Wardleworth) sobre plântulas de alface, indentificando que o extrato volátil de óleo essencial de jaborandi possui efeito alelopático benéfico, pois estimula o crescimento da radícula e não provoca inibição da germinação de sementes de alface (Alves et al., 2004), agindo assim como um fitormônio, ou seja, estimulando o crescimento de plântulas de alface.

Essas plantas têm importância significativa devido ao seu potencial alelopático servindo como uma alternativa mais ecológica e sustentável no controle de plantas infestantes em agricultura (Almeida et al., 2019). Dessa forma, o uso dessas plantas como bioherbicidas pode contribuir para a redução de agroquímicos, ou seja, diminuição do uso de produtos químicos agrícolas, como herbicidas e inseticidas. Promovendo um manejo sustentável que visa minimizar os impactos negativos desses produtos no ambiente (Gharibvandi et al., 2022).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade no Centro de Formação em Ciências Agroflorestais (CFCAf) no campus Jorge Amado (CJA) da Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), localizado no município de Ilhéus - BA.

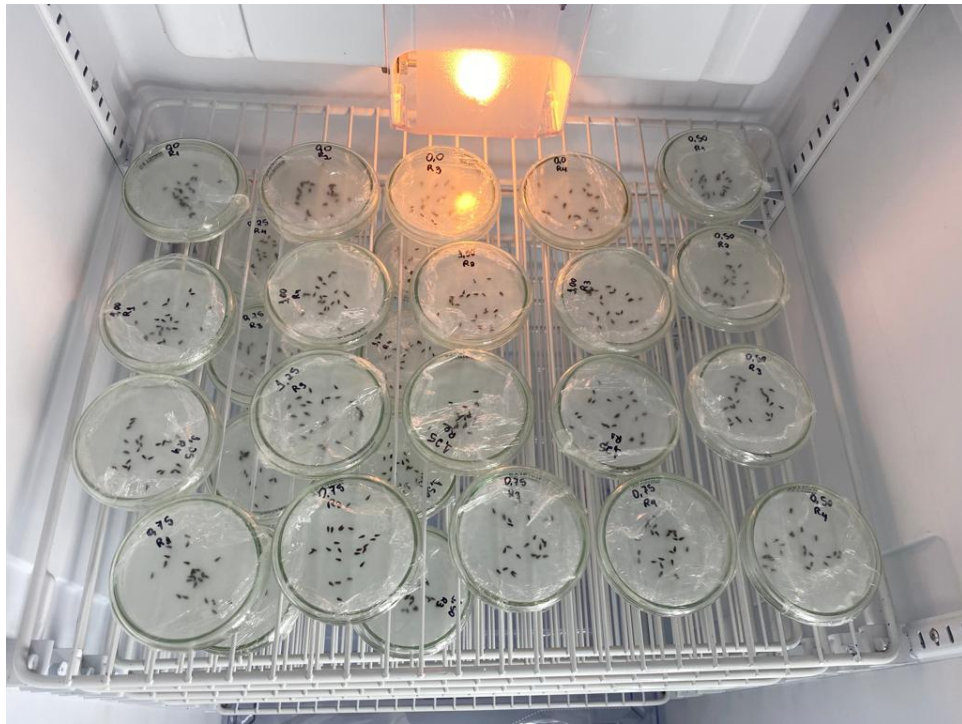
Utilizou-se o óleo essencial de resinas de troncos de árvores de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (amescla) obtidas do Viveiro Floresta Viva, localizado na cidade de Uruçuca-BA, com coleta realizada em fevereiro de 2021. O óleo essencial foi extraído em três diferentes temperaturas de vapor (80, 90 e 100 °C) pelo método de hidrodestilação que utiliza o aparelho Clevenger (De Lima *et al.*, 2016 com modificações), e, em seguida, acondicionados em frascos escuros e mantidos em refrigerador a 5 °C.

Os óleos essenciais foram analisados quanto à composição química no laboratório de cromatografia da Universidade Federal de Grandes Dourados (UFGD). A metodologia utilizada foi a cromatografia gasosa de alta resolução com cromatógrafo gasoso (ADAMS, 2007).

Para a investigação do efeito do óleo essencial, foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L., cultivar Aurélia da TopSeed®, adquiridas no comércio local na cidade de Itabuna-BA.

Posteriormente, cada óleo foi emulsionado com Tween 80, na proporção 1:1 e dissolvido em água destilada para a obtenção de soluções com concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50% (v/v). Essas concentrações constituiram os tratamentos e, para a concentração de 0,0, utilizou-se a solução de Tween 80 a 1,0% v/v e água destilada. As sementes foram acondicionadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) cujo fundo foi coberto com papel germitest e diretamente embebidas com as concentrações correspondentes das infusões; foram utilizadas 4 placas contendo 25 sementes para cada tratamento. As placas foram lacradas com plástico filme e mantidas em câmara de germinação do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à  $20 \pm 2$  °C, com presença de luz (Figura 1).

**Figura 1** – Bioensaio vegetal em blocos inteiramente casualizados.



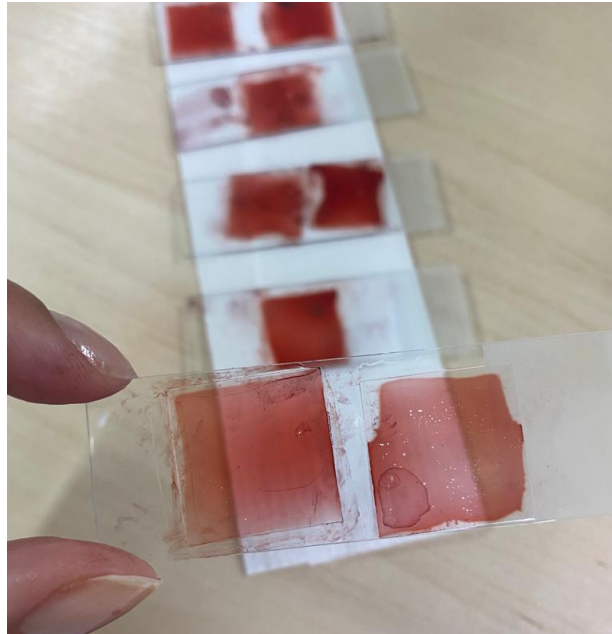
**Fonte:** Elaborado pela autora (2022).

Foi realizada uma avaliação visual, baseada no acompanhamento da germinação (G%) e na medição do crescimento radicular e aéreo das plântulas de *L. sativa* L. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi contabilizado diariamente junto com a germinação, realizado segundo a metodologia proposta por Maguire (1962).

O crescimento radicular e aéreo foram analisados após sete dias de exposição aos tratamentos (Brasil, 2009). Após a análise de germinação (48 h de exposição), 12 raízes de cada tratamento foram fixadas em metanol: ácido acético (3:1), e armazenadas a -20 °C. Foi realizada uma avaliação visual, baseada no acompanhamento da germinação e vigor das sementes através da contagem, analisando também comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz das plântulas (CR) por meio da medição através de régua graduada em milímetros.

Para as avaliações citotóxicas, lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2% (Andrade-vieira *et al.*, 2014), com cinco repetições para cada óleo e concentração.

**Figura 2** – Meristemas de *Lactuca sativa* L. sob orceína acética 2% para avaliações citotóxicas.



**Fonte:** Elaborado pela autora (2023).

Foram analisadas 5000 células meristemáticas por tratamento, sendo observadas e quantificadas as diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas e nucleares, para isto utilizou-se do microscópio óptico zeiss através de uma lente de aumento em 40x. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. Foram contabilizadas as porcentagens das alterações cromossômicas de maneira isolada, sendo elas: cromossomos perdidos, cromossomos aderentes, c-metáfases e pontes cromossômicas (Andrade-vieira *et al.*, 2014).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo as análises macroscópicas constituídas por quatro repetições e as análises citotóxicas por cinco repetições. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância na qual foi testado, primeiramente, o pressuposto da homogeneidade pelo teste de Levene e o da normalidade pelo teste de Shapiro, se atendidos, foi aplicado a anova e teste Tukey a 5% de probabilidade. Caso não atendidos, foram aplicados os testes para dados não-paramétricos de Kruskal Wallis, equivalente ao anova, e o teste de Wilcoxon, equivalente ao teste Tukey, para os dados de fitotoxicidade e citotoxicidade.

Para o efeito das concentrações dos óleos essenciais, os dados foram submetidos à análise de regressão e, para o ajuste das equações foi utilizado como critério a significância dos betas ( $p \leq 0,05$ ). Para todas as análises será utilizado o programa estatístico R empregando-se o pacote ExpDes (R core team, 2018).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados das análises de cromatografia gasosa (Tabela 1) dos óleos da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand extraídos em diferentes temperaturas de vapor, foram identificados um total de 24 compostos nas amostras dos óleos, com predominância de terpenos, especialmente a subclasse dos monoterpenos.

**Tabela 1** – Composição química do óleo essencial da resina de *P. Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand com base nos dados do CG (cromatografia gasosa).

Composto	TR (min)	IR*	IR	Composição(%)		
				M±DP		
				80°C	90°C	100°C
$\alpha$ -Thujeno	6,71	924	924	0,76±0,01	0,30±0,01	0,25±0,01
$\alpha$ -Pineno	6,97	932	932	3,51±0,07	3,57±0,09	3,52±0,05
Canfeno	7,38	946	946	0,62±0,02	0,62±0,01	0,58±0,02
Sabineno	8,21	969	969	1,88±0,11	1,90±0,12	1,53±0,13
$\beta$ -Pineno	8,32	974	974	3,57±0,22	3,76±0,19	3,30±0,26
$\alpha$ -Felandreno	9,29	1002	1002	5,24±0,32	4,00±0,41	5,11±0,21
$\delta$ -Careno	9,54	1008	1008	1,29±0,21	1,45±0,16	1,24±0,19
$\alpha$ -Terpineno	9,75	1014	1014	1,95±0,03	1,88±0,05	1,82±0,03
$\rho$ -Cimeno	10,04	1020	1020	34,92±0,19	34,97±0,34	33,46±0,27
Silvestreno	10,21	1025	1025	2,01±0,11	1,49±0,02	1,70±0,02
1,8-Cineol	10,29	1026	1026	12,65±0,08	12,82±0,13	12,42±0,22
$\gamma$ -Terpineno	11,40	1054	1054	2,52±0,14	2,48±0,03	2,44±0,04
Terpinoleno	12,62	1086	1086	22,21±0,41	22,38±0,37	22,03±0,31
Óxido de trans- limoneno	14,93	1137	1137	0,31±0,02	0,38±0,02	0,99±0,04
Trans-sabinol	14,99	1137	1137	0,11±0,01	0,14±0,01	0,65±0,02
Borneol	15,97	1165	1165	0,13±0,01	0,23±0,01	0,43±0,02

Terpinen-4-ol	16,42	1174	1174	3,77 ±0,31	4,05±0,27	4,04±0,18
ρ-Cimeno-8-ol	16,78	1179	1179	0,17±0,01	0,21±0,01	0,33±0,02
α-Terpineol	17,01	1186	1186	0,50±0,03	0,70±0,05	0,85±0,04
Verbeneona	17,43	1197	1197	1,12±0,06	1,15±0,05	1,17±0,06
Eugenol metilado	17,78	1204	1204	0,32±0,02	0,50±0,03	0,54±0,03
δ-Elemeno	23,25	1335	1335	0,34±0,02	0,31±0,01	0,87±0,05
σ-Cubebeno	23,96	1345	1345	0,28±0,01	0,28±0,02	0,31±0,02
γ-Muuroleno	29,38	1478	1478	0,36±0,02	0,40±0,02	0,42±0,01

**Legenda:** TR (Tempo de Retenção); IR\* (Índice de Retenção Inicial); IR (Índice de Retenção Final); M±DP (Média ± Desvio Padrão).

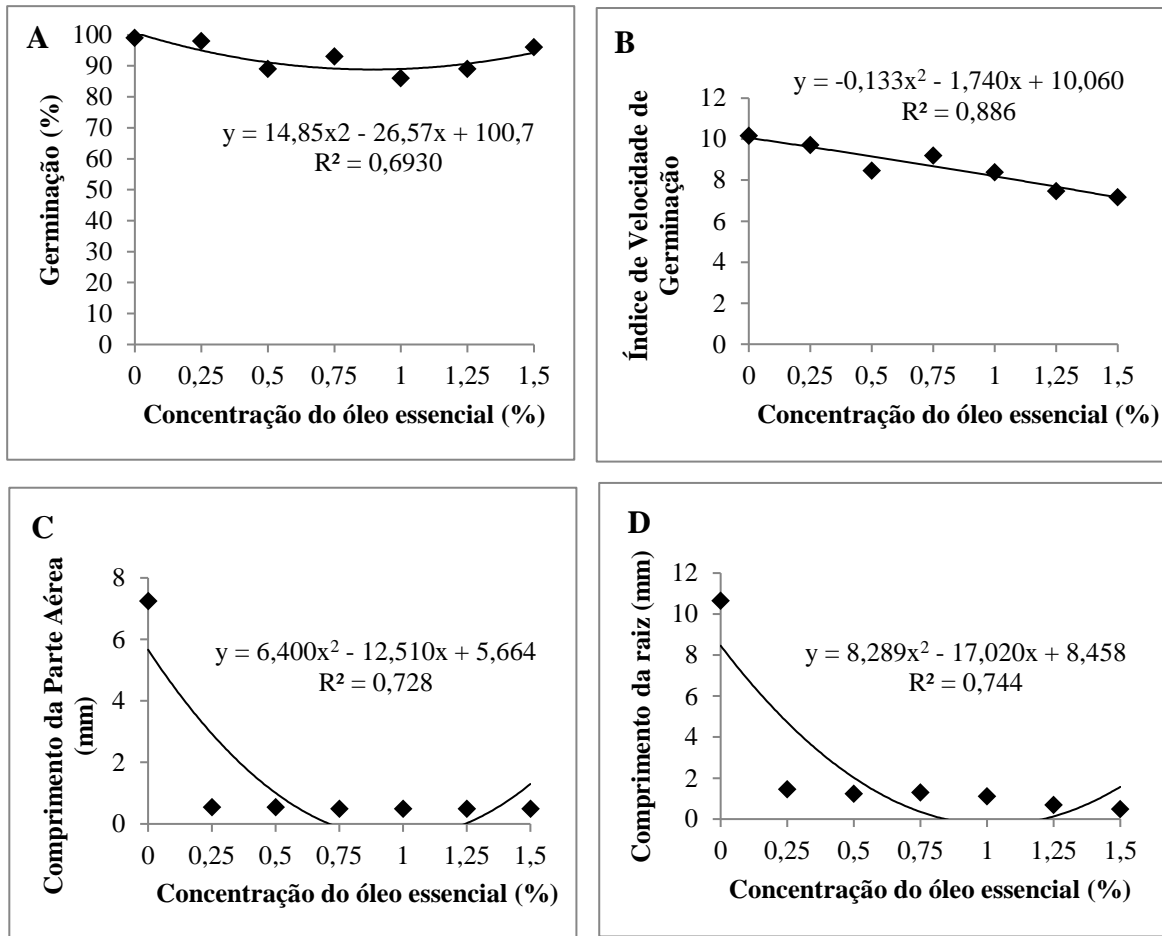
Para óleo com temperatura de vapor de 80°C foram identificados (99,24%) de monoterpenos na amostra, o constituinte majoritário foi o ρ-Cimeno (34,92%), seguido pelo terpinoleno (22,21%) e o 1,8-Cineol (12,65%). Já na temperatura de vapor 90°C (98,48%) monoterpenos foram apontados, tendo como constituinte principal o ρ-Cimeno (34,97%), seguido pelo terpinoleno (22,38%) e o 1,8-Cineol (12,82%). E por fim (97,86%) de monoterpenos na amostra com temperatura de vapor a 100°C, o constituinte com maior abundância foi o ρ-Cimeno (33,46%), seguido pelo terpinoleno (22,03%) e 1,8-Cineol (12,42%). Pode-se então observar que não houve diferença entre os constituintes principais independente da temperatura de vapor, apenas ocorreu diferença percentual entre quantidade de monoterpenos e principais constituintes.

Os aleloquímicos representam sinais químicos liberados no ambiente ao redor da planta, capazes de afetar a germinação de sementes, o crescimento de plantas, a produção de metabólitos, a fotossíntese, a respiração, o transporte na membrana e a comunicação química intracelular (Fabricante *et al.*, 2013). Essas substâncias desempenham um papel fundamental nas interações químicas entre diferentes organismos, promovendo interações tanto benéficas, quanto prejudiciais. Essas diversas funções desempenhadas por esses aleloquímicos são cruciais para a sobrevivência, evolução e coevolução das espécies vegetais (Maciel, 2018). Dessa forma, quando o monortepeno ρ-Cimeno desempenha atividades alelopáticas pode afetar o crescimento, o desenvolvimento ou a germinação de outras plantas.

Através dos ensaios macroscópios se pode analisar a porcentagem de germinação (G%), o índice de velocidade de germinação (IVG), o crescimento da

parte aérea (CPA) e o comprimento da raiz (CR) das plântulas de alface sob a exposição do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Figura 3).

**Figura 3** – Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea e radicular de plântulas de alface sob diferentes concentrações de óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand na temperatura de extração à vapor de 80°C.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Ao avaliar o efeito do óleo essencial com temperatura de vapor de 80°C na germinação de sementes de alface, observa-se que ocorreu uma redução percentual de germinação, sendo mais significativa na concentração de 1% (86%) em comparação com as outras concentrações (Figura 3A). A presença de terpenos pode inibir o processo de germinação de sementes, resultando em prejuízos para o desenvolvimento das plântulas.

De forma semelhante, resultados congruentes foram observados ao investigarem os efeitos alelopáticos do óleo de copaíba. Conforme a concentração

do óleo aumentava, o índice germinativo e a taxa de germinação diminuíam, levando a uma reduzida absorção das sementes de tomate pelo composto bioativo, ou seja, apresentou potencial osmótico da espécie bioindicadora (Cruz *et al.*, 2021).

Além da sensibilidade à osmose, a razão para tal está relacionada aos componentes orgânicos encontrados no bioativo. Esses compostos orgânicos podem resultar na redução da taxa de germinação e até mesmo inibir o crescimento normal, uniforme ou completo das plântulas. Dentre esses compostos, destacam-se os flavonoides e terpenos, como  $\alpha$ ,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -careno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno, biciclogermacreno, p-cimeno (Menezes filho, 2020). A interferência desses compostos nos processos de quebra de dormência da semente. Os terpenos, como  $\alpha$ ,  $\beta$ -pineno e limoneno, são conhecidos por afetar as membranas celulares e as estruturas internas das sementes, podendo impedir a absorção de água, essencial para o processo de germinação.

Também foi possível observar uma influência negativa da alelopatia ao empregar o óleo essencial de citronela nas sementes de picão-preto e capim-colônia. À medida que as concentrações aumentavam, verificou-se uma redução nos índices de germinação e na velocidade de germinação (Hirata *et al.*, 2018). Destacando o efeito nocivo do citronelal, composto presente na citronela, que pode afetar a função de enzimas envolvidas na germinação, inibindo a ativação adequadas dessas enzimas.

No que diz respeito a variável índice de velocidade de germinação (IVG), foi observado que o óleo essencial 80% atrasou o processo de germinação das sementes de alface, de acordo com as diferentes concentrações empregadas. Especificamente, a concentração de 1,5% teve o efeito mais significativo na redução da velocidade de germinação (7,125) (Figura 3B). A análise do índice de velocidade de germinação avalia quão rapidamente as sementes de alface germinam em resposta ao tratamento com óleo essencial. Dessa forma, é possível observar que à medida que a concentração do óleo essencial aumentava, o índice de velocidade de germinação diminuía. Esse padrão é semelhante ao encontrado por Almeida *et al.* (2019), que também observaram uma redução no índice de velocidade de germinação a partir da concentração de 0,75% do óleo essencial de colônia nas sementes de tomate. Além disso, Araujo *et al.* (2018) constataram que extratos aquosos das folhas e cascas do caule de *Sesbania Virgata* (Cav.) Pers em doses crescentes (50, 75 e 100%) afetaram a velocidade de germinação das sementes de

alface.

A composição química do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* varia entre diferentes subespécies da planta. No entanto a presença de constituintes tais como terpenos, os monoterpenos e sesquiterpenos, podem afetar a germinação de sementes resultando no decaimento do IVG. Marquers et al. (2010) observaram que 98,53% dos constituintes do óleo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand subespécie heptaphyllum, são monoterpenos, com o p-cimeno como o componente principal (39,93%). O que resulta a diminuição do IVG, devido a interferência nos processos bioquímicos nas sementes, como a ativação de enzimas envolvidas na quebra de dormência e na germinação.

Do mesmo modo, também foi realizada a análise da parte aérea das plântulas de sementes de alface submetidas ao óleo essencial de *Protium* extraído a 80 °C. A influência sobre o desenvolvimento do CPA foi perceptível quando o óleo foi aplicado causando inibição no desenvolvimento da parte aérea quando se comparada com o controle (Figura 3C).

Além disso, Almeida et al. (2019) também obtiveram resultados semelhantes ao observarem uma redução na parte aérea das plântulas com o aumento da concentração do óleo essencial de colônia nas sementes de tomate, sendo mais pronunciada nos dois últimos tratamentos (0,75 e 1,0%). Isso foi explicado pela oxidação, crescimento irregular ou alteração da cor da raiz, causada pela ação dos aleloquímicos presentes no composto bioativo, que afetam diretamente uma parte da planta (Almeida *et al.*, 2019).

Paralelamente, o óleo essencial da *S. Terebinthifolius*, quando em associação às sementes de alface, inibiram o desenvolvimento contínuo do vegetal, devido a presença de metabólitos secundários (Pereira, 2021).

Diferente do que foi observado, Oliveira et al. (2021), relatou em seu estudo nos quais não foram observadas quaisquer mudanças na variável CPA para as concentrações utilizadas (2,5%; 5,0% e 7,5%) do óleo essencial de folhas *Blepharocalyx salicifolius* sobre sementes de alface.

Na análise do comprimento da raiz, os valores foram divergentes em cada concentração, sofrendo um declínio ao decorrer dos tratamentos, sendo que a planta mais afetada foi a que tinha a concentração de 1,50% (v/v) resultando em um baixo crescimento (0,5 cm), evidenciando um efeito inibitório no crescimento radicular devido a alta toxicidade do óleo essencial (Figura 3D).



Hofmann et al. (2007) afirmam que o sistema de raízes das plantas é particularmente suscetível aos efeitos dos aleloquímicos, já que o crescimento da raiz depende das divisões celulares, que, se inibidas, prejudicam seu desenvolvimento regular. Tais transformações na forma das plantas acontecem devido às ações das fitotoxinas

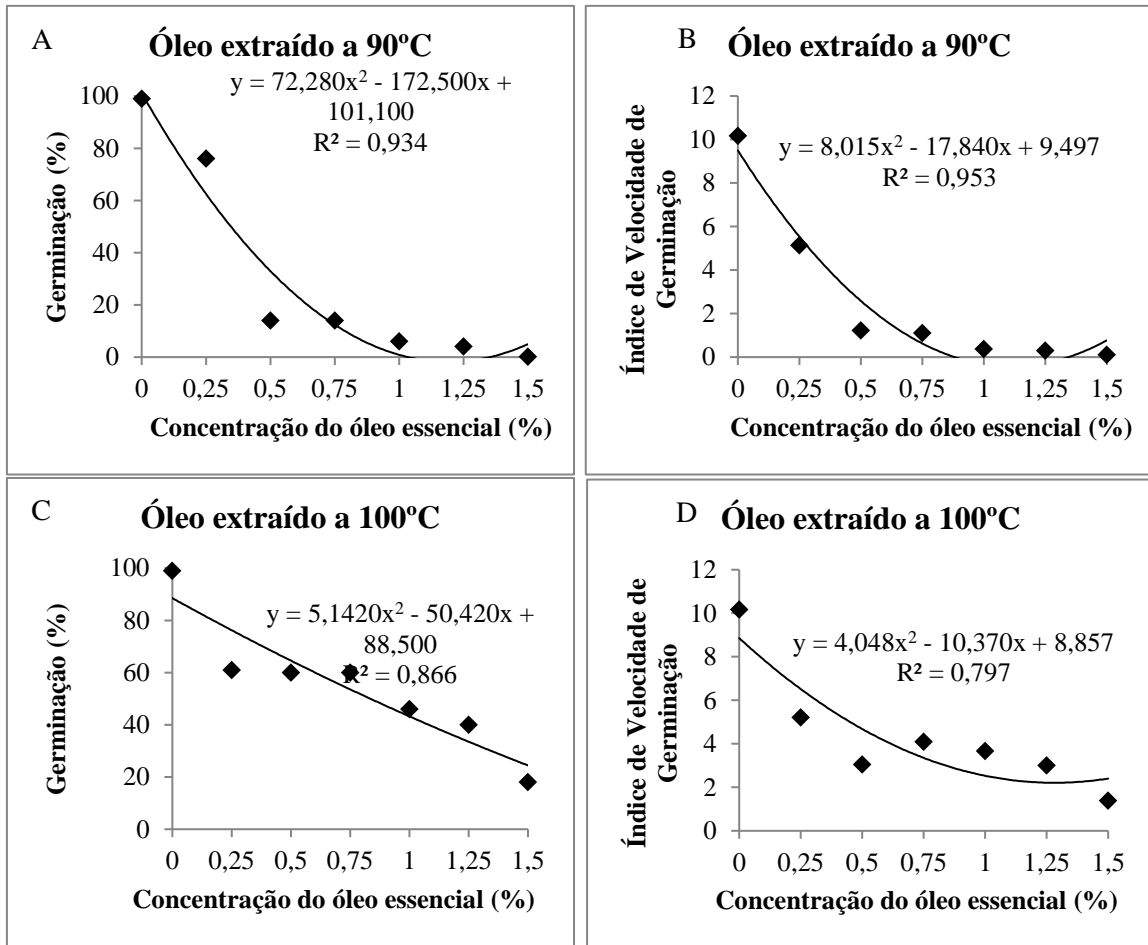
Adicionalmente, Andrade-Vieira et al. (2014), observou uma redução de 81% no desenvolvimento da radícula em um tratamento com 80% de concentração do óleo de *Jatropha curcas* em relação às sementes de alface.

A inibição do crescimento da raiz é mais acentuada quando os aleloquímicos entram em contato direto com ela. Contudo, outros elementos podem influenciar a produção de metabólitos secundários e, conseqüentemente, a fitotoxicidade provocada pela plantas. Estes fatores incluem interações com herbívoros, patógenos, disponibilidade de nutrientes e quantidade de água (Maciel, 2018).

Tais inibições estão relacionadas aos metabólitos secundários encontrados no óleo essencial de *Protium Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Tabela 1). Quando esses metabólitos foram associados às sementes de alface, observou-se uma inibição do desenvolvimento das plântulas. Isso resultou em uma redução na germinação, no índice de velocidade de germinação, no comprimento da parte aérea e no comprimento radicular das plântulas.

Foi possível observar que ocorreu uma redução da porcentagem de germinação conforme se aumentou a concentração do óleo nas temperaturas de vapor correspondentes a 90 e 100 °C (Figura 4), sendo que o menor percentual de germinação (0%) se deu na concentração de 1,50% (v/v), do tratamento com óleo de temperatura de vapor 90 °C (Figura 4A).

**Figura 4** – Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação sob diferentes concentrações de óleo essencial de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand nas temperaturas de extração à vapor de 90 e 100 °C.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Em relação ao índice de velocidade de germinação (IVG), foi observado que os óleos retardaram o processo de germinação das sementes de alface, notadamente a maior concentração utilizada (1,5%) foi onde ocorreu o menor índice de germinação, sendo (0,1) para o óleo extraído a 90°C (Figura 4B) e (1,38) para o óleo extraído a 100 °C (Figura 4D). Similarmente, Pereira (2021), ao analisar o efeito do óleo essencial de aroeira sob sementes de alface, também demonstrou que a medida que houve um aumento da concentração também ocorreu um retardamento do IVG.

Devido a toxicidade do óleo, as sementes expostas às soluções dos óleos (90 e 100°C), independentemente da concentração utilizada, não apresentaram desenvolvimento mensurável no crescimento da parte aérea e no comprimento radicular das plântulas de alface. A germinação pode ser afetada pela presença de aleloquímicos, não obstante, esses impactos são mais significativos no desenvolvimento radicular (Baličević *et al.*, 2014b; Konstantinović *et al.*, 2014).

Foi possível notar similariedade no projeto de Pereira (2021) quando foi relatado que a alelopatia do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius Raddi* (aroeira) sobre sementes de alface, resultou em uma falta da análise de variáveis como crescimento da parte aérea e comprimento radicular das sementes submetidas ao bioativo extraído em maiores temperaturas devido ao aparecimento de plantulas anormais.

Na análise citogenética das células meristemáticas das raízes expostas ao óleo essencial de amescla, os estádios do ciclo celular foram registrados na Tabela 2. Foi possível observar o efeito citotóxico dos óleos, sendo encontrado uma redução do índice mitótico (IM) com o aumento das concentrações do óleo. Em menores concentrações dos óleos, maiores os valores dos parâmetros de divisão normal (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase).

**Tabela 2** - Fases do ciclo celular e índice mitótico de células meristemáticas de *Lactuca sativa* L. expostas em diferentes concentrações do óleo essencial de amescla extraído em diferentes temperaturas de vapor.

Temperatura de vapor	Concentração do óleo (%)	I (%)	P (%)	M (%)	A (%)	T (%)	IM (%)
80%	0,00	96,0a <sup>(1)</sup>	1,4a	1,3a	0,7a	0,4a	4,0a
	0,25	97,7a	0,8b	1,2a	0,6a	0,5a	3,1a
	0,50	96,2a	0,9b	0,4b	0,5a	0,7a	2,5b
	0,75	97,2a	0,7b	0,3b	0,2a	0,4a	1,6b
	1,00	95,7a	1,1b	0,6b	0,7a	0,7a	3,1a
	1,25	94,9a	0,9b	1,4a	1,2a	0,9a	3,8a
	1,50	96,1a	0,4b	0,5b	0,8a	0,7a	3,2a
90%	0,00	96,0a	1,4a	1,3a	0,7a	0,4a	4,0a
	0,25	95,9a	1,4a	0,7b	0,8a	0,2a	2,7a
	0,50	95,6a	2a	0,7b	0,8a	0,4a	3,9a
	0,75	96,5a	1,2a	0,4b	0,3b	0,5a	2,4a
	1,00	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
	1,25	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
	1,50	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
100%	0,00	96,0a	1,4a	1,3a	0,7a	0,4a	4,0a
	0,25	97,1a	0,7b	0,4a	0,2a	0,4a	2,1b
	0,50	91,4b	3,0a	0,4a	1,2a	0,3a	8,0a
	0,75	93,6b	3,3a	1,0a	1,2a	0,4a	5,9a
	1,00	95,4a	1,2b	0,9a	0,4a	1,0a	4,0a
	1,25	90,7b	3,2a	1,1a	1,5a	1,3a	7,5a
	1,50	95,4a	1,8b	0,5a	1,4a	0,2a	3,9a

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

<sup>(1)</sup>Letras diferentes representam diferenças significativas em relação às diferentes concentrações de um mesmo óleo essencial e o controle no teste Tukey a 5% de probabilidade. Em que: I, interfase; P, prófase; M, metáfase; A, anáfase; T, telófase; e IM, índice mitótico.

De maneira geral, a temperatura que resultou nos menores números referentes as divisões celulares foi o óleo com temperatura de vapor 90 °C pois foi perceptível o declínio em relação aos valores das variáveis I, P, M, A, T, IM a partir da concentração de 1%. Conforme o aumento da concentração obteve-se maior toxicidade do óleo.

O índice mitótico (IM) pode ser utilizado como um indicador-chave para avaliar a toxicidade dos tratamentos. Os resultados referentes ao valores do índice mitótico decaem ao decorrer do aumento das concentrações, indicando que a exposição aos tratamentos afetou o crescimento e desenvolvimento da *Lactuca sativa* L, destacando a presença de citotoxicidade do óleo, resultando em impacto negativo nas células da planta.

A toxicidade dos diversos óleos pode ser identificadas por meio do índice mitótico (IM). É possível determinar o grau de citotoxicidade de um composto em teste observando-se a diminuição ou aumento do índice mitótico. A ocorrência do bloqueio dos processos de divisão mitótica e a morte do núcleo, impedem o início da prófase e, conseqüentemente, a ocorrência das divisões celulares, resultando na diminuição do índice mitótico, indicando que a redução do crescimento radicular está associado à redução do índice mitótico (Andrade *et al.*, 2010). Valores inferiores aos do controle sugerem que a exposição aos tratamentos afetou o crescimento e desenvolvimento da *L. sativa* L. caracterizando assim a citotoxicidade (Paula *et al.*, 2015). Corroborando em implicações significativas na agricultura e no manejo de plantas.

O crescimento e desenvolvimento das plantas ocorre por meio de repetidos ciclos mitóticos, nos quais a proliferação celular é essencial (Pinheiro *et al.* 2015). Uma diminuição no índice mitótico implica em uma redução no número de novas células formadas no organismo, e conseqüentemente em um decréscimo no crescimento do organismo.

O óleo de 90 C° nas concentrações de (1,0; 1,25 e 1,5%) não apresentaram resultados de intérfase, conseqüentemente por que não ocorreu germinação, sendo evidenciado uma alta influência alelopática, o que corrobora com a capacidade

desse composto como bioherbicida.

Os aleloquímicos têm a capacidade de exercerem amplos efeitos sobre a germinação e o crescimento das plantas, influenciando várias de suas funções fisiológicas, incluindo processos metabólicos, divisão celular, respiração e fotossíntese. Isso ocorre porque os aleloquímicos interferem no metabolismo normal, exercendo uma influência significativa sobre a germinação das sementes. Durante as fases iniciais da germinação, esses compostos podem sofrer alterações como diminuir ou atrasar processos devido a fitotoxicidade, afetando a mobilização de reservas (Gniazdowska; Bogatek, 2005).

Dessa forma os resultados obtidos são atribuíveis aos aleloquímicos presentes no óleo essencial (Alves *et al.*, 2014). Visto que, os aleloquímicos presentes no óleo exerceu um efeito inibitório sobre o desenvolvimento das sementes de alface.

Os efeitos visíveis notados em muitos estudos de alelopatia são manifestações secundárias das alterações que ocorrem no nível de DNA que podem ser detectadas através de análises citológicas e citogenéticas por bioensaios (Paula *et al.*, 2015). Esses efeitos visíveis podem sugerir a fitotoxicidade desses compostos secundários nos processos de divisão celular, resultando em danos e modificações cromossômicas.

Nas análises de citotoxicidade (Tabela 3) foram utilizados ensaios microscópicos para possíveis avaliações, destacando-se as frequências de cada tipo de alterações cromossômicas, em que foram observados c-metáfases, cromossomos aderentes, cromossomos perdidos e pontes cromossômicas.

**Tabela 3** - Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas das raízes de *Lactuca sativa* L. expostas ao óleo essencial de amescla.

Temperatura de vapor	Concentração do óleo (%)	C-Met	Aderente	Perdido	Ponte
80%	0,25	0,8b <sup>(1)</sup>	0,2a	0,1a	0,2a
	0,50	1,2a	0,2a	0,1a	0,2a
	0,75	0,8b	0,3a	0,1a	0,3a
	1,00	0,8b	0,3a	0,1a	0,3a
	1,25	1,1a	0,3a	0,1a	0,3a
90%	1,50	1,8a	0,3a	0,1a	0,3a
	0,25	0,9a	0,1a	0,3a	0,1a

	0,50	0,6a	0,1a	0,1a	0,1a
	0,75	0,8a	0,1a	0,1a	0,1a
	1,00	0,0b	0,0a	0,0a	0,0a
	1,25	0,0b	0,0a	0,0a	0,0a
	1,50	0,0b	0,0a	0,0a	0,0a
100%	0,25	0,7a	0,2a	0,1a	0,1a
	0,50	0,7a	0,1a	0,1a	0,1a
	0,75	1,0a	0,1a	0,1a	0,1a
	1,00	0,5a	0,1a	0,1a	0,1a
	1,25	0,7a	0,1a	0,1a	0,1a
	1,50	0,7a	0,1a	0,1a	0,1a

**Fonte:** Dados da pesquisa (2023).

<sup>(1)</sup>Letras diferentes representam diferenças significativas em relação às diferentes concentrações de um mesmo óleo essencial e o controle no teste Tukey a 5% de probabilidade. Onde: C-Met (%) porcentagem de c-metáfases por células em divisão; Aderente (%) porcentagem de cromossomos aderentes por células em divisão; Perdido (%) porcentagem de cromossomos perdidos por células em divisão; Ponte (%) porcentagem de pontes por células em divisão.

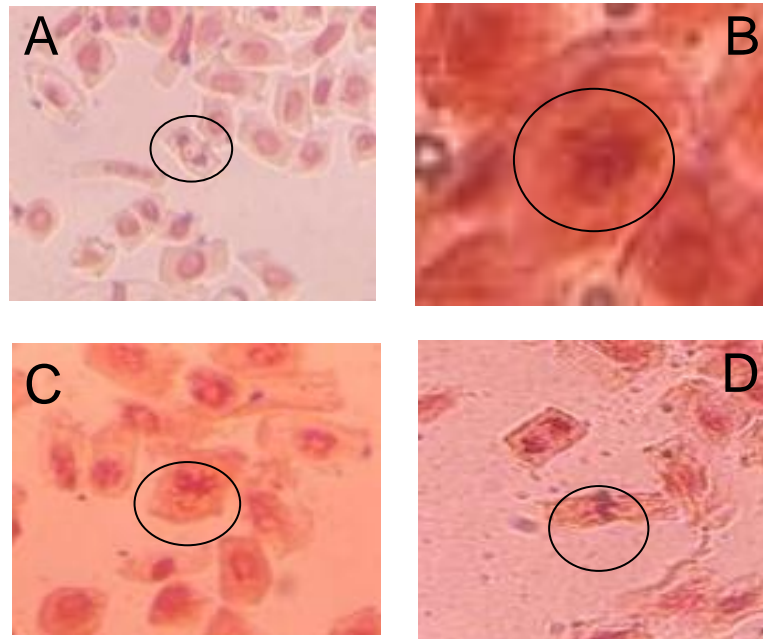
Em relação às modificações nos cromossomos, foram identificadas ocorrências de c-metáfases, anáfases com pontes, cromossomos aderentes, cromossomos perdidos. Foram registradas estruturas como pontes e fragmentos originados de diferentes fases do ciclo celular, como anáfases e telófases, respectivamente. Entretanto, a maioria das alterações constatadas pertencem a etapa de metáfase, especificamente a c-metáfase (Figura 8).

As alterações cromossômicas aumentaram significativamente conforme o aumento das concentrações, entretanto em todas as concentrações do óleo foi possível notar a presença de alterações. Foi possível inferir que valores próximos a zero (0,1), indicam que o óleo apresentou um alto efeito alelopático, pois não ocorreram alterações em suas concentrações, ou seja, os efeitos das concentrações anteriores foram tão fortes que evidenciaram maiores alterações cromossômicas.

A avaliação da genotoxicidade de uma substância ou composto é estabelecida com base na análise das aberrações cromossômicas, ao passo que a identificação de anormalidades nucleares e a avaliação do índice mitótico são empregadas na determinação da citotoxicidade (Leme; Marin-Morales, 2009).

**Figura 8** – Anormalidades nucleares e cromossômicas observadas em raízes meristemáticas de *Lactuca sativa* L. do óleo essencial de *Protium Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand extraído em três diferentes temperaturas de vapor (80, 90 e

100%). A= anáfase com fonte; B= C- metáfase; C= cromossomo perdido; D= cromossomo aderente.



**Fonte:** Elaborado pela autora (2023).

Quando ocorre modificação na estrutura cromossômica que resultam na perda das características normais de condensação ou na alterações da sequência de DNA de um organismo, isso se dá devido a ação do mecanismo clastogênico, ambos mecanismos têm a capacidade de indicar a morte celular (Maciel, 2018). Por outro lado as injúrias no fuso mitótico são causadas pela ação aneugênica, e essas lesões são prejudiciais às células, afetando a segregação simétrica dos cromossomos ou cromátides durante a divisão celular, resultando em uma segregação cromossômica anormal e determinando um desequilíbrio genômico nas células filhas (Freitas *et al.*, 2016).

As pontes são alterações cromossômicas (Figura 8A) que podem ser desencadeadas pela aderência cromossômica, uma vez que os cromossomos tendem a permanecer unidos e, quando separados, estão sujeitos a sofrer rupturas cromossômicas (Freitas *et al.*, 2016). Independente do valor da concentração percebe-se a presença de pontes cromossômicas, essa presença de fragmentos cromossômicos e de pontes resultantes de quebras cromossômicas, sugerem que os óleos possuem o efeito clastogênico, isto é, atuam diretamente DNA do indivíduo.

De acordo com os dados da Tabela 3, a C-metáfase (Figura 8B) se destacou como a anormalidade predominante, o que reforça ainda mais a indicação da

mutagenicidade dos tratamentos. Na C-metáfase, o fuso nuclear fica completamente inativo sugerindo que nenhuma placa equatorial se forme de maneira organizada, o que, por sua vez, resulta em impedimento ou atraso na divisão do centrômetro (Maciel, 2018). A duplicação no número de cromossomos pode ser conduzida pela presença contínua de células em C-metáfase. A presença de células em C-metáfase aponta para a ação do agente tóxico nas fibras do fuso, o que interrompe a continuação do ciclo mitótico (Leme e Marin-Morales 2009). Como consequência desse distúrbio, o ciclo celular é interrompido na metáfase o que ocasiona na dispersão e condensação dos cromossomos.

De acordo com a utilização das concentrações dos tratamentos, as células meristemáticas expostas ao composto apresentaram presença de cromossomos aderentes. Considerada como irreversível a aderência cromossômica (Figura 8D), auxilia como um indicador de que o material genético está sob influência tóxica, representa um tipo de anormalidade nas proteínas histônicas da cromatina, e não no próprio DNA, geralmente leva a morte celular. Além disso é um indicativo de ação clastogênicas e/ou aneugênica.

## **5 CONCLUSÃO**

O óleo essencial com temperatura de vapor 90°C apresenta efeitos alelopáticos fitotóxicos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de alface.

Quanto à cito e genotoxicidade, a quantidade de alterações cromossômicas está relacionada ao aumento das concentrações dos óleos. Concentrações mais elevadas resultam em alterações mais significativas, sendo mais relevante com o óleo à 90°C.

Há maiores alterações nucleares e cromossômicas nas células em seus processos de divisões.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. **4th ed. Carol Stream: Allured**, 2007. 804 p.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety Journal**, v. 73, n.11, p. 626-663, 2010.
- ALMEIDA, L.; TEIXEIRA, M. C.; LEMOS, J. R.; LACERDA, M. N.; SILVA, T. C. Bioatividade de óleos essenciais na germinação e no vigor em sementes de tomate. **Biotemas**, v. 32, n. 2, p. 13-21, 2019.
- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- ALVES, T. de A., et al. Efeito do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. In: **III SIMPÓSIO SOBRE A DIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA**, p. 439-444, 2014.
- ANDRADE, A. M. Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; LAVIOLA, B. G.; PALMIERI, M. J.; PRACA-FONTES, M. M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. ; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. V.; CARRIJO, T. T.; Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista biologia tropical**. v. 65, n.2 p.435-443, 2017.
- ARAÚJO, A. C. M. A. Obtenção do óleo de sementes dos frutos do cerrado pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) e murici (*Byrsonima crassifolia*) utilizando diferentes solventes no processo de extração. **Dissertação** (Programa de PósGraduação em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ARAUJO, E. C. G.; CARDOSO SILVA, T.; LIMA, T. V. Efeitos alelopáticos de *Sesbania virgata* (cav.) Pers na germinação de sementes de alface. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 101-109, 2018.
- ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S.O.; PAVAN, E.; DE ALMEIDA, G.V.B.; DE OLIVEIRA, R.G.; WAGNER, T.; CECHINEL FILHO, V.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. Chemical characterization, toxicology and mechanism of gastric antiulcer action of essential oil from *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms in the *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, n. 1, p. 292–306,

2017.

ASSAEED, A.; ELSHAMY, A.; EL GENDY, A.E.-N.; DAR, B.; AL-ROWAILY, S.; ABD EL-GAWAD, A. Sesquiterpenes-rich essential oil from above ground parts of *Pulicaria somalensis* exhibited antioxidant activity and allelopathic effect on weeds. **Agronomy**, v. 10, n. 399, p.1-14, 2020.

BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v 25, p. 1078-1080, 2002.

BALIĆEVIĆ, R.; RAVLIĆ, M.; KNEŽEVIĆ, M.; SEREZLIJA, I. Allelopathic effect of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) water extracts on germination and initial growth of maize. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1844-1848, 2014.

BRANDÃO, M.G.L., ZANETTI, N.N.S., OLIVEIRA, G.R.R., GOULART, L.O., MONTE-MOR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras.Farmacogn.** v. 18, p. 127-134, 2008.

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

CRUZ, R. M. da et al. Atividade alelopática do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) na qualidade das sementes de tomate. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e24710313266, 2021.

DAMTIE, D.; BRAUNBERGER, C.; CONRAD, J.; MEKONNEN, Y.; BEIFUSS, U. Composition and hepatoprotective activity of essential oils from Ethiopian thyme species (*Thymus serrulatus* and *Thymus schimperi*). **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 1, p. 120–128, 2019.

DE LIMA, E. et al. Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. Suppl 1, p. S42, 2016.

DENG, W.; LIU, K.; CAO, S.; SUN, J.; ZHONG, B.; CHUN, J. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation. **Molecules**, v. 25, n. 217, p. 1-12, 2020.

EL-GAWAD, A. M.; EL-AMIER, Y. A.; BONANOMI, G. Allelopathic activity and chemical composition of *Rhynchosia minima* (L.) DC. essential oil from Egypt. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 1, p. 1700438, 2018.

EL-GAWAD, A. M.; ELSHAMY, A. I.; EL GENDY, A. E. N.; GAARA, A.; ASSAEED, A. M. Volatiles profiling, allelopathic activity, and antioxidant potentiality of *Xanthium strumarium* leaves essential oil from Egypt: Evidence from chemometrics analysis. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 584, 2019a.

EL-GAWAD, A.M.; ELSHAMY, A.; EL GENDY, A.E.-N.; AL-ROWAILY, S.L.; ASSAEED, A.M. Preponderance of oxygenated sesquiterpenes and diterpenes in the

volatile oil constituents of *Lactuca serriola* L. revealed antioxidant and allelopathic activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 1, p. e1900278, 2019b.

ELSHAMY, A.I.; AMMAR, N.M.; HASSAN, H.A.; AL-ROWAILY, S.L.; RAGA, T.R.; EL GENDY, A.; ABD EL-GAWAD, A.M. Essential oil and its nanoemulsion of *Araucaria heterophylla* resin: Chemical characterization, anti-inflammatory, and antipyretic activities. **Industrial Crops and Products**, v. 148, n. 1, p. 112272, 2020.

ESTEVAM, E. B. B.; ALVES, C. C. F.; ESPERANDIM, V. R.; CAZAL, C. M.; SOUZA, A. F.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (Burseraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n 1, p. e-794, 2018.

FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, M. N. A.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 647-654, 2013.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

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

GABOR, W.E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. **Weed Science**, v.29, p.155- 159, 1981.

FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, n. 1, p. 426-434, 2016.

GHARIBVANDI, A.; KARIMMOJENI, H.; EHSANZADEH, P.; RAHIMMALEK, M.; MASTINU, A. Weed management by allelopathic activity of *Foeniculum vulgare* essential oil. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, p. 1-9, 2022.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

HIRATA, D. B. et al. Efeito alelopático do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e extrato de *Annona muricata* na germinação de *Bidens pilosa* e *Megathyrus maximus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 712-728, 2018.

KONSTANTINOVIĆ, B.; BLAGOJEVIĆ, M.; KONSTANTINOVIĆ, B.; SAMARDŽIĆ, N. Allelopathic effect of weed species *Amaranthus retroflexus* L. on maize seed germination. **Romanian Agricultural Reserach**, v. 31, p. 315- 321, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research / Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LOZADA, M. I. O. et al. Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Cepae* in onion seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, n. 3, p. 510-518, 2019.

LU, Y. et al. Allelopathy of three Compositae invasive alien species on indigenous *Lactuca sativa* L. enhanced under Cu and Pb pollution. **Scientia Horticulturae**, v. 267, n. 1, p. 109323, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109323>.

MACÍAS, F. A.; MEJÍAS, F. JR.; MOLINILLO, J. M. G. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications, **Pest management science**, v. 75, n. 9, p. 2413–2436, 2019.

MACIEL, K. S. Desempenho de híbridos brs de maracujazeiros em diferentes altitudes: caracterização agronômica, ecofisiologia e alelopatia. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2018.

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

MAHMOODZADEH, H.; GHASEMI, M.; ZANGANEH, H. Allelopathic effect of medicinal plant *Cannabis sativa* L. on *Lactuca sativa* L. Seed germination. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 102, n. 2, p. 233-239, 2015. DOI: <https://doi.org/10.14720/aas.2015.105.2.06>.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N. de; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, vol. 40, n. 1, p. 227-230, 2010.

MARTINS, S. A. et al. Allelopathic potential and phytochemical screening of *Piper divaricatum* extracts on germination and growth of indicator plant (*Lactuca sativa*). **South African Journal of Botany**, v. 138, n. 1, p. 496-499, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.014>.

MENEZES FILHO, A. C. P. de. *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*: revisão sistemática da classificação, e aspectos químicos, fitoquímicos, biológicos e farmacobotânicos. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 3, p.490-513, 2020.

MIRANDA, C. A. S. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1783-1798, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p1783>.

MORAES, M.M.; CAMARA, C.A.G.; RAMOS, C.S. Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants, Abingdon**, v.16, p.300-307, 2013.

NOGUEIRA, A. O.; OLIVEIRA, Y. I. S.; ADJAFRE, B. L.; DE MORAES, M. E. A.; ARAGÃO, G. F. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum*: a literature review. **Fundamental & clinical**

**pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 4-12, 2019.

OLIVEIRA, B. S. de, et al. Caracterização química e atividade alelopática do óleo essencial de folhas de *Blepharocalyx salicifolius*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 41, p. 1-7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201902042>.

PAULA, C.; CANTELI, V.; SILVA, C.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguulata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 577-584, 2015.

PEREIRA, L. O. Extração e alelopátia do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) sobre sementes de alface. **Monografia** (Bacharelado Interdisciplinar em Ciências, Centro de Formação em Ciências Agroflorestais) - Universidade Federal do Sul da Bahia, Itabuna, 2021.

PEROVIC, A. et al. A further study of the kinetics and optimization of the essential oil hydrodistillation from lavender flowers. **Chinese Journal os Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 126-130, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.06.028>.

PINHEIRO, P. F. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 41, p. 8981-8990, 2015.

RADZI, N. C.; KASIM, F. A. Effect of microwave pretreatment on gaharu essential oil using hydrodistillation method. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 960-966, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijc.43191>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de *Gleicheniaceae*. **Floresta e Ambiente**, v.7, p.190-197, 2000.

SURESH, A. et al. Techniques for essential oil extraction from kaffir lime and its application in health care products – A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 36, n. 2, p. 5-21, 2021. DOI: <https://doi-org.ez427.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ffj.3626>.

