

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ATIVIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium gaudichaudianum* NO CICLO CELULAR DE ALFACE

Francisco Liviê Arrais Mendes Oliveira¹, Loren Cristina Vasconcelos¹, Luiza Alves Mendes², Renata Pereira Lopes Moreira², Marcia Flores da Silva Ferreira¹, Milene Miranda Praça Fontes¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, Departamento de Biologia - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, livietearrais18@gmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, mfloressf@gmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br.

²Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Departamento de Química - 36570-900 - Viçosa-MG, Brasil, luiza.alves@ufv.br, renata.plopes@ufv.br.

Resumo

O óleo essencial (OE) de *Psidium gaudichaudianum* (Myrtaceae) é uma alternativa sustentável ao uso de herbicidas sintéticos. A formação de complexos de inclusão (CI) a partir do encapsulamento do OE no composto 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) tem se mostrado útil para preservar a integridade química e aumentar a solubilidade dos OEs em meio aquoso. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do OE de *P. gaudichaudianum* e do CI de HP β CD contendo OE, no ciclo celular de células de *Lactuca sativa*. Para a análise, foram preparadas lâminas citológicas das raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do OE, CI, dos controles positivo e negativo, e avaliado o índice mitótico e as alterações cromossômicas e nucleares. O CI apresentou reduções no índice mitótico das células de *L. sativa* nas concentrações de 375, 750, 1.500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. OE puro não apresentou esse efeito. Tanto OE puro quanto os CIs não apresentaram efeito genotóxico. Esses resultados indicam que o CI com o OE de *P. gaudichaudianum* apresentou atividade citotóxica nas células *L. sativa*, e o complexo de inclusão em HP β CD preservou suas bioatividades.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Genotoxicidade. Complexo de Inclusão.

Área do Conhecimento: Genética.

Introdução

Os agroquímicos, como os herbicidas sintéticos, são importantes pois provêm significativo aumento na produção agrícola. Entretanto, seu uso intensificado e indiscriminado tem provocado sérios problemas nos últimos tempos, como a contaminação do solo, da água e dos alimentos, além da indução de resistência em populações alvo e em organismos não alvo. Sendo assim, é importante a produção de agroquímicos menos prejudiciais ao ambiente e a biodiversidade (ANVISA, 2011; DA ROCHA *et al.*, 2020; POWLES; YU, 2010; SANCHES; CAMPOS; VIEIRA, 2003).

Os óleos essenciais (OE) são uma opção sustentável aos herbicidas sintéticos. A complexidade na composição química os tornam menos propensos a induzir resistência em populações alvo, os mesmos também tendem a afetar menos os organismos não alvo (ASBAHANI *et al.*, 2015; KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008). OEs extraídos de representantes da família Myrtaceae, como de indivíduos da espécie *P. gaudichaudianum* Proença e Faria, foram relatados por apresentar propriedades herbicidas (VASCONCELOS, *et al.*, 2019). No entanto, a facilidade de degradação dos OEs por fatores ambientais, e alta volatilidade, inviabilizam seu uso em campos agrícolas. Os OEs podem sofrer alterações químicas na presença de oxigênio, radiação, íons, temperatura alta, perdendo suas bioatividades, além disso, a característica apolar do OE também dificulta sua aplicação, uma vez que é necessário ele estar solubilizado em meio aquoso. A proteção dos OEs contra esses fatores e o aumento de sua solubilidade em água pode ser alcançado através do seu encapsulamento no interior de algum biopolímero (GUPTA; VARIYAR, 2016; HONG; PARK, 1999). A 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) é um biopolímero derivado do amido e possui uma estrutura semelhante a um cone truncado e oco, onde a superfície externa é hidrofílica e a cavidade interna é hidrofóbica, esse biopolímero tem

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

sido usado para o encapsulamento de muitos OEs. No processo de encapsulamento o OE é inserido no interior da cavidade da HP β CD, interagindo com a superfície interna por meio de interações do dipolo intatâneo-dipolo induzido, a interação entre o OE e a cavidade da HP β CD forma o complexo de inclusão (HOU *et al.*, 2022; JIANG *et al.*, 2021; KFOURY *et al.*, 2019; MARQUES, 2010; VARAN *et al.*, 2017).

Esse trabalho visou produzir CI com o OE extraído das folhas de indivíduos da espécie *P. gaudichaudianum*, afim de analisar a atividade do CI e do OE puro no ciclo celular de células meristemáticas da planta modelo *Lactuca sativa*. A atividade citotóxica foi analisada utilizando como parâmetro o índice mitótico (IM), e a atividade genotóxica foi analisada através da identificação de alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) (LEME E MARIN-MORALES, 2009; MARTINS *et al.*, 2016).

Metodologia

O OE foi obtido através da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger, de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (SOUSA, 2019). A identificação e a semiquantificação dos compostos do OE foram realizadas utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS QP2010SE, Shimadzu, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes *et al.* (2017). O CI do OE da *P. gaudichaudianum* foi preparado pelo método de inclusão molecular através da técnica de maceração, seguindo a metodologia de Santos *et al.* (2015), com algumas adaptações.

Os OEs e os CI foram diluídos nas concentrações de 187,5, 375, 750, 1.500 e 3.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando como solvente uma mistura de água destilada com acetona (2%) e tween 80® (0,05%). O ensaio foi realizado com placas de Petri de vidro contendo 9 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Foram colocadas 25 sementes de alface em cada uma das placas, em seguida foram embebidas com alíquotas de 2,5 mL de uma das determinadas concentrações. Utilizou-se 5 placas para cada uma das diferentes concentrações do OE, CI, e para os controles positivos e negativos. As placas foram vedadas com plástico filme e acondicionadas em BOD à 25°C $\pm$ 2°C por 48 horas. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), foram usados como controles negativos a água ionizada de osmose reversa e o solvente, e como controle positivo o glifosato na concentração de 1mL.L⁻¹.

As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento utilizando duas raízes, foi feita a hidrólise das raízes em HCl 5M a 25°C por 18 minutos, e, após esse período, foram coradas com orceína acética 2% por 8 minutos. Foram preparadas cinco lâminas de cada tratamento, sendo analisadas 1.000 células/lâmina, totalizando 5.000 células, para cada concentração investigada.

O IM foi avaliado dividindo o número de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas em cada tratamento. As AC e AN foram calculadas dividindo o número de alterações pelo número total de células analisadas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias ao teste de Dunnett à 5% de significância (BERNARDES *et al.*, 2015). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo computacional em estatística aplicada à genética "Genes" (CRUZ, 1998).

Resultados

Os CIs foram citotóxicos para as células de *L. sativa*, essa citotoxicidade foi evidenciada por uma redução no IM das células de *L. sativa* em todas as concentrações do CI, exceto na de 187,5 e 3.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 1). A redução mais expressiva do IM foi na concentração de 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI, apresentando uma significativa redução de 46,67%, em relação a água destilada. As concentrações de 750, 1.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI apresentaram reduções de 40,29% e 37,39%, respectivamente, em relação a água destilada. Pode ser observada uma relação de dose-resposta a partir da concentração de 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI, onde, a medida em que a concentração aumenta, menor é a redução no IM. Os tratamentos com o OE puro de *P. gaudichaudianum* não foram citotóxicos para as células de *L. sativa*, apresentando resultados estatisticamente iguais aos controles negativos (Tabela 1).

Tanto os CIs, quanto os OEs puros, não apresentaram efeito genotóxico para as células de *L. sativa*, uma vez que, todos os resultados das ACs e ANs identificadas em todos os tratamentos, com OE e CI, apresentaram semelhança estatística com pelo menos um controle negativo, sendo a maioria dos

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

tratamentos estatisticamente iguais a todos os controles (Tabela 1). Foram identificadas AC do tipo cromossomo perdido, cromossomo aderente, c-metáfase, ponte e atraso, e AN do tipo núcleo condensado (Tabela 2).

Tabela 1 – Alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) avaliadas em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do OE e CI de *P. gaudichaudianum*. As letras minúsculas indicam similaridade estatística entre as médias pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tratamento	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Índice mitótico	AC	AN
ÁGUA	-	6,90 a	0,68 a	0,04 a
SOLVENTE	-	6,46 b	0,58 b	0,04 b
GLIFOSATO	-	0,72 c	0,00 c	0,00 c
OE	187,50	7,70 ab	0,80 ab	0,06 abc
OE	375	9,58	1,18 a	0,00 abc
OE	750	8,26 ab	0,90 ab	0,00 abc
OE	1.500	6,80 ab	0,64 ab	0,04 abc
OE	3.000	6,30 ab	0,72 ab	0,10 abc
CI	187,50	7,42 ab	0,46ab	0,00 abc
CI	375	3,68	0,40 abc	0,00 abc
CI	750	4,12	0,42 abc	0,00 abc
CI	1.500	4,32	0,40 abc	0,00 abc
CI	3.000	5,26 ab	0,54 ab	0,00 abc

Fonte: o autor (2023). Controle negativo 1= água destilada; Controle negativo 2= solvente; Controle positivo= glifosato.

Os resultados das contagens de células nas diferentes fases do ciclo celular mostraram um maior número de células em interfase nas concentrações de 375, 750 e 1.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI, em comparação com os controles negativos. Assim como com os resultados do IM, para a quantidade de células em interfase também é observada uma relação dose-resposta a partir da concentração de 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI, onde há uma diminuição na quantidade de células nessa etapa do ciclo, na medida em que se aumenta a concentração.

Para o OE puro, a quantidade de células em interfase foi estatisticamente igual a ambos os controles negativos, exceto a concentração de 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, essa concentração apresentou um menor número de células em interfase do que todos os controles. O número de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase não diferiram estatisticamente dos controles negativos tanto para o CI, quanto para o OE.

Tabela 2 – Fases do ciclo celular avaliadas em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do OE e CI de *P. gaudichaudianum*. As letras minúsculas indicam similaridade estatística entre as médias pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tratamento	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	INTÉRFASE	PRÓFASE	METÁFASE	ANÁFASE	TELÓFASE
ÁGUA	-	93,06 a	29,18 a	37,63 a	16,88 a	16,31 a
SOLVENTE	-	93,50 b	44,23 b	29,96 b	12,53 b	13,28 b
GLIFOSATO	-	99,28 c	40,55 c	18,78.c	7,78 c	32,89 c
OE	187,50	92,24 ab	29,48 abc	39,40 ab	17,16 abc	13,90 abc
OE	375	90,42	41,88 abc	34,81 ab	13,69 abc	9,69 abc
OE	750	91,74 ab	38,68 abc	37,37 ab	14,99 abc	8,94 abc
OE	1.500	93,16 ab	36,71 abc	33,60 ab	13,63 abc	16,06 abc
OE	3.000	93,60 ab	28,59 abc	36,27 ab	19,92 abc	15,22 abc
CI	187,50	92,58 ab	27,60 abc	35,44 ab	20,85 ab	16,12 abc
CI	375	96,32	40,49 abc	29,36 abc	16,06 abc	14,09 abc
CI	750	95,88	25,62 abc	35,59 ab	17,49 abc	21,30 abc
CI	1.500	95,68	27,32 abc	39,79 ab	14,04 abc	18,85 abc
CI	3.000	94,74 b	34,55 abc	34,97 ab	17,93 ab	12,55 abc

Fonte: o autor (2023). Controle negativo 1= água destilada; Controle negativo 2= solvente; Controle positivo= glifosato.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

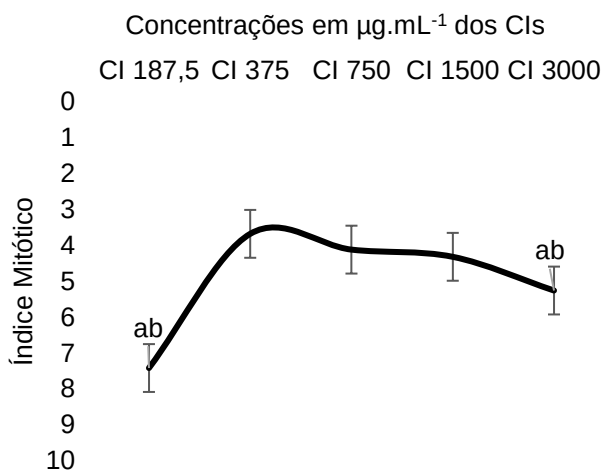
Discussão

As reduções no IM das células de *L. sativa*, provocadas pelos CIs com o OE de *P. gaudichaudianum* nas concentrações de 375, 750, 1.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, são um indicativo de efeito citotóxico, uma vez que o IM é um dos principais parâmetros usados por pesquisadores na identificação da citotoxicidade de compostos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Para a divisão celular ser considerada como normal, é necessário que o IM apresente valores iguais aos controles negativos, já que os compostos usados como controles negativos foram escolhidos justamente por não apresentarem efeito tóxico significativo. Um IM menor que os dos controles negativos sugere uma perturbação na divisão celular, de forma a reduzir esse processo vital para o ciclo de vida (IQBAL *et al.*, 2019). A diminuição no número de células realizando mitose pode estar relacionada com o efeito de determinados compostos químicos no material genético e nas proteínas presentes dentro das células dos indivíduos que entraram em contato com tal composto (ANDRADE *et al.*, 2008; CHANDRA *et al.*, 2005). Como, por exemplo, compostos como o sesquiterpeno β -cariofileno e o monoterpene limoneno, identificados no OE de *P. gaudichaudianum*, esses compostos são conhecidos por afetar negativamente a germinação e o crescimento de plantas, processos esses, relacionados com a divisão normal das células (ARAGÃO *et al.*, 2015; ARANITI *et al.*, 2017; MAFFEI *et al.*, 2011). Também existe a possibilidade de uma ação sinérgica desses compostos, e outros presentes no OE, sobre as células de *L. sativa* (VOKOU *et al.*, 2003).

O motivo pelo qual o CI apresentou citotoxicidade e o OE puro não, pode ter a ver com as melhorias nas propriedades físicas e químicas do OE, como estabilidade térmica, aumento na solubilidade em água, fotoestabilidade, proteção contra oxidação, redução da volatilidade, melhorando o desempenho do OE (GUPTA; VARIYAR, 2016; HONG; PARK, 1999).

Quanto a relação dose-resposta, podemos observar que, a partir da concentração de 375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CI, há uma redução no efeito citotóxico do CI na medida em que se aumenta a concentração. Podemos observar essa relação tanto para os resultados do IM quanto para a contagem de células em interfase. Esses resultados coincidem, uma vez que quanto maior o número de células em interfase menor será a quantidade de células realizando mitose, para uma quantidade determinada de células analisadas. A diminuição da citotoxicidade com o aumento da concentração do CI se relaciona com padrões de relação dose-resposta, onde a resposta se encontra predominantemente nos valores intermediários. Nos casos de proliferação celular essas respostas, chamadas horméticas, aparecem em gráficos principalmente como curvas em forma de U invertido (DAVISON; MANRIQUE; SÁNCHEZ), como ocorre no gráfico da redução do IM das células de *L. sativa*, em função dos diferentes tratamentos com as distintas concentrações do CI contendo o OE de *P. gaudichaudianum* (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Variação no índice mitótico das células de *L. sativa* em função dos diferentes tratamentos com CI.



Fonte: O autor (2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

Os CIs com o OE de *P. gaudichaudianum* apresentaram reduções na proliferação celular de células do meristema apical radicular de *L. sativa*. O encapsulamento do OE em HP β CD promoveu melhorias na atividade citotóxica do OE na concentração de 375, 750 e 1.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses resultados indicam que o encapsulamento em HP β CD pode ser uma alternativa para a formulação de bioherbicidas, a base de OEs, mais estáveis e eficazes, contribuindo, dessa forma, para um desenvolvimento sustentável das práticas agrícolas.

Referências

ANDRADE, L.; CAMPOS, J.; DAVIDE, L. Alterações citogenéticas induzidas por SPL (spent potliners) em células meristemáticas de bioensaios vegetais. **Ecotoxicologia e Segurança Ambiental**, v. 71, p. 706-710, 2008.

ANVISA (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Toxicologia. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Brasília, DF, 2011. Relatório de atividades de 2010.

ARAGÃO, F. B. *et al.* Phytotoxic and cytotoxic effects of eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy J**, v. 35, p. 259-272, 2015.

ARANITI, F.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; ABENAVOLI, M. R. Terpenoid trans-caryophyllene inhibits weed germination and induces plant water status alteration and oxidative damage in adult Arabidopsis. **Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2017.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.; MURTHY, R.; SAXENA, P.; PANDE, P.; GUPTA, S. Biomonitoramento comparativo de lixiviados de resíduos sólidos perigosos de duas indústrias usando o teste *Allium*. **Ciência do ambiente total**, v. 347, p. 46-52, 2005.

DA ROCHA, Cintia Hoffer *et al.* Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2020.

DAVISON, Gema PÉREZ; MANRIQUE, Ricardo RESTREPO; SÁNCHEZ, Gregorio MARTÍNEZ. Hormesis: antecedentes e implicaciones en los sistemas biológicos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 954-60, 2009.

EL ASBAHANI, A. *et al.* Essential oils: From extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

GUPTA, Sumit; VARIYAR, Prasad S. Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials. *In*: **Encapsulations**. Academic Press, 2016. p. 641-672.

HONG, K.; PARK, S. Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: synthesis and characterization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 58, n. 2, p. 128-131, 1999.

HOU, Kehong *et al.* Nanoemulsion of cinnamon essential oil Co-emulsified with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Tween-80: Antibacterial activity, stability and slow release performance. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101232, 2021.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J.; NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioensaios baseados em plantas superiores como excelentes dosímetros para monitoramento de ecotoxicidade: uma revisão. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p. 1-80, jan./mar. 2019.

JIANG, Shu *et al.* Preparation and characterization of tea tree oil/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex and its application to control brown rot in peach fruit. **Food Hydrocolloids**, v. 121, p. 107037, 2021.

KFOURY, Miriana *et al.* Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, p. 129-143, 2019.

KOUL, Opendar; WALIA, Suresh; DHALIWAL, G. S. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. **Biopestic. Int**, v. 4, n. 1, p. 63-84, 2008.

LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *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.

MAFFEI, Massimo E.; GERTSCH, Jürg; APPENDINO, Giovanni. Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural product reports**, v. 28, n. 8, p. 1359-1380, 2011.

MARQUES, Helena Ma Cabral. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 313-326, 2010.

MENDES, Luiza Alves *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 684-689, 2017.

POWLES, Stephen B.; YU, Qin. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 317-347, 2010.

SANCHES, Sérgio Marcos *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

SANTOS, Emerson H. *et al.* Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 583-592, 2015.

VARAN, Gamze *et al.* Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 457-469, 2017.

VASCONCELOS, Loren Cristina *et al.* Phytochemical analysis and effect of the essential oil of *Psidium* L. species on the initial development and mitotic activity of plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26216-26228, 2019.

VOKOU, Despina *et al.* Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **Journal of chemical ecology**, v. 29, p. 2281-2301, 2003.

Agradecimentos

À FAPES, CNPq e CAPES.