

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO FITOTÓXICO DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum* EM *Allium cepa* E *Bidens pilosa*.

Larissa Carolina Lopes de Jesus¹, Isabelly da Silva Izidio¹, Morgana Cabral de Oliveira Santos¹, Loren Cristina Vasconcelos¹, Milene Miranda Praça Fontes¹, Luiza Alves Mendes².

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitario, S/N – Guararema - 29500-000 Alegre - ES, Brasil, larissa.c.jesus@edu.ufes.br, sisabelly010@gmail.com, morganacabrals1001@gmail.com, loren.vasconcelos@ufes.br, milene.fontes@ufes.br.

²Universidade Federal de Viçosa – Programa de Pós-graduação em Agroquímica - Viçosa (MG), Brazil, luizavargasmendes@hotmail.com.

Resumo

Os óleos essenciais (OEs), são compostos por substâncias voláteis com componentes químicos ativos que podem interagir com outras plantas, influenciando seu crescimento e inibindo a germinação de sementes. A técnica de nanoemulsão (NE) intensifica esses efeitos ao reduzir o tamanho das partículas do óleo, facilitando a interação com as membranas celulares das plantas alvo. Este estudo investigou o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), rico em compostos fenólicos, para avaliar seu potencial alelopático em ervas daninhas. A NE, preparada com 1% de óleo essencial e Tween 80, foi aplicada em sementes de *Allium cepa* e *Bidens pilosa* em diferentes concentrações. Os resultados mostraram inibição significativa na germinação e crescimento das plântulas, com destaque para a concentração de 3000 µg mL⁻¹, que inibiu 92,8% da germinação de *A. cepa* e 100% de *B. pilosa*. A análise fitoquímica identificou o eugenol, composto conhecido por sua fitotoxicidade, este foi associado como responsável pelos efeitos observados, ressaltando o potencial do OE de *S. aromaticum* em formulações de NE para controle de plantas de forma sustentável.

Palavras-chave: Alelopatia, bioherbicida; cravo-da-índia.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Biologia Molecular.

Introdução

A aplicação de herbicidas é uma prática comum no setor agrícola, e o uso intensivo desses compostos resulta em um aumento na tolerância de diversas plantas a vários produtos disponíveis no mercado (BURNSIDE, 1992). Além disso, como um efeito colateral, o uso exagerado de substâncias químicas pode prejudicar seriamente a saúde humana e causar danos ao ambiente (ROCHA et al., 2016). Sendo assim, surge uma urgente demanda por novas substâncias para esse propósito, que sejam menos nocivas para o ser humano e para o meio ambiente, além de serem eficientes, seguras e seletivas.

Substâncias naturais capazes de inibir o crescimento de ervas daninhas estão sendo estudadas em diversas pesquisas como uma alternativa de um bioherbicida, sendo inofensivos ao meio ambiente e rapidamente biodegradáveis (LIMA et al., 2018). Os óleos essenciais (OEs) são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas, líquidas, com aromas agradáveis e intensos. Os OEs contêm diversos compostos alelopáticos capazes de interagir bioquimicamente com outras plantas, afetando o crescimento, desenvolvimento e até mesmo inibindo a germinação das sementes de outras espécies vegetais (WEIR et al., 2004). Para potencializar o efeito dos OEs utiliza-se a técnica das nanoemulsões (NE), que consiste em reduzir o tamanho das partículas dos OEs. Essa redução faz com que os grupos hidrofílicos fiquem mais expostos, facilitando a interação com a membrana celular dos organismos (DONSI & FERRARI, 2016).

A família Myrtaceae se destaca por suas espécies ricas em compostos naturais ativos. Entre essas, o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), nativo da Indonésia e cultivado em diversos países, incluindo o Brasil, é objeto de várias pesquisas que destacam sua riqueza em compostos fenólicos. Entre esses compostos estão o eugenol, o acetato de eugenol e o ácido gálico, que são componentes importantes de seus OEs (CORTÉS-ROJAS et al., 2014). Estudos indicam que esses OEs possuem uma série de propriedades benéficas, incluindo atividades fungicida, anticancerígena, antidiabética,

anti-inflamatória, antiviral, antiparasitária e antioxidante (HIWANDIKA et al., 2021). Também, estudos realizados por Li et al. (2023) relata o efeito fitotóxico sobre a *Echinochloa crus-galli* afetando o crescimento e desenvolvimento da erva daninhas.

Sendo assim, diante do rico histórico da ação do OE de *S. aromaticum*, o presente trabalho objetivou analisar esse óleo essencial em nanoemulsão, explorando sua composição química e avaliando seus efeitos fitotóxicos em *Allium cepa* L. (cebola) e *Bidens pilosa* L. (picão), focando na germinação, índice de velocidade de germinação e crescimento radicular das plântulas.

Metodologia

O OE de *S. aromaticum* foi adquirido em um ponto de venda local em Alegre, ES. Para as análises qualitativas dos constituintes do OE, utilizamos 30 μL do óleo misturado com 970 μL de acetonitrila como reagente, visando à identificação dos grupos de compostos secundários, assim a amostra contida foi avaliada por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC-FID) (Shimadzu GC-2010 Plus) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS QP2010 SE, Shimadzu, Japão) de acordo com a metodologia de Mendes et al. (2017). Todos os componentes presentes na amostra com área relativa acima de 2% foram identificados.

A NE foi preparada utilizando 1% (m/v⁻¹) de OE, que corresponde a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, além de 14% (m v⁻¹) de Tween 80 em meio aquoso. Inicialmente o OE e o Tween foram pesados em tubo Falcon e mantidos à 500 rpm em agitador magnético (Thermo Scientific, Cimarec, China) por 5 min. Em seguida, a essa mistura foi adicionado 20 mL de água tipo 1 e posteriormente levado ao homogeneizador ultrassônico de alta potência (IKA T Ultra-Turrax) por 5 min à 7000 rpm, sob banho de gelo. A NE foi preparada pelo método de alta energia, conforme metodologia adaptada de Azevedo et al. (2021).

Para avaliação do potencial alopatóico da NE do OE de *S. aromaticum* sementes de picão foram escolhidas em virtude à sua elevada competitividade como planta daninha nos campos agrícolas, e a cebola, pois é considerada um organismo modelo amplamente utilizado para investigar os impactos de agentes agroquímicos, devido a várias características vantajosas. Seu tecido vegetal é facilmente danificado, são capazes de promover inibição significativa do crescimento e do surgimento de raízes, o que facilita a observação das alterações causadas por esses agentes (FRANCO et al., 2021). Sendo assim, as sementes foram expostas a cinco concentrações (3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) que foram preparadas com a dissolução da NE em água destilada. Como controle negativo foi utilizado água destilada e solvente Tween 80 (4,2%, v/v) e o herbicida glifosato (1 mL/L) como controle positivo. Para os testes de germinação foram utilizadas placas de Petri com 9cm de diâmetro contendo papel filme. Para cada tratamento foram utilizadas 25 sementes de picão e cebola, ambos com cinco repetições. Com auxílio de uma pipeta descartável, foi adicionado 2,5ml de cada tratamento sobre as sementes, logo após as placas de petri contendo as NE foram vedadas com plástico filme e colocadas em câmara de germinação (BOD) por aproximadamente 25 °C, onde permaneceram armazenadas durante o experimento que durou 4 dias para cebola e 7 dias para picão.

Ao final de cada experimento, foram determinados a taxa de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), e com auxílio de um paquímetro digital o comprimento da raiz (CR) e da parte aérea (CA), conforme descrito por Singh et al. (2020). Especificamente para cebola a observação ocorreu a cada 12h até alcançar um total de 96 horas. Já para picão, os intervalos de observação foram definidos em 24 horas, estendendo-se até 168h. Por fim, os dados coletados e tabelados, foram utilizados para a comparação das ações dos tratamentos entre si, pelo teste de Tukey através do software R (R CORE TEAM, 2021).

Resultados

Na análise química do OE de *S. aromaticum* foram identificados três compostos principais, correspondendo a 100% da amostra analisada. O composto majoritário identificado foi o acetato de eugenila, representando 36,912% da amostra. O segundo composto mais abundante foi o β -cariofileno, com uma concentração de 30,357%, seguido pelo eugenol, que constituiu 28,174% do total (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *S. aromaticum*.

n	Composto ^a	tretenção	Arelativa (%) ^c	IRcalculado ^d	IRtabelado ^e
---	-----------------------	-----------	----------------------------	--------------------------	-------------------------

(min.) ^b					
1	eugenol	28,174	95,6	1363	1356
2	β -cariofileno	30,357	2,0	1414	1417
3	acetato de eugenila	36,912	2,4	1552	1524
Total identificado		100,0			

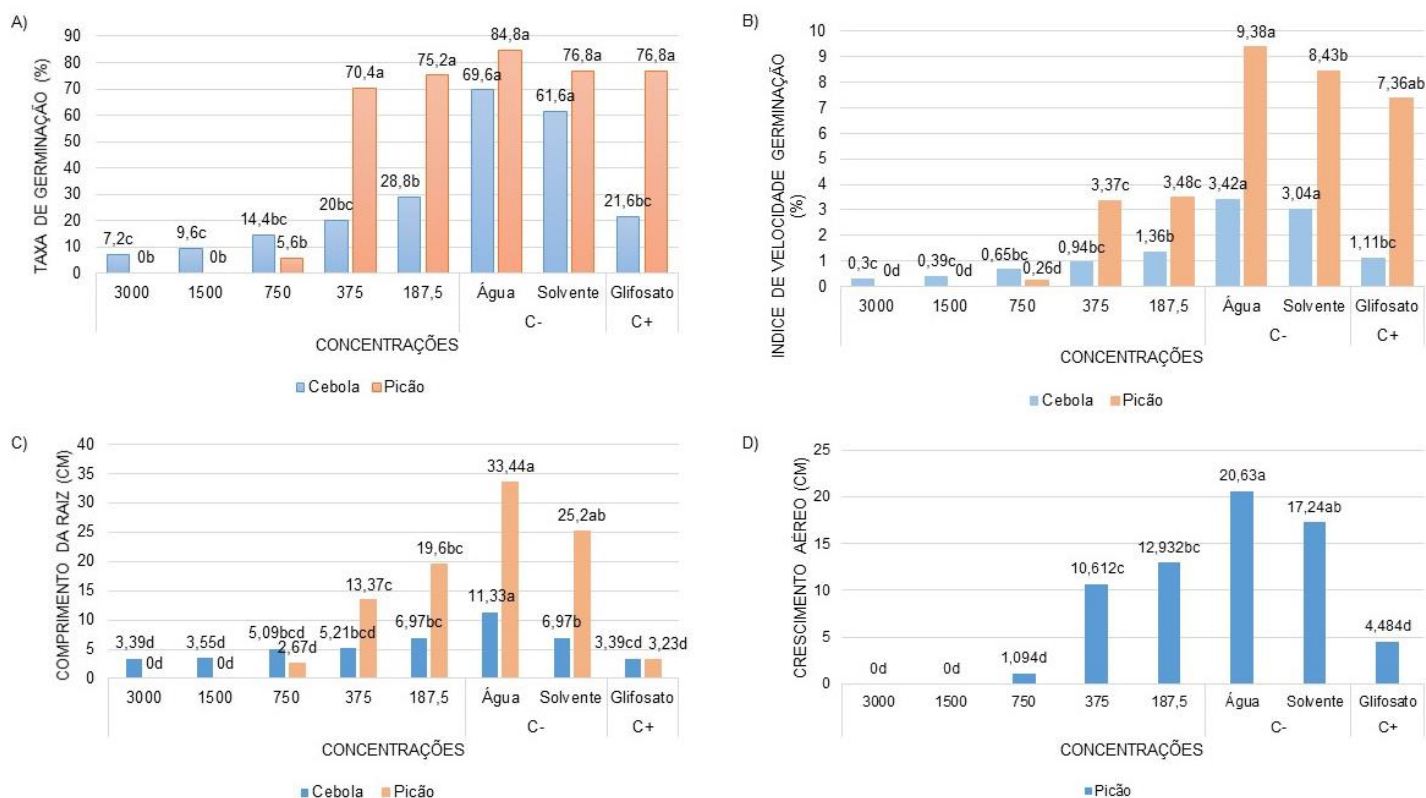
Fonte: Produção do próprio autor

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx®-5MS.

^bTempo de retenção. ^cCompostos com área relativa $\geq 1\%$ foram identificados. ^dÍndice de retenção calculado. ^eÍndice de retenção tabelado.

Como resultado da taxa de germinação utilizando a NE de *S. aromaticum*, a germinação do picão foi de 0% nas concentrações de 3000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nas concentrações de 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores obtidos foram de 5,6%, 70,4% e 75,2%. Em relação à taxa de germinação das sementes de cebola, nas três doses mais elevadas, os valores adquiridos foram de 7,2%, 9,6% e 14,4%. Ademais, nas concentrações de 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a germinação foi de 20% e 28,8%, respectivamente (Figura 1-A).

Figura 1. A) Efeito fitotóxico da nanoemulsão do OE de *S. aromaticum* sobre a germinação (a), índice de velocidade de germinação (b), crescimento radicular (c) e crescimento aéreo de cebola e picão.



Fonte: Produção do próprio autor. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Adicionalmente, ao calcular o índice de velocidade de germinação (IVG), o picão apresentou valores significativos. Nas concentrações de 3000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não houve crescimento, pois, a taxa de germinação foi de 0%. Nas concentrações de 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o IVG foi de 0,26%, 3,37% e

3,48%. Quanto à cebola, nas concentrações de 3000, 1500 e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores de IVG foram de 0,3%, 0,39% e 0,65%, e nas menores concentrações de 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores foram de 0,65% e 0,94% (Figura 1-B).

Também, foi avaliado o crescimento radicular (CR) das diferentes plântulas. Para o picão, nas maiores concentrações de 3000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não houve nenhum desenvolvimento, com a taxa permanecendo em 0%. Nas concentrações de 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores obtidos foram de 2,67%, 13,37% e 19,6%. Quanto ao CR da cebola, nas duas maiores concentrações, as taxas foram de 3,39% e 3,55%, e nas concentrações de 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os resultados foram de 5,09%, 5,21% e 6,97% (Figura 1-C)

Ademais, foi realizada a avaliação do crescimento aéreo (CA) do picão, em que, nas concentrações de 3000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não houve germinação. Nas proporções de 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o CA das plântulas foi de 1,094%, 10,612% e 12,932%. Os controles negativos resultaram em 20,63% para água e 17,24% para o solvente, enquanto o controle positivo, apresentou um valor de 4,484% (Figura 1-D).

Discussão

A análise química do OE de *S. Aromaticum* mostrou que o composto majoritário identificado foi o acetato de eugenila, representando 36,912% da amostra examinada. Estudos realizados por Barros et al. (2018) destacam a presença de compostos químicos similares no OE de *S. aromaticum*, porém em concentrações consideravelmente significativas, o eugenol com 52,53%, acetato de eugenila com 4,05% e β -cariofileno com 37,25%. A variação de componentes e porcentagem pode ocorrer devido a fatores climáticos, sazonais, estágio de desenvolvimento, nutrição, água, genética e método de extração e caracterização (DE MORAIS et al., 2009). Além disso, pesquisas realizadas por Rabêlo et al. (2010) mostrou que o constituinte químico eugenol é o componente majoritário do OE de *S. aromaticum* com potencial de atividade inseticida, antiviral, bactericida e fungicida. De maneira complementar, pesquisa por Ascenção et al. (2013) também identifica compostos análogos ao presente trabalho, enriquecendo o entendimento sobre sua composição.

Com os resultados obtidos da porcentagem de germinação, a NE de *S. aromaticum* comprovou sua ação alelopática ao inibir totalmente a germinação do picão nas concentrações mais altas. Seu efeito no desenvolvimento inicial da cebola resultou em uma redução significativa nas doses mais elevadas, com 92,8%, 90,4% e 85,6% de inibição, demonstrando a ação fitotóxica da NE no desenvolvimento inicial de ambas as plântulas. Adicionalmente, ao calcular o IVG, observamos que, no picão, as taxas de germinação em todas as concentrações testadas diferiram significativamente dos valores observados nos controles, até mesmo nas concentrações mais baixas. Quanto à cebola, as concentrações de 750 e 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se destacaram, apresentando valores semelhantes aos do controle positivo. Estudos realizados por Li et al. (2023) sobre o OE de *S. aromaticum* também revelaram seu efeito fitotóxico no crescimento inicial e desenvolvimento de várias espécies de plantas daninhas.

Os resultados obtidos para o CR de ambas as sementes testadas revelaram efeitos significativos da NE. No caso do picão, observou-se que nenhuma das concentrações testadas apresentou resultados comparáveis ao controle negativo, indicando uma resposta distinta induzida pela NE. Em contrapartida, para a cebola, as duas maiores concentrações apresentaram respostas equivalentes ao controle positivo, o que sugere que a NE, nessas concentrações, possui efeitos similares aos do glifosato. Também, obtivemos resultados significativos para o CR de ambas sementes testadas, o qual os resultados obtidos demonstram ter sido afetados pela NE. Os resultados do picão mostra que em nenhuma concentração foi similar ao controle negativo. E em cebola, as duas maiores concentrações foram iguais ao controle positivo, ou seja, os resultados encontrados foram similares aos do glifosato. Ademais, ao analisar o CA do picão, observou-se que, nas maiores concentrações, não houve germinação, resultando em valores equivalentes ao controle positivo, o que demonstra a eficiência da NE. Além disso, embora a concentração de 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ seja considerada baixa, houve uma restrição de 89,388% no CA, ou seja, o crescimento foi de apenas 10,612%. Comparando esse valor com o controle negativo, verificou-se que o desenvolvimento da parte aérea foi quase o dobro.

Posto isso, estudo realizado por Cortés-Rojas et al. (2014) destaca o eugenol como o principal composto químico volátil encontrado no cravo-da-índia. Esse metabolito secundário possui efeito

alelopático, capaz de inibir a germinação de diversas plantas ou retardar seu crescimento. Sendo assim, os compostos encontrados no OE de *S. aromaticum* podem ter influenciado os resultados sob a capacidade da NE em interromper ou desacelerar o desenvolvimento inicial de plantas invasoras, influenciando na germinação, CR, CA e IVG. Esses achados reforçam a potencialidade da NE em mimetizar a ação de herbicidas convencionais, dependendo da concentração utilizada.

Conclusão

No presente estudo, o composto químico eugenol encontrado no OE pode apresentar potencial para o controle de ervas daninhas. Usando a NE pode facilitar a absorção pelos tecidos vegetais, dado que essas partículas menores tendem a ser mais facilmente absorvidas pelos tecidos. Também, como resultado das análises realizadas, conclui-se que a NE de *S. aromaticum* demonstra potencial para ser utilizada como bioherbicida visto as alterações fitotóxicas significativas sobre a redução da germinação, CR, CA e IVG observadas em *A. cepa* e na planta invasora *B. pilosa*.

Referências

- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisas**, v. 20, n. especial, p. 35-50, 2013.
- AZEVEDO, M. M.; ALMEIDA, C. A.; CHAVES, F. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; GARCIA, A. R.; RODRIGUES, I. A.; ... & ALVIANO, D. S. Croton cajucara essential oil nanoemulsion and its antifungal activities. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 1-12, 2021.
- BARROS GOMES, P. R. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.
- BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 621-625, 1992.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Cravo (*Syzygium Aromatum*): uma especiaria preciosa. **Revista Ásia-Pacífico de Biomedicina Tropical**, v. 2, p. 90-96, 2014.
- DE MORAIS, L. A. S. et al. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050-4063, 2009.
- DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.
- FRANCO, R. R.; FRANCO, R. M.; RODRIGUES, E. C.; DE LUCCA JUNIOR, M. Análise da citogenotoxicidade da água de poço da área agrícola do IFSP–Campus Barretos utilizando o modelo de *Allium cepa*. **Revista Sinergia**, v. 21, n. 1, p. 45-58, 2021.
- HIWANDIKA, N.; SUDRAJAT, S. E.; RAHAYU, I. Atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de cravo (*Syzygium aromaticum*). **Eureka Herba Indonésia**, v. 2, p. 86-94, 2021.
- LI, ZUREN et al. Atividades inibitórias de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* na emergência de *Echinochloa crus-galli*. **Research Square**, 2023.
- LIMA, H. R. P.; OLIVEIRA, S. C. C.; IKEDA, F. S.; MORAES, L. F. D. Alelopatia: potencialidades do seu uso no controle do mato. In: OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. (Org.). **Controle de Plantas**

Daninhas: Métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. Revista Técnico-Científica, v. 1, n. 24, p. 169, 2018.

RABÊLO, W. F. et al. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*).** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

ROCHA, T. A. L. C. G.; OLIVEIRA, F. N. de. Segurança e saúde do trabalho: vulnerabilidade e percepção de riscos relacionados ao uso de agroquímicos em um pólo de fruticultura irrigada do Rio Grande do Norte. **Gestão & Produção**, v. 23, p. 600-611, 2016.

SILVEIRA, L. C. P.; BUENO, V. H. P.; PIERRE, L. S. R.; MENDES, S. M. Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Wolff) (Heteroptera: Anthocoridae). **Bragantia**, v. 62, p. 261-265, 2003.

SINGH, N.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K.; YADAV, S. S. Chemical characterization, phytotoxic, and cytotoxic activities of essential oil of *Mentha longifolia*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13512-13523, 2020.

SOUZA, T. S.; FERREIRA, M. F. S.; MENINI, L.; SOUZA, J. R. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. R.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, 2017.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, ago. 2004.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPES, CAPES, UFES e ao Laboratório LABCITO da universidade.