

# Tópicos especiais em investigação sobre a atividade fitocitogenotóxica de compostos naturais

Milene M. P. Fontes  
Loren C. Vasconcelos  
org.



2025



**Milene Miranda Praça Fontes**  
**Loren Cristina Vasconcelos**  
Organizadoras

**Tópicos especiais em investigação  
sobre a atividade fitocitogenotóxica  
de compostos naturais**



Pantanal Editora

2025

Copyright© Pantanal Editora

**Editor Chefe:** Dr. Alan Mario Zuffo

**Editores Executivos:** Dr. Jorge González Aguilera e Dr. Bruno Rodrigues de Oliveira

**Diagramação:** A editora. **Diagramação e Arte:** A editora. **Imagens de capa e contracapa:** Canva.com. **Revisão:** O(s) autor(es), organizador(es) e a editora.

### Conselho Editorial

#### Grau acadêmico e Nome

Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos  
Profa. MSc. Adriana Flávia Neu  
Profa. Dra. Albys Ferrer Dubois  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior  
Profa. MSc. Aris Verdecia Peña  
Profa. Arisleidis Chapman Verdecia  
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva  
Prof. Dr. Bruno Gomes de Araújo  
Prof. Dr. Caio Cesar Enside de Abreu  
Prof. Dr. Carlos Nick  
Prof. Dr. Claudio Silveira Maia  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos  
Prof. Dr. Cristiano Pereira da Silva  
Profa. Ma. Dayse Rodrigues dos Santos  
Prof. MSc. David Chacon Alvarez  
Prof. Dr. Denis Silva Nogueira  
Profa. Dra. Denise Silva Nogueira  
Profa. Dra. Dennyura Oliveira Galvão  
Prof. Dr. Elias Rocha Gonçalves  
Prof. Me. Ernane Rosa Martins  
Prof. Dr. Fábio Steiner  
Prof. Dr. Fabiano dos Santos Souza  
Prof. Dr. Gabriel Andres Tafur Gomez  
Prof. Dr. Hebert Hernán Soto Gonzáles  
Prof. Dr. Hudson do Vale de Oliveira  
Prof. MSc. Javier Revilla Armesto  
Prof. MSc. João Camilo Sevilla  
Prof. Dr. José Luis Soto Gonzales  
Prof. Dr. Julio Cezar Uzinski  
Prof. MSc. Lucas R. Oliveira  
Prof. Dr. Luciano Façanha Marques  
Profa. Dra. Keyla Christina Almeida Portela  
Prof. Dr. Leandris Argentele-Martínez  
Profa. MSc. Lidiene Jaqueline de Souza Costa Marchesan  
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann  
Prof. MSc. Marcos Pisarski Júnior  
Prof. Dr. Marcos Pereira dos Santos  
Prof. Dr. Mario Rodrigo Esparza Mantilla  
Profa. MSc. Mary Jose Almeida Pereira  
Profa. MSc. Núbia Flávia Oliveira Mendes  
Profa. MSc. Nila Luciana Vilhena Madureira  
Profa. Dra. Patrícia Maurer  
Profa. Dra. Queila Pahim da Silva  
Prof. Dr. Rafael Chapman Auty  
Prof. Dr. Rafael Felipe Ratke  
Prof. Dr. Raphael Reis da Silva  
Prof. Dr. Renato Jaqueto Goes  
Prof. Dr. Ricardo Alves de Araújo (*In Memoriam*)  
Profa. Dra. Sylvana Karla da Silva de Lemos Santos  
Prof. Dr. Tayronne de Almeida Rodrigues  
Prof. Dr. Ugur Azizoglu  
Prof. Dr. Wéverson Lima Fonseca  
Prof. MSc. Wesclen Vilar Nogueira  
Profa. Dra. Yilan Fung Boix  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme

#### Instituição

OAB/PB  
Mun. Faxinal Soturno e Tupanciretã  
UO (Cuba)  
IF SUDESTE MG  
Facultad de Medicina (Cuba)  
ISCM (Cuba)  
UFESSPA  
UEA  
UNEMAT  
UFV  
AJES  
UFGD  
UEMS  
IFPA  
UNICENTRO  
IFMT  
UFMG  
URCA  
ISEPAM-FAETEC  
IFG  
UEMS  
UFF  
(Colômbia)  
UNAM (Peru)  
IFRR  
UCG (México)  
Rede Municipal de Niterói (RJ)  
UNMSM (Peru)  
UFMT  
SED Mato Grosso do Sul  
UEMA  
IFPR  
Tec-NM (México)  
Consultório em Santa Maria  
UFJF  
UEG  
FAQ  
UNAM (Peru)  
SEDUC/PA  
IFB  
IFPA  
UNIPAMPA  
IFB  
UO (Cuba)  
UFMS  
UFPI  
UFG  
UEMA  
IFB  
Sec. Mun. de Educação, Cultura e Tecnologia de Araripe  
Universidade Kayseri, Türkiye  
UFPI  
FURG  
UO (Cuba)  
UFT

Conselho Técnico Científico  
- Esp. Joacir Mário Zuffo Júnior  
- Esp. Maurício Amormino Júnior  
- Lda. Rosalina Eufrausino Lustosa Zuffo

Ficha Catalográfica

**Catalogação na publicação**  
**Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166**

T674

Tópicos especiais em investigação sobre a atividade fitocitogenotóxica de compostos naturais /  
Organização de Milene Miranda Praça Fontes, Loren Cristina Vasconcelos. – Nova Xavantina-MT:  
Pantanal, 2025. 51p. ; il.

Livro em PDF

ISBN 978-65-85756-54-9

DOI <https://doi.org/10.46420/9786585756549>

1. Citogenética. I. Fontes, Milene Miranda Praça (Organizadora). II. Vasconcelos, Loren Cristina  
(Organizadora). III. Título.

CDD 572.873

Índice para catálogo sistemático

I. Citogenética



Nossos e-books são de acesso público e gratuito e seu download e compartilhamento são permitidos, mas solicitamos que sejam dados os devidos créditos à Pantanal Editora e também aos organizadores e autores. Entretanto, não é permitida a utilização dos e-books para fins comerciais, exceto com autorização expressa dos autores com a concordância da Pantanal Editora.

**Pantanal Editora**

Rua Abaete, 83, Sala B, Centro. CEP: 78690-000.  
Nova Xavantina – Mato Grosso – Brasil.  
Telefone (66) 99682-4165 (Whatsapp).  
<https://www.editorapantanal.com.br>  
[contato@editorapantanal.com.br](mailto:contato@editorapantanal.com.br)

## Apresentação

A busca por alternativas sustentáveis e ecologicamente corretas para o manejo de plantas invasoras e a substituição de agrotóxicos tem ganhado cada vez mais relevância na ciência. Neste contexto, os metabólitos secundários de plantas despontam como uma solução promissora, com potencial para atuar como bioherbicidas eficazes e menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana.

Este livro apresenta estudos que exploram diferentes aspectos da utilização de compostos vegetais no controle biológico e na biotecnologia. Inicialmente, são analisadas as propriedades do óleo essencial de *Origanum vulgare* e sua atividade fitotóxica. Em seguida, o óleo essencial de *Psidium myrtoides* é avaliado quanto ao impacto sobre a atividade antimutagênica em células vegetais, trazendo uma reflexão sobre a segurança do uso de compostos naturais.

O livro também explora o potencial fitocitogenotóxico da nanoemulsão do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, um estudo inovador que destaca como a nanotecnologia pode aprimorar a eficiência dos compostos bioativos. Além disso, discute-se a cultura de tecidos como ferramenta para a propagação de espécies do gênero *Peperomia*, um grupo de plantas com grande potencial para a indústria de bioprodutos.

Ao reunir essas pesquisas, esta obra proporciona uma visão ampla e interdisciplinar sobre a aplicação de metabólitos vegetais e biotecnologia no desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis. Esperamos que este trabalho contribua para avanços científicos e inspire novas pesquisas no campo da bioprospecção vegetal e do controle biológico.

Boa leitura!

## Sumário

|                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Apresentação</b>                                                                                                                                    | <b>4</b>  |
| <b>Capítulo I</b>                                                                                                                                      | <b>6</b>  |
| Potencial bioherbicida do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>                                                                                    | 6         |
| <b>Capítulo II</b>                                                                                                                                     | <b>17</b> |
| Avaliação da atividade citoprotetora do óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg                                                             | 17        |
| <b>Capítulo III</b>                                                                                                                                    | <b>27</b> |
| Prospecção fitoquímica, fitotoxicidade e citogenotoxicidade de nanoemulsões do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> em planta modelo e daninha | 27        |
| <b>Capítulo IV</b>                                                                                                                                     | <b>39</b> |
| Propagação <i>in vitro</i> de espécies de <i>Peperomia</i> visando a extração de óleos essenciais                                                      | 39        |
| <b>Índice Remissivo</b>                                                                                                                                | <b>50</b> |
| <b>Sobre as organizadoras</b>                                                                                                                          | <b>51</b> |

# Potencial bioherbicida do óleo essencial de *Origanum vulgare*

 10.46420/9786585756549cap1

Augusto Vinhas Tozani   
Isabelly da Silva Izidio   
Thammyres de Assis Alves   
Thayllon de Assis Alves   
Milene Miranda Praça Fontes 

## INTRODUÇÃO

Após a segunda guerra mundial, devido à grande necessidade populacional por alimentos, os herbicidas foram criados com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola, controlando pragas e outras espécies vegetais que pudessem competir com o cultivo. Com a utilização incorreta e excessiva destes herbicidas, criaram-se duas grandes problemáticas: a contaminação à saúde humana e ao ambiente; e a resistência que as pragas desenvolvem devido à seleção natural, levando à necessidade de introdução e desenvolvimento de novos herbicidas no mercado (Alves, 2017).

A família Lamiaceae, compreende diversas plantas aromáticas que se destacam, dentre elas o *Origanum vulgare* L. (orégano), cujas potenciais aplicações biológicas de seu óleo essencial têm sido reconhecidas (Blank et al., 2016). Os óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários, derivados das plantas, que têm sido utilizados há milhares de anos (Zhou et al., 2021). Esses óleos são compostos por uma mistura variável de terpenóides e hidrocarbonetos de baixo peso molecular, como: álcoois, aldeídos, ácidos, cumarinas, entre outros. Conhecer e identificar a composição química assim como a determinação da cito e fitotoxicidade de extratos vegetais, são etapas importantes para utilização segura nas avaliações da potencialidade biológica dos mesmos (Blank et al., 2016).

Estudos realizados anteriormente, para a caracterização do óleo essencial de *O. vulgare*, descrevem como metabólitos secundários majoritários,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, linalol, 4-terpineol, timol, carvacrol, o-cimeno e  $\alpha$ -terpineol, sendo descritos também por outros autores os compostos: p-cimeno, 1,8 cineol e limoneno. Cada constituinte químico pode variar em proporção, sendo estas frequentemente afetadas por condições ambientais, devido à interface química entre o ambiente circundante e as plantas que ali vivem, podendo assim, resultar em funções citotóxicas e biológicas diferentes (Blank et al., 2016; Borges et al., 2012).

As variações na constituição do óleo essencial de *O. vulgare* têm levado a uma tentativa de classificar a planta em diferentes quimiotipos, de acordo com o seu constituinte principal. Esta variação

é dependente da espécie de orégano utilizada, da altitude em que foi cultivada, da sazonalidade local e de outras características agronômicas (Borges et al., 2012).

Pesquisas e ensaios realizados têm atribuído uma potencial atividade antimicrobiana aos terpenos e seus derivados, muitas vezes devido à capacidade destes compostos de interagirem com diferentes moléculas alvo e funções celulares, como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético. Além disso, relatos na literatura demonstraram que o carvacrol, tem sido um importante constituinte associado à citotoxicidade (Blank, et al., 2016; Dunkic et al., 2013). Outra atividade já descrita previamente para o óleo essencial de *O. vulgare* é a antifúngica, que tem sido descrita frente a diversos fungos, especialmente leveduras do gênero *Candida*, além disso, alguns autores vêm utilizando extratos vegetais, incluindo o óleo de *O. vulgare*, em isolados de *M. pachydermatis* e obtendo resultados positivos (Santin et al., 2014).

Portanto, frente à bioatividade previamente descrita, o conhecimento aprofundado sobre o efeito fitotóxico do óleo essencial de *O. vulgare* pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para controle de pragas agrícolas, de forma mais sustentável, tornando-se relevante avaliar os efeitos desse óleo essencial, em ensaios fitotóxicos a fim de determinar seu potencial de toxicidade e aplicabilidade como herbicida nos cultivos agrícolas, de pequena e larga escala.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Análises fitotóxicas*

O estudo foi conduzido no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. As soluções utilizadas no experimento, continham o óleo comercial de Orégano da marca DoTerra®, adquirido por revendedora autorizada em Cachoeiro de Itapemirim, ES, garantindo que o mesmo estivesse adequadamente armazenado e selado para preservar suas características originais.

O experimento conduziu a metodologia estabelecida por Alves et al. (2021) e seguiu as seguintes etapas para desenvolvimento das análises fitotóxicas: 5 tratamentos, mais 3 grupos controle. Os tratamentos foram compostos por diferentes concentrações do óleo essencial emulsionado, diluídas com água destilada, respectivamente: T1 – 3000 µg mL<sup>-1</sup>, T2 – 1500 µg mL<sup>-1</sup>, T3 – 750 µg mL<sup>-1</sup>, T4 – 375 µg mL<sup>-1</sup> e T5 – 187,5 µg mL<sup>-1</sup>. Os tratamentos de controle foram respectivamente: controles negativos= água; e água + tween 80% e para o controle negativo foi utilizado o herbicida glifosato 0,1%, sendo este o mais comercializado mundialmente, no lugar de pós-emergente. Para a emulsão do óleo essencial, foram adotados os seguintes componentes e concentrações: 0,5g do óleo essencial de orégano, 0,5g de tween e 100mL de água destilada, o que resultou em uma concentração de 10000 µg L<sup>-1</sup> do óleo emulsionado, utilizando-se um aparelho de agitação por meio de ultrassom, para homogeneização.

Como plantas modelos, foram utilizadas sementes comerciais da eudicotiledônea *L. sativa* L. var. Mônica da marca Feltrin (alface) e sementes da monocotiledônea *S. bicolor* L. Moench da marca BRseeds (sorgo), ambas adquiridas em casa rural.

O teste de germinação foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, esterilizadas com álcool 70%, forradas com papel filtro fino e regadas com 2 mL dos respectivos tratamentos. As placas foram acondicionadas em uma câmara de germinação (BOD) à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , onde ficaram armazenadas durante o experimento (Alves et al., 2021).

O experimento seguiu a metodologia de Delineamento Inteiramente Casualizado, com cada tratamento sendo constituído por cinco repetições com 25 sementes, em cada placa, sendo feita a mesma metodologia para ambas as espécies modelo, que garantiu condições similares para a germinação em todos os grupos. A germinação das sementes foi avaliada de 8 em 8 horas até completar 48 horas, para análise do índice de velocidade de germinação (IVG) e a porcentagem de germinação foi feita no tempo 48h (G%). Após 48h o comprimento da raiz de cada semente foi aferido para determinar o crescimento radicular (CR) e após 120h as partes aéreas das plântulas foram medidas para determinar o crescimento aéreo (CA) (Alves et al., 2021). Estas observações forneceram dados essenciais para a análise dos resultados obtidos no experimento.

### *Análises estatísticas*

Foram avaliadas e comparadas as taxas de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR) e aéreo (CA) das amostras obtidas, a fim de observar se há efeitos citotóxicos em comparação aos controles. Os dados obtidos de cada variável foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) com uma matriz de correlação e a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância das interações entre os fatores, para os fatores qualitativos foi aplicado teste de média pelo teste de Dunnett, o qual é indicado para comparar tratamento com controles, adotando-se o nível de significância de 5% (Alves et al., 2021).

Para se obter a porcentagem de inibição, foi utilizado o controle com água, como 100% para a base do cálculo, fazendo a conversão dos valores obtidos em cada uma das variáveis avaliadas e posteriormente foi calculada a diferença entre este valor e os 100% totais do controle negativo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Efeitos fitotóxicos sobre *Lactuca sativa**

O tratamento 1 com a concentração  $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentou uma taxa de inibição pré-emergente de 100%, para os parâmetros avaliados que se enquadram neste estágio (G%). Os demais tratamentos apresentaram as seguintes taxas de inibição: T2= 77,76%; T3= 29,92%; os tratamentos 4 e 5 não promoveram inibição significativa comparados ao controle negativo. Nos dois primeiros

tratamentos foi observada uma diminuição da germinação, superior e que difere de todos os controles propostos; o tratamento 3 igualou-se ao controle positivo (Tabela 1).

No parâmetro índice de velocidade de germinação (IVG) os quatro primeiros tratamentos apresentaram uma diminuição, diferindo estatisticamente dos resultados dos controles negativos e positivo. Enquanto o tratamento 5, teve igualdade estatística com o controle positivo (Tabela 1).

Para o crescimento radicular (CR) os dois primeiros tratamentos apresentaram uma taxa de inibição de 100%, indicando também um potencial de ação inibitória pós-emergente em maiores concentrações. Os subsequentes tratamentos apresentaram as seguintes respostas, com relação à porcentagem de inibição do CR: T3= 93,57%; T4= 66,12%; o tratamento 5 não apresentou inibição significativa. Nas observações estatísticas, os três primeiros tratamentos apresentaram inibição superior aos controles negativos e positivo, o tratamento 4 propiciou inibição estatisticamente igual ao controle positivo e o tratamento 5 igualou-se aos controles negativos (Tabela 1 e Figura 1).

Quanto ao efeito das concentrações do óleo essencial de *O. vulgare* no crescimento aéreo (CA), os tratamentos 1 e 2, também apresentaram 100% de inibição neste parâmetro. A partir dos próximos tratamentos, T3 apresentou aproximadamente 90% e os tratamentos 4 e 5 não apresentaram inibição significativa. Quanto às igualdades estatísticas para o crescimento aéreo, as três maiores concentrações apresentaram ação mais efetiva do que o controle positivo, o tratamento 4 igualou-se aos positivos e negativos e o tratamento 5 apresentou igualdade ao controle negativo (Tabela 1).

**Tabela 1.** A tabela 1 apresenta os dados obtidos através do teste de Dunnett 5% de significância aplicado para as sementes da eudicotiledônea *L. sativa* onde: a = água; b = água + tween 80%; c = glifosato 0,1%, no caso de medidas que seguirem a mesma letra, estas possuem igualdade estatística e na ausência, houve diferença dos controles. Fonte: os autores.

| Tratamento   | Germinação (%) | IVG     | C. Radicular | C. Aéreo |
|--------------|----------------|---------|--------------|----------|
| 1            | 0,00           | 0,00    | 0,00         | 0,00 c   |
| 2            | 22,24          | 0,28    | 0,00         | 0,00 c   |
| 3            | 70,08 c        | 3,95    | 0,73         | 0,51 c   |
| 4            | 93,92 ab       | 7,89    | 3,89 c       | 2,81 bc  |
| 5            | 96,16 ab       | 9,56 c  | 11,26 ab     | 3,11b    |
| Água         | 100,00 a       | 11,65 a | 11,48 a      | 5,27 a   |
| Água + tween | 100,00 b       | 11,70 b | 11,99 b      | 2,71 b   |
| Glifosato    | 60,00 c        | 10,67 c | 3,75 c       | 1,48 c   |



**Figura 1.** Plântulas de *L. sativa* após 48h de exposição, dispostas da maior(esquerda) para a menor concentração (direita): 3000  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 1500  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 750  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 375  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e 187,5  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , o controle apenas com água destilada, água + tween 80% e glifosato 0,1%. Fonte: os autores.

### *Efeitos fitotóxicos sobre Sorghum bicolor*

O tratamento 1 apresentou uma eficácia inibitória de 100% da germinação, para as sementes de *S. bicolor*. Os tratamentos subsequentes apresentaram as seguintes taxas inibitórias, no parâmetro germinação (G%): T2= 68,88%; T3= 23,56%; as taxas de inibição dos tratamentos 4 e 5 não foram significativas (Tabela 2).

Avaliando o índice de velocidade de germinação (IVG) no tratamento 3 a diminuição foi superior à do controle positivo; o tratamento 4 apresentou redução estatisticamente igual ao controle positivo e no tratamento 5 observou-se igualdade com ambos os controles apresentados (Tabela 2).

O primeiro tratamento apresentou também uma taxa inibitória de 100% do CR, o que indica um potencial de ação inibitória também no contexto pós-emergente, nas concentrações mais altas do óleo testadas. Os tratamentos 2, 3, 4 e 5 apresentaram as seguintes taxas de inibição do CR: T2= 99,98%; T3= 87%; T4= 67% e T5= 53%. Nas análises estatísticas, os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram inibição estatisticamente semelhante com o controle positivo (Tabela 2 e Figura 2).

O efeito dos tratamentos no CA das sementes de *S. bicolor*, em sua mais alta concentração avaliada desempenhou uma taxa de 100% de inibição. Enquanto a inibição de T2 foi 98%; T3 50% e T4 24%. O tratamento 5 não apresentou inibição significativa. As avaliações estáticas deste parâmetro, indicaram que os tratamentos 1 e 2 apresentaram igualdade com o controle positivo (Tabela 2).

As ações exercidas pelo óleo essencial de *Origanum vulgare*, nos parâmetros germinativos pré-emergentes (G%), demonstraram um potencial bioativo de inibição maior que o controle positivo para as sementes de *L. sativa* e *S. bicolor*. Estes resultados, podem ser explicados pelos efeitos fitotóxicos e de inibição, associados aos compostos majoritários presentes no óleo:  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, linalol, 4-terpineol, timol, carvacrol, o-cimeno,  $\alpha$ -terpineol, p-cimeno, 1,8 cineol e limoneno (Blank et al., 2016; Alves et al., 2018).

**Tabela 2.** Dados obtidos através do teste de variância aplicado para as sementes da monocotiledônea *S. bicolor* onde: a = água; b = água + tween 80%; c = glifosato 0,1%, no caso de medidas que seguirem a mesma letra, estas possuem igualdade estatística e na ausência, houve diferença dos controles. Fonte: os autores

| Tratamento   | Germinação (%) | IVG     | C. Radicular | C. Aéreo |
|--------------|----------------|---------|--------------|----------|
| 1            | 0,00           | 0,00    | 0,00c        | 0,00c    |
| 2            | 27,68          | 0,07    | 0,01c        | 0,18c    |
| 3            | 68,00          | 4,08    | 1,19c        | 3,86     |
| 4            | 84,64abc       | 6,21bc  | 2,94         | 5,86     |
| 5            | 87,84abc       | 6,83abc | 4,22         | 7,17ab   |
| Água         | 88,96a         | 7,83a   | 8,96a        | 7,67a    |
| Água + tween | 82,88b         | 7,43b   | 5,70b        | 7,48b    |
| Glifosato    | 83,54c         | 6,16c   | 0,93c        | 0,28c    |

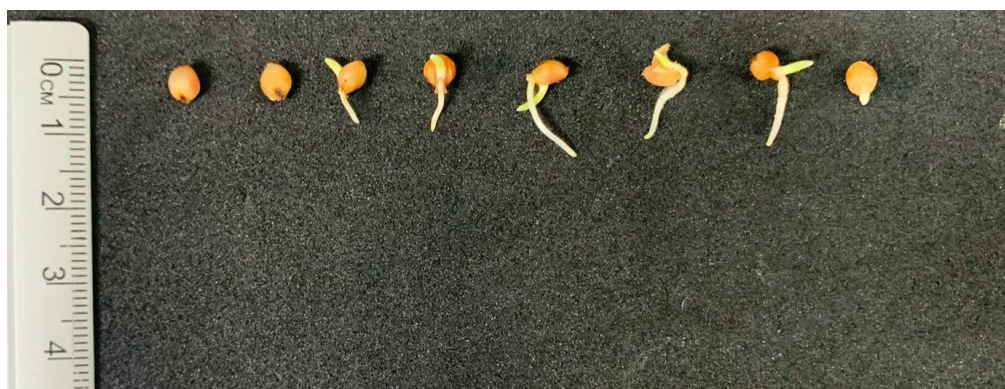


**Figura 2.** Plântulas de *S. bicolor* após 48h de exposição, dispostas da maior(esquerda) para a menor concentração (direita): 3000  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 1500  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 750  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , 375  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e 187,5  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , o controle apenas com água destilada, água + tween 80% e glifosato 0,1%. Fonte: os autores.

Em um estudo publicado, avaliando os efeitos de monoterpenos naturais no crescimento de micélios e germinação de conídios em *Corynespora cassiicola*, os autores puderam observar uma maior efetividade na inibição da germinação, para os compostos timol e carvacrol (Romero et al., 2013).

Ensaio de toxicidade realizados anteriormente, demonstraram uma redução dose-dependente, das taxas de germinação de sementes de *L. sativa* e *S. bicolor*, tratadas com diferentes concentrações de carvacrol, um dos componentes de maior presença no óleo de *O. vulgare*. Este composto possivelmente causou a inibição da enzima adenosina trifosfatase (ATPase), como já observado e descrito por (Gill; Holley, 2006), sendo esta, a enzima responsável por catalisar a quebra das moléculas de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) + fosfato inorgânico, gerando assim uma queda dos

parâmetros relacionados à germinação em *L. sativa* e *S. bicolor*, visto que a produção de ATP nos processos é essencial para o funcionamento de todos os processos anabólicos nos seres vivos. A enzima ATPase é expressa em todos os tecidos de germinação dos embriões de plantas, pois esta é necessária para permitir o afrouxamento da parede celular e também para o alongamento celular, resultando na extrusão de prótons da célula (Alves et al., 2018).

No estudo citado, também foi verificado um crescimento no número total de alterações cromossômicas, nas células expostas aos tratamentos com carvacrol, o que confirma os resultados observados e descritos por Pinheiro et al. (2015), que demonstraram um potencial de aplicação como bioherbicidas para os compostos estudados.

Os autores Alves et al. (2018) também observaram que o composto timol, presente no óleo de *O. vulgare* apresenta fitotoxicidade em diferentes concentrações, refletida pela inibição na germinação e crescimento das sementes de eudicotiledôneas e monocotiledôneas, o que possui coerência com os resultados observados por Zunino e Zygodlo (2004), que descreveu a inibição causada por timol em monocotiledônea, onde esta, foi resultante da produção de espécies reativas de oxigênio, estimulados pelo composto utilizado, levando também à modificações dos lipídios presentes na membrana, gerando um vazamento de eletrólitos.

Segundo o estudo de Anazetti e Melo (2007), a troca indiscriminada de íons e o vazamento de eletrólitos, induzem uma alteração no balanço do pH celular e na concentração destes íons. Este desequilíbrio pode ser um dos responsáveis pela inibição da síntese de ATP e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode causar a ruptura das membranas plasmáticas, resultando em necrose celular (Alves et al., 2018). Os efeitos associados aos compostos majoritários descritos em *O. vulgare* (timol e carvacrol principalmente) nas membranas celulares, pode ser uma das chaves para explicar os mecanismos de ação que caracterizam a bioatividade exercida pelo óleo essencial, nas sementes e plântulas de *L. sativa* e *S. bicolor*. Vapores de compostos monoterpênicos podem causar alterações anatômicas e fisiológicas em plântulas, como observado em estudo proposto por Poser et al. (1996).

As moléculas pertencentes ao grupo dos monoterpenos como o timol, podem apresentar uma atividade alelopática, o que afetaria diretamente os processos de germinação e desenvolvimento da planta. Além destas substâncias serem capazes de afetar os processos fisiológicos, como a síntese de clorofila, fotossíntese, acumulação de lipídios no citoplasma e também a redução no número de organelas, causadas pela ruptura das membranas (Pinheiro et al., 2015).

Estudos utilizando extratos aquosos de diferentes espécies (*Casearia sylvestris* e *Eucalyptus spp.*) que possuem a presença de monoterpenos em sua composição, afirmam que estas, podem ser consideradas alelopáticas devido à inibição da germinação e diminuição do IVG observada para diversas espécies de vegetais (Yamagushi et al., 2011).

A diminuição das taxas de IVG observadas no presente estudo, pode possivelmente ser explicada por este efeito alelopático. Visto que este efeito, em plantas, geralmente se expressa com um retardamento no desenvolvimento das mesmas, e não apenas a quantidade de sementes germinadas (Pinheiro et al., 2015).

A inibição do crescimento radicular de ervas-daninhas é um importante aspecto ecológico, visto que isto pode reduzir a competição da planta a ser cultivada, possibilitando assim o estabelecimento de características de dominância para as espécies vizinhas (Barcelos et al., 2023).

A atividade observada para os CR e CA e também para os parâmetros germinativos (G%, IVG) causada pelo aumento nas concentrações do óleo de *O. vulgare* pode estar relacionada com os efeitos alelopáticos descritos em literatura, associados aos seus componentes majoritários e a sua interferência nos processos de divisão celular, permeabilidade de membrana, ativação e inibição enzimática (Pinheiro et al., 2015).

Apesar dos efeitos de inibição dos crescimentos (CR e CA) terem sido observados para ambas as espécies, fica claro que sua ação se deu mais efetiva nas plântulas da eudicotiledônea *L. sativa* em comparação com as da monocotiledônea *S. bicolor*, respectivamente apresentando taxas de inibição superiores ou equivalentes ao controle positivo nos tratamentos de maior concentração.

Estes resultados entram em concordância com os obtidos para os trabalhos de Amri et al. (2013) e Alves et al. (2018), que descrevem uma maior sensibilidade geral aos monoterpenos, para as eudicotiledôneas e uma resistência para as monocotiledôneas.

Estudos avaliando a ação isolada do composto timol, na germinação e crescimento de diferentes espécies de ervas-daninha, também foram desenvolvidos e os resultados observados foram tão intensos quanto à supressão resultante a partir do herbicida sintético 2,4-D (Kordali et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o óleo essencial de *O. vulgare* possui um significativo potencial inibitório sobre a germinação e o crescimento radicular e aéreo de *L. sativa* e *S. bicolor*. Os tratamentos com as maiores concentrações do óleo essencial apresentaram os maiores índices de inibição em ambos os parâmetros analisados, indicando uma ação fitotóxica significativa.

A presença de compostos majoritários como timol e carvacrol no óleo essencial de *O. vulgare* parece estar diretamente relacionada com seus efeitos inibitórios. Estudos anteriores apontam que essas substâncias podem atuar interferindo na permeabilidade da membrana celular, na síntese de ATP e na ativação ou inibição de enzimas essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Além disso, efeitos alelopáticos associados a monoterpenos presentes no óleo podem explicar a redução da germinação e do índice de velocidade de germinação observada nos testes.

No que se refere às espécies analisadas, observou-se que *L. sativa* foi mais sensível aos efeitos do óleo essencial, apresentando taxas de inibição superiores ou equivalentes ao controle positivo nos tratamentos de maior concentração. Por outro lado, *S. bicolor*, embora também tenha demonstrado inibição significativa nos tratamentos iniciais, apresentou menor sensibilidade em comparação com a eudicotiledônea *L. sativa*, corroborando estudos prévios que indicam uma maior resistência de monocotiledôneas aos efeitos fitotóxicos de monoterpenos.

Os resultados obtidos reforçam a possibilidade de aplicação do óleo essencial de *O. vulgare* como um potencial bioherbicida natural, uma vez que sua ação inibitória se mostrou comparável a herbicidas sintéticos. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade da aplicação prática, considerando fatores como seletividade, persistência no ambiente e possíveis impactos ecológicos. A continuidade dessas investigações pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis de manejo de plantas daninhas, reduzindo a dependência de herbicidas sintéticos e seus impactos ambientais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). (Finance Code 001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, T. A. (2017). Prospecção da toxicidade de fenóis naturais e de seus respectivos derivados ácidos fenoxiacéticos em bioensaios vegetais [Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo].
- Alves, T. A., Pinheiro, P. F., Praça-Fontes, M. M., Andrade-Vieira, L. F., Corrêa, K. B., Alves, T. A., Da Cruz, F. A., Lacerda Júnior, V., Ferreira, A., & Soares, T. C. B. (2018). Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial Crops and Products*, 114, 59–67.
- Alves, T. de A., et al. (2021). Phytotoxic and cyto-genotoxic activity of essential oil from leaf residues of *Eucalyptus urophylla* and the hybrid *E. urophylla* x *E. camaldulensis* on *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Research, Society and Development*, 10(11), e242101119646. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19646>
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., & Jamoussi, B. (2013). Revisões sobre efeitos fitotóxicos de óleos essenciais e seus componentes individuais: Nova abordagem para o manejo de plantas daninhas. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4, 96–114.

- Anazetti, M. C., & Melo, P. S. (2007). Morte celular por apoptose: Uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, 1(1), 37–58.
- Barcelos, F. F., Alves, T. A., Gazolla, P. A., Teixeira, R. R., Queiroz, V. T. de, Praça-Fontes, M. M., Morais, P., Fonseca, V. R., Romão, W., Lacerda Júnior, V., Scherer, R., & Costa, A. V. (2023). Synthesis of novel glycerol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their phytotoxic and cytogenotoxic activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 95, 1–15.
- Blank, D. E., et al. (2016). Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. *Science and Animal Health*, 4(2), 117–130. <https://doi.org/10.15210/sah.v4i2.6569>
- Borges, A. M., et al. (2012). Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(4), 656–665. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400013>
- Dunkic, V., et al. (2013). Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. *Chemistry & Biodiversity*, 10, 1894–1902. <https://doi.org/10.1002/CBDV.201300061>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane-bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.046>
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788–8795.
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., Oliveira, C. M. R., & Praça-Fontes, M. M. (2015). Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 8981–8990.
- Poser, G. L., et al. (1996). Aromatic plants from Brazil: 4. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1829–1832.
- Romero, A. L., et al. (2013). Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 18(1), 3–7. <https://doi.org/10.12661/pap.2013.002>
- Santin, R., et al. (2014). Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(2), 367–373. DOI: 10.1590/1678-41626476
- Yamagushi, M. Q., et al. (2011). Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(4), 1361–1374.

- Zhou, S., et al. (2021). Allelopathic, phytotoxic, and insecticidal effects of *Thymus proximus* Serg. essential oil and its major constituents. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Zunino, M. P., & Zygodlo, J. A. (2004). Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, 219(2), 303-309. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1216-7>

## Capítulo II

# Avaliação da atividade citoprotetora do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg

 10.46420/9786585756549cap2

Morgana Cabral de Oliveira Santos 

Loren Cristina Vasconcelos 

Luiza Alves Mendes 

Milene Miranda Praça Fontes 

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 60% a 80% da população mundial necessitam especialmente de plantas medicinais para cuidar de sua saúde, devido à escassez de condições financeiras ou falta de acesso à medicina tradicional. Com toda essa demanda, há um aumento significativo de estudos toxicogenéticos em plantas para avaliar suas qualidades e potenciais fitoterápicos, a fim de inferir sobre prevenção, tratamento e cura de doenças (Soares et al.; 2013; Bagatini et al., 2007; Corrêa et al., 2018; Silva et al., 2014).

Com a criação da PNPMF (Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos) pelo Decreto da Presidência da República nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, o uso seguro das plantas medicinais foi incentivado e, como consequência, iniciou-se a discussão sobre a importância, dificuldade, facilidade e efetuação de seu uso. Já com a efetivação e reconhecimento do uso dos fitoterápicos no SUS (Sistema Único de Saúde) houve o aumento do acesso da população à medicação e, consequentemente, o aumento das possibilidades de tratamento, o resgate da prática milenar e o incentivo da combinação do conhecimento popular com a ciência (Brasil, 2006; Brasil, 2010).

As plantas são grandes reservatórios de compostos com diferentes funções e aplicações, tais como fungicidas, bactericidas, inseticidas e funções medicinais. As plantas medicinais possuem um espaço consideravelmente importante na medicina (Akinbo; Bakare, 2007). Estudos recentes mostram que muitas substâncias encontradas nas plantas são agentes antioxidantes, hipoglicêmicos e anticancerígenos que podem combater a atividade mutagênica no organismo (Abdel-Hameed et al., 2014; Gonçalves et al., 2017).

A atividade de mutagênicos no organismo pode ativar proto-oncogenes ou genes supressores de tumor, os quais causam alterações celulares que levam ao câncer (Nantes et al., 2014). Sendo assim, há uma grande necessidade de identificação de substâncias classificadas como agentes antimutagênicos, através de estudos com plantas medicinais, capazes de amparar e proteger os organismos dos danos

causados pela exposição de agentes mutagênicos. Dentre as diversas espécies vegetais em potencial para estudo, as do gênero *Psidium* são usadas por apresentarem propriedades farmacológicas, como antiinflamatórios, antimicrobianos, analgésicos e antialérgicos. O gênero *Psidium* apresenta aproximadamente 100 espécies (Govaerts et al., 2016) e sua distribuição é neotropical, ocorrendo do sul do México até a Argentina, incluindo as Ilhas do Caribe e dois arquipélagos no Pacífico (Frazon et al., 2009). O Brasil é o centro de diversidade mais importante do gênero, apresentando aproximadamente 60 espécies de *Psidium* (Sobral et al., 2016), com espécies distribuídas desde o Amazonas até Rio Grande do Sul (Landrum, 2003).

Dentre as espécies que se destacam no gênero está a goiabeira *Psidium guajava* L. e os araçás *Psidium cattleianum* Sabine, *Psidium guineense* Swartz, *Psidium myrtoides* O. Berg e *Psidium acutangulum* DC. Desde 1986, a *P. guajava* está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que confirma a potencialidade da espécie como planta medicinal devido a sua comprovação fitoterápica (Muniz et al., 2013). Dessa forma, considerando a importância dessas espécies, constata-se a necessidade de se buscar maior desenvolvimento de pesquisas científicas com a goiabeira e os araçás.

O efeito medicinal das espécies de *Psidium* se deve aos compostos biologicamente ativos presentes na planta. A folha possui flavonoides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenoides, ácidos triterpenoides e taninos. Destaque especial é dado ao óleo essencial presente na folha, por despertar interesse na busca de explicações científicas que justifiquem os efeitos medicinais e alelopáticos que ele possui (Teixeira et al., 2003; Bardweel et al., 2015).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes por moléculas de natureza terpênica. Além disso, constituem um tipo de metabólito secundário de plantas e possuem grande importância econômica, com inúmeras aplicações principalmente nos setores alimentícios, farmacêuticos e de perfumaria (Salgado, 2001).

A variabilidade quimiotípica dos óleos essenciais de *Psidium* vem sendo demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa, sendo alta a quantidade de sesquiterpenos, que é uma característica comum aos genótipos estudados. É importante conhecer as variações na composição química dos mesmos, com o objetivo de direcionar seu uso. Segundo Moraes (2009), a composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar a idade e estágio de desenvolvimento das plantas, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita.

Para monitorar a bioatividade de extratos e compostos isolados de plantas e a identificação de substâncias tóxicas, bioensaios utilizando espécies vegetais como organismos alvos são aplicados (Noldin

et al., 2003). Dentre os organismos teste vegetal, a alface (*Lactuca sativa* L.), uma eudicotiledônea, é recomendada para testes de toxicologia ambiental (Silveira et al., 2017) e apresentam-se como uma ótima opção, visto que esta espécie evidencia taxas de germinação rápidas e custo benefício que condiz com a realidade. Ademais, tem demonstrado ser confiável para os testes antimutagênicos (Silveira et al., 2017). Sendo assim, este trabalho tem por objetivo a verificação do efeito antimutagênico do óleo essencial de *P. myrtoides* em bioensaios com *L. sativa*. Dessa forma, os resultados encontrados podem contribuir para ampliação dos dados acerca do uso do óleo essencial de *P. myrtoides*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Vegetal*

Folhas de *P. myrtoides* foram coletadas na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) no dia 17/10/2022, no município de Alegre. As folhas foram secas em estufa de circulação de ar a 60°C por 12 horas. Logo depois, foram trituradas, armazenadas em sacos de papel e congeladas em freezer até a extração. Os testes antimutagênicos foram realizados com sementes de *L. sativa* obtidas no comércio local da cidade de Alegre – ES, Brasil. A alface possui dois conjuntos cromossômicos ( $2n=2x=18$ ) (Matoba, Souza & Silva, 2007).

### *Extração do óleo essencial e análise da composição química*

O óleo essencial de *P. myrtoides* foi extraído por hidrodestilação, em aparelho Clevenger, durante quatro horas de acordo com a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira para óleos voláteis (BRASIL, 2010). Foram realizadas ao todo 3 extrações. Nas extrações foi utilizada cerca de 150g de folhas em aproximadamente 1000 mL de água de osmose reversa, em balão de fundo redondo de 2000 mL. Após a extração o óleo foi removido com micropipeta e armazenado em freezer a -20 °C. O rendimento do óleo essencial foi obtido pela razão entre a massa de óleo extraído e a massa seca das folhas (% m/m), dado pela fórmula:  $\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo}}{\text{massa da planta seca}} \times 100$ .

As amostras dos OE extraídos das folhas foram analisadas 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) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE).

### *Avaliação do potencial antimutagênico*

Para avaliar o potencial antimutagêncio a concentração de 187,5 mg/mL do óleo essencial foi utilizada, visto que trabalhos anteriores mostraram que ela não apresentou efeitos fitotóxicos sobre a germinação e o crescimento radicular e aéreo de *L. sativa* (Vasconcelos et al., 2019). A emulsão do óleo essencial foi preparada em cuba de ultrassom utilizando tween 80 como solvente. Água destilada e o solvente tween 80 foram utilizados como controles negativos. Metanossulfonato de metila (MMS –

Sigma Aldrich)  $4 \times 10^{-4}$  foi utilizado como agente mutagênico indutor de dano ao DNA (Nantes et al., 2014), sendo considerado o controle positivo.

Vinte e cinco sementes de *L. sativa* foram colocadas em placas de Petri umedecidas com água destilada para estimular a emissão de raízes e mantida em BOD a 24 °C. Após 24 h, as sementes exibindo raízes de 1–2 mm foram transferidas para novas placas de Petri e submetidas a uns dos experimentos a seguir: (E1) tratamento com óleo essencial de *P. myrtooides* por 48h; (E2) pré-tratamento com óleo essencial de *P. myrtooides* por 24 horas e tratamento subsequente com MMS por 24 h; (E3) tratamento simultâneo com óleo essencial preparadas a partir de *P. myrtooides* com adição de MMS (1: 1); (E4) pré-tratamento com MMS por 24 horas e pós-tratamento com óleo essencial de *P. myrtooides* cultivadas por mais 24 h. Após a exposição as raízes foram coletadas e fixadas em solução (etanol: ácido acético 3: 1) e armazenados a -20° C até o uso.

Para o preparo das lâminas, as raízes fixadas foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 5N a temperatura ambiente por 18 minutos. Os meristemas das raízes foram seccionados, corados com orceína acética a 2%, coberta por lamínula e esmagadas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz. Cinco lâminas de cada tratamento foram preparadas, sendo analisadas 1000 células/lâmina totalizando 5000 células, para cada tratamento. O índice mitótico (IM) foi obtido através da razão entre o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas em cada tratamento. As frequências de alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) foi calculada dividindo o número de alterações pelo número total de células analisadas. Foram contabilizadas as alterações cromossômicas dos tipos: cromossomo perdido, cromossomo aderente, poliploidia, C-metáfase, ponte cromossômica e atraso. As frequências de micronúcleos (MNC), brotos celulares e núcleos condensados observados foram categorizadas como as alterações nucleares (Aragão et al., 2015).

### **Análise estatística**

Os dados antimutagênicos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância de  $p < 0,05$ . A análise foi realizada no software aberto “Genes” (Cruz, 2016).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O rendimento do óleo essencial de *P. myrtooides* foi de 0,1401 % m/m. O óleo essencial de *P. myrtooides* apresentou sete compostos químicos em sua constituição com área acima de 5%, dentre eles é possível observar a presença majoritária de sesquiterpeno oxigenado (SO) e sesquiterpeno hidrogenado (SH), em minoria o monoterpene hidrocarboneto (MH) e a ausência de monoterpene oxigenado (MO). Além disso, também foi observado a presença majoritária de dois compostos principais, sendo eles o

hidrocarboneto sesquiterpeno beta-cariofileno presente na composição com 29% e o alfa-humuleno contando com 21% em sua composição (Tabela 1). A presença em maiores quantidades de beta-cariofileno, que é um hidrocarboneto sesquiterpeno (SH), na amostra indica um quimiotipo padrão em espécies do gênero *Psidium* (Vasconcelos et al., 2019).

**Tabela 1.** Identificação dos compostos presentes no óleo essencial da espécie *Psidium myrtoides*. Fonte: os autores.

| n                         | Composto <sup>a</sup>  | t <sub>retenção</sub><br>(min.) <sup>b</sup> | A <sub>relativa</sub><br>(%) <sup>c</sup> | IR <sub>calculado</sub> | IR <sub>tabelado</sub> | Classificação<br>terpênica <sup>d</sup> |
|---------------------------|------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| 1                         | $\alpha$ -pinene       | 9,231                                        | 13,3                                      | 929                     | 932                    | MH                                      |
| 2                         | $\alpha$ -copaene      | 29,535                                       | 5,9                                       | 1371                    | 1374                   | SH                                      |
| 3                         | $\beta$ -caryophyllene | 31,386                                       | 29,0                                      | 1415                    | 1417                   | SH                                      |
| 4                         | $\alpha$ -humulene     | 32,794                                       | 21,0                                      | 1449                    | 1452                   | SH                                      |
| 5                         | caryophyllene oxide    | 37,939                                       | 10,3                                      | 1579                    | 1582                   | SO                                      |
| 6                         | humulene epoxide       | 38,943                                       | 5,2                                       | 1605                    | 1602                   | SO                                      |
| 7                         | $\alpha$ -bisabolol    | 41,777                                       | 10,3                                      | 1681                    | 1685                   | SO                                      |
| <b>Total identificado</b> |                        |                                              | <b>95,0</b>                               |                         |                        |                                         |

<sup>a</sup>Compostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx®-5MS. <sup>b</sup>Tempo de retenção. <sup>c</sup>Compostos com área relativa > 5% foram identificados. <sup>d</sup>Classificação terpênica: monoterpeneo hidrogenado (MH), monoterpeneo oxigenado (MO), sesquiterpeneo hidrogenado (SH) e sesquiterpeneo oxigenado (SO).

Os resultados do ensaio de antimutagenese estão apresentados na Tabela 2. Considerando o IM, AN e MCN todos os tratamentos foram estatisticamente iguais a todos os controles. Para a variável AC, o tratamento E3 causou um aumento em relação ao MMS, indicando que o óleo essencial ao invés de proteger o DNA, quando aplicado juntamente com o MMS potencializa seu efeito danoso (Tabela 2). Sabe-se que o MMS causa danos generalizados ao DNA, como quebras de fita dupla, como consequência de sua ação alquilante (Yao et al., 2016).

Embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os tratamentos e os controles para a variável IM e MNC, observa-se que o tratamento E2 levou a menor média de IM, além de ser o único tratamento que causou micronúcleos, mostrando que o óleo essencial não reduz o efeito do MMS quando aplicado previamente a ele (Tabela 2). A redução do IM e a presença de micronúcleo são indicativos de morte celular. Os micronúcleos são considerados os marcadores citológicos mais eficientes para detecção de mutagenicidade (Palmieri, Carbone & Di Virgilio, 2016), pois estão relacionados a cromossomos perdidos ou fragmentos de cromossomos que não se incorporam ao núcleo principal até o final do ciclo celular (Andrade-Vieira et al., 2017). Isso ocorre quando os mecanismos de reparo da célula não são

capazes de reparar o dano sofrido, levando à eliminação do material genético da célula por meio da formação de micronúcleos. O crescimento e o desenvolvimento das raízes estão associados a proliferação celular, logo, se uma substância é mitodepressora, reduzindo a frequência de divisão das células, é considerada fitotóxica, pois afeta o desenvolvimento das raízes (Harashima & Sch-Nittger, 2010).

Quanto as fases da mitose, o tratamento E2 aumentou a quantidade de células em prófase e diminuiu a quantidade de telófases diferindo do controle negativo solvente. O tratamento E4 também levou a redução do número de telófases em relação ao solvente, ou seja, o óleo essencial potencializou o efeito do MMS quando aplicado posteriormente (Tabela 3). Em relação as alterações cromossômicas individuais foram observadas ponte cromossômica, cromossomos perdidos, cromossomos aderentes e c-metáfases, no entanto não houve diferenças entre os tratamentos e os controles utilizados (Tabela 4). Esses resultados demonstram a toxicidade do óleo essencial de *P. myrtooides* sobre o ciclo celular de *L. sativa* e sua incapacidade de proteger ou reverter danos ao DNA causados por um agente mutagênico.

As pontes cromossômicas são uma consequência de quebras no DNA, especificamente da perda da região telomérica dos cromossomos. Essas regiões terminais dos cromossomos contêm sequências teloméricas cuja função é promover proteção e estabilidade ao cromossomo, evitando fusões (Leme; Marin-Morales, 2009). Assim, essas quebras ocasionam instabilidade e facilitam a fusão das extremidades dos mesmos, dando origem aos cromossomos dicêntricos.

O cromossomo aderente é descrito por El-Ghamery, El-Kholy & El-Metwally (2003) como uma metáfase com alto nível de compactação do DNA, devido à ação de compostos tóxicos na estrutura físico-química do DNA ou de proteínas a ele ligadas e é considerada uma alteração altamente tóxica que pode levar à ativação da morte celular (Palmieri et al., 2014).

**Tabela 2.** Efeito antimutagênico do óleo essencial de *Psidium myrtooides* sobre o ciclo celular de *Lactuca sativa*. Fonte: os autores.

| Tratamentos | IM      | AC     | AN    | MCN   |
|-------------|---------|--------|-------|-------|
| Água        | 9.52b   | 0.92ab | 0.62a | 0a    |
| Solvente    | 12ab    | 1.1ab  | 0.16a | 0a    |
| MMS         | 10.26ab | 0.64b  | 0.32a | 0a    |
| E1          | 11.36ab | 0.94ab | 2.3a  | 0a    |
| E2          | 8.88b   | 0.58b  | 1.38a | 0.04a |
| E3          | 13.68a  | 1.30a  | 0.14a | 0a    |
| E4          | 11.48ab | 1.06ab | 0.9a  | 0a    |
| E4          | 11.48ab | 1.06ab | 0.9a  | 0a    |

As médias seguidas pela mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância). IM= índice mitótico, AC= alterações cromossômicas por total de células, NA= alterações nucleares por total de células, MCN= micronúcleo. E1: tratamento com óleo essencial por 48h na concentração; E2: pré-tratamento com óleo essencial por 24 horas e tratamento subsequente com MMS por 24 h; E3: tratamento simultâneo com óleo essencial com adição de MMS (1: 1); E4: pré-tratamento com MMS por 24 horas e pós-tratamento com óleo essencial cultivadas por mais 24 h.

**Tabela 3.** Efeito antimutagênico do óleo essencial de *Psidium myrtoides* sobre as fases do ciclo celular de *Lactuca sativa*. Fonte: os autores.

| Tratamentos | INTER  | PROF      | META    | ANA      | TELO     |
|-------------|--------|-----------|---------|----------|----------|
| Água        | 89.86a | 53.406bc  | 22.056a | 11.902ab | 12.636ab |
| Solvente    | 87.84a | 48.956c   | 23.438a | 13.882ab | 13.724a  |
| MMS         | 89.42a | 55.918abc | 21.842a | 9.744ab  | 12.496ab |
| E1          | 86.34a | 53.824abc | 21.206a | 15.486ab | 9.484ab  |
| E2          | 89.78a | 67.87a    | 17.646a | 9.14b    | 5.342b   |
| E3          | 86.18a | 50.436bc  | 25.06a  | 18.068a  | 6.434ab  |
| E4          | 88.28a | 64.474ab  | 16.868a | 12.884ab | 5.772b   |

As médias seguidas pela mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância). INTER= interfase, PROF= prófase, META= metáfase, ANA= anafase, TELO= telofase. E1: tratamento com óleo essencial por 48h na concentração; E2: pré-tratamento com óleo essencial por 24 horas e tratamento subsequente com MMS por 24 h; E3: tratamento simultâneo com óleo essencial com adição de MMS (1: 1); E4: pré-tratamento com MMS por 24 horas e pós-tratamento com óleo essencial cultivadas por mais 24 h.

**Tabela 4.** Efeito antimutagênico do óleo essencial de *Psidium myrtoides* sobre as alterações cromossômicas do ciclo celular de *Lactuca sativa*. Fonte: os autores.

| Tratamentos | CMET   | PONTE  | PERDIDO | ADERENTE |
|-------------|--------|--------|---------|----------|
| Água        | 2.814a | 3.414a | 0.584a  | 2.96a    |
| Solvente    | 2.52a  | 3.03a  | 0.89a   | 2.62a    |
| MMS         | 1.316a | 2.774a | 0.204a  | 1.706a   |
| E1          | 3.094a | 1.896a | 0.336a  | 3.068a   |
| E2          | 2.72a  | 3.48a  | 0a      | 0.446a   |
| E3          | 3.306a | 3.536a | 0a      | 2.65a    |
| E4          | 3.712a | 3.652a | 0.71a   | 1.492a   |

As médias seguidas pela mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância). CMET= c-metáfase, PONTE= ponte, PERDIDO= cromossomo perdido, ADERENTE= cromossomo aderente. E1: tratamento com óleo essencial por 48h na concentração; E2: pré-tratamento com óleo essencial por 24 horas e tratamento subsequente com MMS por 24 h; E3: tratamento simultâneo com óleo essencial com adição de MMS (1: 1); E4: pré-tratamento com MMS por 24 horas e pós-tratamento com óleo essencial cultivadas por mais 24 h.

No presente trabalho o MMS apresentou efeitos semelhantes aos controles negativos para grande parte das variáveis. Diante disso, novos experimentos precisam ser realizados testando concentrações maiores desse mutagênico.

O óleo essencial de *P. myrtoides* mostrou-se citogenotóxico para *Lactuca sativa* mesmo em baixa concentração. Esses resultados podem estar relacionados à presença do composto majoritário beta cariofileno, composto relatado por afetar negativamente a germinação, crescimento e ciclo celular de *Lactuca sativa* (Vasconcelos et al., 2019). Embora o estudo de Vasconcelos et al. (2019) não tenha relatado atividade citogenotóxica para a concentração 187.5 ppm do óleo essencial de *P. myrtoides*, fatores como o estágio de desenvolvimento da planta, temperatura, pluviosidade, técnicas de colheita e pós-colheita podem ter causado diferenças na composição química do óleo essencial utilizado no presente estudo, influenciando em sua atividade biológica.

## CONCLUSÃO

Foi demonstrado que o óleo essencial de *Psidium myrtilodes* potencializou os efeitos do MMS quando aplicado previa e posteriormente a sua aplicação. Em baixas concentrações o óleo essencial não diminuiu os danos ao DNA de *L. sativa* nos tratamentos realizados.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). (Finance Code 001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hameed, E.-S. S., El-Khateeb, A. Y., & El-Massry, K. F. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of some plant extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 28-34.
- Andrade-Vieira, L. F., Palmieri, M. J., Botelho, C. M., et al. (2017). Evaluation of the antimutagenic potential of *Psidium guajava* L. extracts via plant bioassays. *South African Journal of Botany*, 113, 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.002>
- Aragão, K. S., Silva, R. C., Neris, M. A., Lopes, M. A., Cerqueira, E. M. M., & Meireles, J. R. C. (2015). Danos cromossômicos e alterações nucleares em células esfoliadas do epitélio gengival de indivíduos com periodontite crônica moderada. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 16(1), 19-24. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v16i1.17728>
- Akinboro, A., & Bakare, A. A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.014>
- Bagatini, M. D., Silva, A. C. F. D., Tedesco, S. B. (2007) Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 444-447.
- Bardaweel, S. K., et al. (2015). Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 790838, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/790838>
- Brasil. (2006). Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
- Brasil. (2010). *Farmacopeia Brasileira* (6. ed., vols. I & II). Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Corrêa, M. P., Mors, W. B., & Pereira, N. A. (2018). Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(3), 423-430.

- Cruz, C. D. (2016). Genes Software – Extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum*, 38(4), 547-552.
- El-Ghamery, A. A., El-Kholy, W. M., & El-Metwally, M. M. (2003). Cytogenetic effects of some pesticides on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 540(1), 1-5.
- Frazon, R. C., Campos, L. Z. O., Proença, C. E. B., & Sousa-Silva, J. C. (2009). Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados.
- Gonçalves, M. J., Ferreira, M. J., & Pinto, D. C. G. A. (2017). Antioxidant and antidiabetic activities of plant extracts. *Molecules*, 22(10), 1620.
- Govaerts, R., Frodin, D. G., & Radcliffe-Smith, A. (2016). World checklist and bibliography of Myrtaceae. *Kew Bulletin*, 71(1), 1-100.
- Harashima, A., & Sch-Nittger, L. (2010). Efeito de substâncias mitodepressoras no desenvolvimento de raízes de *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Genética*, 33(1), 45-50.
- Landrum, L. R. (2003). Flora of Bahia: *Psidium* (Myrtaceae). Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682(1), 71-81.
- Matoba, M. M., Souza, L. M., & Silva, M. F. (2007). Análise citogenética de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Genética*, 30(2), 123-130.
- Morais, L. A. S. de. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2), S4050-S4063.
- Muniz, R. M. C. C., Cavalcante, A. L. C., Pereira, L. M. S., Sousa, F. C. F. de, Vasconcellos, S. M. M. de, Macedo, D. S., ... Fonteles, M. M. de F. (2013). PLANTAS MEDICINAIS DA RENISUS DE ATUAÇÃO CENTRAL. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, 24(1/3), 75–80.
- Nantes, C. I., Pesarini, J. R., Mauro, M. O., Monreal, A. C. D., Ramires, A. D., & Oliveira, R. J. (2014). Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of carrageenan fiber in cultured meristematic cells of *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Research*, 13, 9523–9532.
- Noldin, V. F., Cechinel Filho, V., Monache, F. D., Benassi, J. C., Christmann, I. L., Pedrosa, R. C., & Yunes, R. A. (2003). Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynaras colymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 26(3), 331-334. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300008>
- Palmieri, D., Carbone, M., & Di Virgilio, A. (2016). Micronucleus assay in human lymphocytes exposed to methyl methanesulfonate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, 1-6.
- Palmieri, D., Carbone, M., & Di Virgilio, A. (2014). Micronucleus assay in human lymphocytes exposed to methyl methanesulfonate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 1-6.
- Salgado, A. P. S. P. (2001). Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras.

- Silva, J. K. R., Pinto, L. C., Burbano, M. R. M., Montenegro, R. C., Guimarães, E. F., Andrade, E. H. A., Maia, J. C. S. (2014) Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 58, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.006>
- Silveira, G. L., Lima, M. G. F., Reis, G. B., Palmieri, M. J., & Andrade-Vieira, L. F. (2017). Efeitos tóxicos de poluentes ambientais: Investigação comparativa utilizando *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*, 178, 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>
- Soares, N. P., Neres, A. C., Abreu, T., & Aversi-Ferreira, T. A. (2013). Medicinal plants used by the population of Goianópolis, Goiás State, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 35(1), 85-90. [10.4025/actascibiolsci.v35i2.13077](https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i2.13077)
- Sobral, M., Lima, H., & Silva, J. (2016). Araçá. In *Araças do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos* (pp. 15-20). Embrapa Cerrados.
- Teixeira, R. de O., et al. (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4). <https://doi.org/10.1590/S1415-47572003000400021>
- Vasconcelos, L. C., et al. (2019). 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*, 26(25), 26216–26228. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05912-6>
- Yao, Y., Zhang, J., Li, L., & Li, Y. (2016). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 44(12), 5794-5805. <https://doi.org/10.1093/nar/gki681>

## Capítulo III

# Prospecção fitoquímica, fitotoxicidade e citogenotoxicidade de nanoemulsões do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em planta modelo e daninha

 10.46420/9786585756549cap3

Larissa Carolina Lopes de Jesus 

Isabelly da Silva Izidio 

Kátia Aguiar de Souza Monteiro 

Loren Cristina Vasconcelos 

Luiza Alves Mendes 

Milene Miranda Praça Fontes 

## INTRODUÇÃO

Com o uso excessivo de insumos sintéticos, os agricultores enfrentam uma preocupante crise devido ao desenvolvimento de resistência em várias espécies de plantas daninhas. No Brasil, essa preocupação é especialmente relevante, uma vez que o país lidera o consumo de agrotóxicos mundialmente (Amaro et al., 2021). Tal prática desenfreada pode ocasionar sérios problemas ambientais e prejudicar, de maneira nociva, a saúde humana, uma vez que os agrotóxicos têm em sua composição química compostos tóxicos muito comprometedores ocasionando enfermidades dermatológicas, problemas renais e diversos tipos de cânceres (Matias et al., 2021). Sendo assim, há uma grande procura em substâncias capazes de ter o mesmo efeito eficiente dos agroquímicos, porém de maneira sustentável, seletiva e segura para o ser humano.

Substâncias de origem naturais, provenientes das plantas, estão sendo estudadas devido à capacidade dos seus metabólitos secundários de interferirem nos processos germinativos de plântulas (Dousseau et al., 2008). Metabólitos secundário são compostos químicos orgânicos produzidos pelas plantas e liberado no meio ambiente, capazes de retardar o crescimento e desenvolvimento de outras plantas, constituindo um método sustentável e menos agressivo ao ambiente e à saúde humana (Silva et al., 2021). Produtos naturais, óleos essenciais (OEs), nanoemulsão (NE), estão sendo utilizadas como uma ferramenta importante para o manejo das plantas daninhas em programas de manejo sustentável (Oliveira et al., 2009). Os OEs podem ser sintetizados por qualquer órgão da planta, como folha, fruto, caule. Seus componentes são voláteis com baixo peso molecular e são normalmente aromáticos. Em sua maioria, os OEs são constituídos por terpenos, que representa o grupo químico predominante. Eles não se caracterizam por serem produtos simples, pois podem conter mais de 300 componentes químicos

diferentes, o que torna aplicáveis em diversas áreas e cada vez mais valorizados (Knaak & Fiuza, 2010). Uma técnica de intensificar a atividade dos OEs, é pelo desenvolvimento de nanoemulsões (NEs), capaz de diminuir o tamanho das partículas fazendo com que os grupos hidrofílicos fiquem mais expostos facilitando a interação com a membrana celular dos organismos, permitindo que as moléculas químicas alelopáticas tenham acesso facilitado com a maquinaria celular, podendo interromper a divisão celular (Donsi & Ferrari, 2016).

É sabido sobre a riqueza de defensivos naturais, e a família das Myrtaceae se destaca nas pesquisas devido à grande quantidade de espécies ricas em compostos químicos com efeitos fitotóxicos e citotóxicos. Entre as espécies, temos o *Syzygium aromaticum*, conhecido popularmente como cravo-da-índia, a literatura mostra que seu principal componente químico ativo é o eugenol que possui diversas atividades biológicas, como inseticida, afrodisíaco, antidiabética, antitumoral, antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória, antiparasitária (Affonso et al., 2012). Ainda, Li et al. (2023) em sua pesquisa afirma sobre o efeito fitotóxico sobre a *Echinochloa crus-galli*, daninha pertencente à família Poaceae, popularmente conhecida como capim-de-arroz, teve seu crescimento e desenvolvimento corrompido, entretanto é escasso informações sobre seu efeito citotóxico, no qual é importante, pois permite avaliar os efeitos de substâncias químicas que afetam diretamente o crescimento e a divisão celular.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo analisar a composição química da NE do OE de *S. aromaticum* e realizar uma análise fitocitogenotóxica em sementes de *Allium cepa* L. (cebola), utilizada como planta modelo por possuir grande quantidade de sementes, custo baixo e meristema sensível facilitando as análises fito e citogenotóxica e *Bidens pilosa* L. (picão), por ser uma planta daninha, facilidade de cultivo e amplamente distribuído.

## MATERIAL E MÉTODOS

O OE de *S. aromaticum* foi adquirido em um ponto de venda local em Alegre, ES. Para as análises qualitativas e quantitativas 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) (Shimadzu GCMS-QP2010 SE) conforme Adams (2007) e Souza et al. (2017). Para preparar a nanoemulsão do OE de *S. aromaticum* com uma concentração de 10.000 ppm, diluiu-se o OE em uma solução de água destilada contendo 14% (v/v) do surfactante Tween 80. A nanoemulsão foi elaborada utilizando o método de alta energia, por meio de um homogeneizador ultrassônico de alta potência (IKA T Ultra-Turrax) (Azevedo et al., 2021). As NEs foram caracterizadas de acordo com os protocolos descritos no trabalho de Vasconcelos (2024).

Para avaliação do potencial alopático da nanoemulsão, sementes de picão foram escolhidas em virtude à sua elevada competitividade como planta daninha nos campos agrícolas (Silveira et al., 2003), e cebola por ser considerado um organismo modelo devido à sua ampla utilização para investigar os impactos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diversos contaminantes ambientais (Sheikh, Patowary; Laskar, 2020). Assim, as sementes foram expostas a cinco concentrações (3000, 1500, 750, 375 e 187,5  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) que foram preparadas com a dissolução da nanoemulsão em água destilada. Como controle negativo foi utilizado água destilada e solvente Tween 80 (4,2%, v/v). O herbicida glifosato (1 mL/L) foi utilizado 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 ou cebola, ambos com cinco repetições. As placas foram vedadas com plástico filme e colocadas em câmara de germinação (BOD) a aproximadamente 25 °C, onde permaneceram armazenadas durante o experimento, que durou 4 dias para cebola e 7 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. Após esse período, foram selecionadas 10 raízes de cebola de cada placa de Petri para serem fixadas em uma solução de etanol e ácido acético na proporção de 3:1, sendo posteriormente armazenadas em refrigeração para análises do ciclo celular, de acordo com o protocolo de Aragão et al. (2015). Já para picão, os intervalos de observação foram definidos em 24 horas, estendendo-se até 168 h. Por fim, os dados coletados e tabelados, foram utilizados para a comparação das ações dos tratamentos entre si, pelo teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ) através do software R (R Core Team, 2020).

Para as análises citogenotóxicas, foram utilizadas as raízes de cebola que foram fixadas previamente. As radículas fixadas foram lavadas 2x por 10min com água destilada, depois foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 5N a temperatura ambiente por 18 minutos para a confecção das lâminas. Para esse procedimento, as pontas de 2 raízes foram seccionadas em lâminas para a extração das regiões meristemáticas. Em seguida, essas regiões foram coradas com orceína acética a 2%, que agiu por aproximadamente 15 minutos. Logo, o material foi recoberto por lamínulas e o meristema macerado suavemente com o auxílio de uma caneta de ponta redonda. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz da marca NIKON modelo eclipse Ci-S com aumento de 400x e 1000x. Cinco lâminas de cada tratamento foram preparadas para as análises citológicas, com a análise de 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células para cada concentração investigada, sendo o mesmo para os controles.

O índice mitótico (IM) foi avaliado dividindo o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas em cada tratamento. A taxa de alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) foram calculadas dividindo o número de alterações pelo

número total de células analisadas. Foram contabilizadas as alterações cromossômicas dos tipos: cromossomo perdido, cromossomo aderente, poliploidia, C-metáfase, ponte cromossômica e atraso. As frequências de micronúcleos (MNC), brotos celulares e núcleos condensados observados foram categorizadas como as alterações nucleares (Aragão et al., 2015). A genotoxicidade dos compostos foi avaliada a partir da contagem de AC e AN, enquanto o IM foi utilizado para a avaliação do potencial citotóxico (Leme; Marin-Morales, 2009).

Os efeitos aneugênicos foram analisados mediante identificação de células em divisão com metáfase irregular (C-metáfase), alterações na anáfase (multipolar, com atraso, etc.), mudanças na telófase (atrasos) e/ou células binucleadas, multinucleadas, perdas cromossômicas e modificações nas proteínas expressas, gerando cromossomos pegajosos ou aderência cromossômica. Os efeitos clastogênicos foram identificados baseando-se na frequência de células com pontes e quebras cromossômicas (Costalonga & Pimentel Batitucci, 2014). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias ao teste de Dunnett ( $p > 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo computacional em estatística aplicada à genética "Genes" (Cruz, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) obtivemos a caracterização da NE quanto ao tamanho hidrodinâmico (nm), potencial zeta (mV) e polidispersidade (PDI) variáveis que trazem informações sobre a estabilidade da emulsão. O tamanho das partículas observado foi de 11,33 nm, o que indica uma boa homogeneidade, uma vez que está dentro do intervalo adequado para nanoemulsões óleo-em-água (10–100 nm). Já o potencial zeta foi de - 2,21 (em modulo) valor considerado baixo, tal parâmetro reflete o potencial superficial das gotículas e, geralmente, valores acima de 30 (mV) indica estabilidade da NE, enquanto valores abaixo tende a provocar um aumento na taxa de floculação e coalescência das formulações, devido à separação de grupos funcionais na superfície da partícula ou à adesão de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Schaffazick et al., 2003). O PDI, que avalia a homogeneidade na distribuição dos diâmetros, foi de 0,328, indicando uma suspensão coloidal estável. Valores de PDI próximos a 1 indicam um sistema com ampla variação no tamanho das partículas, enquanto valores próximos a 0 indicam um sistema com partículas de tamanho uniforme, mais homogêneo e estável durante longos períodos de armazenamento (Sato, Medeiros; Prochnau, 2018).

**Tabela 1.** Caracterização de nanoemulsão do óleo essencial de *S. aromaticum*. Fonte: Próprio autor.

| Composto             | Tamanho hidrodinâmico (nm) | Zeta (mV) | PDI   |
|----------------------|----------------------------|-----------|-------|
| <i>S. aromaticum</i> | 11,33                      | - 2,21    | 0,328 |

Técnica espalhamento de luz (DLS), caracteriza a NE quanto ao tamanho hidrodinâmico (nm), potencial zeta (mV) e polidispersidade (PDI) variáveis que trazem informações sobre a estabilidade da emulsão.

Para caracterização química do OE, foram identificados três compostos principais, totalizando 100% da amostra. O acetato de eugenila foi o composto majoritário com 36,912%, seguido pelo  $\beta$ -cariofileno com 30,357% e eugenol com 28,174% (Tabela 2). Rabêlo, Mouchrek Filho e Nascimento (2010) destacaram o eugenol como principal componente com atividades inseticida, antiviral, bactericida e fungicida. Ascensão & Mouchrek Filho (2013) também identificaram compostos semelhantes, contribuindo para o entendimento da composição do OE. As variações podem ser causadas por fatores climáticos, sazonais, desenvolvimento, nutrição, água, genética e método de extração (De Moraes, 2009).

**Tabela 2.** Identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *S. aromaticum*. Fonte: Produção do próprio autor.

| n                         | Composto <sup>a</sup> | t <sub>retenção</sub><br>(min.) <sup>b</sup> | A <sub>relativa</sub> (%) <sup>c</sup> | IR <sub>calculado</sub> <sup>d</sup> | IR <sub>tabelado</sub> <sup>e</sup> |
|---------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1                         | eugenol               | 28,174                                       | 95,6                                   | 1363                                 | 1356                                |
| 2                         | $\beta$ -cariofileno  | 30,357                                       | 2,0                                    | 1414                                 | 1417                                |
| 3                         | acetato de eugenila   | 36,912                                       | 2,4                                    | 1552                                 | 1524                                |
| <b>Total identificado</b> |                       |                                              | <b>100,0</b>                           |                                      |                                     |

<sup>a</sup>Compostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna Rtx®-5MS. <sup>b</sup>Tempo de retenção. <sup>c</sup>Compostos com área relativa  $\geq 1\%$  foram identificados. <sup>d</sup>Índice de retenção calculado. <sup>e</sup>Índice de retenção tabelado.

A nanoemulsão de *S. aromaticum* demonstrou eficácia na inibição da germinação do picão, com uma redução de 100% nas concentrações de 3000 e 1500ppm. Na germinação da cebola, houve inibição significativa de 92,8% e 90,4% nas doses mais elevadas, e nas concentrações de 375 e 187,5ppm, a germinação foi de 20% e 28,8%, indicando a ação fitotóxica da nanoemulsão no desenvolvimento inicial das plântulas (Figura 1A).

Adicionalmente, ao calcular o índice de velocidade de germinação (IVG), observamos que, no caso do picão, as taxas de germinação em todas as concentrações testadas diferiram significativamente dos valores observados nos controles, até nas concentrações mais baixas de 375 e 187,5 ppm o IVG foi de 96,63% e 96,52% indicando um valor significativo comparando os parâmetros de controle. Quanto à cebola, nas concentrações de 750 e 375 ppm seu IVG foi de 0,65% e 0,94% sendo similar ao controle positivo de 1,11% (Figura B). Estudos realizados por Li et al. (2023) sobre OE de *S. aromaticum* revelaram seu efeito fitotóxico no crescimento inicial e desenvolvimento de várias espécies de plantas daninhas.

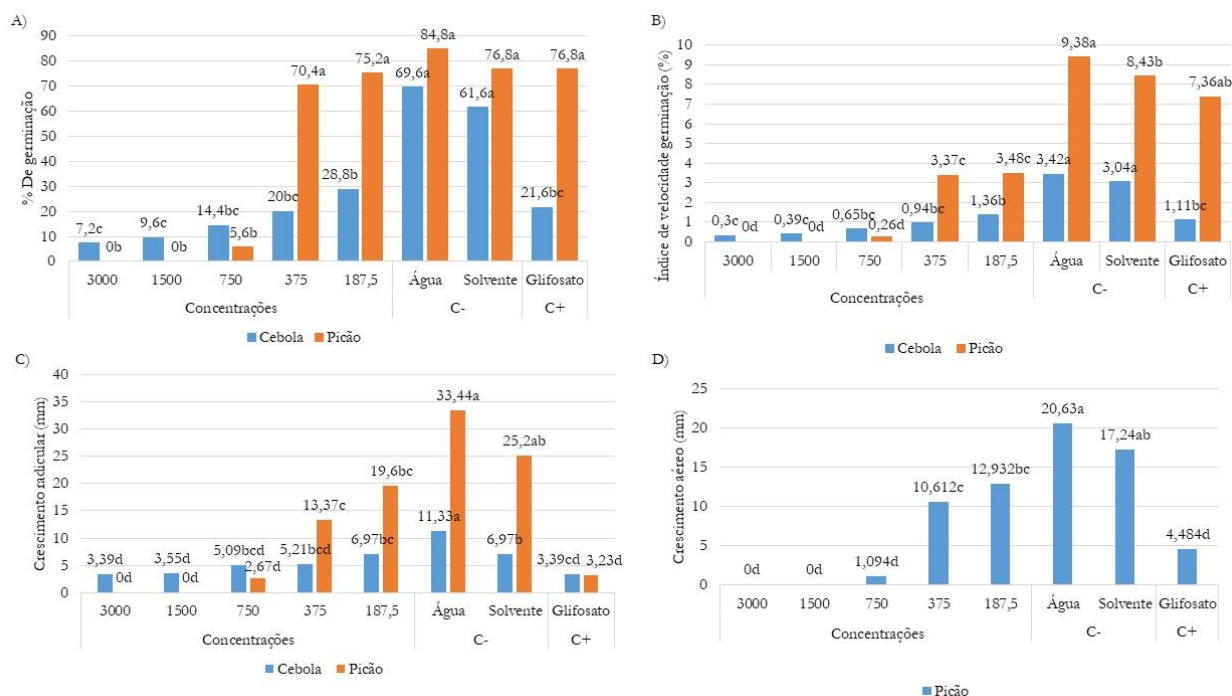


**Figura 1.** Efeito fitotóxico da nanoemulsão do óleo essencial de *S. aromaticum* na % de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e crescimento aéreo de cebola e picão. Os resultados obtidos foram calculados, segundo o teste de Dunnet. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao crescimento radicular (CR), o picão foi afetado pela nanoemulsão, nas concentrações de 3000 e 1500 ppm, visto que não teve nenhum desenvolvimento, isso porque a taxa de germinação foi igual a zero. Já o CR da cebola, nas duas maiores concentrações teve inibição de 96,61% e 96,45% igualando ao controle positivo, ou seja, os resultados encontrados foram similares aos do herbicida glifosato (Figura 1C).

Ademais, foi feita a avaliação do crescimento aéreo (CA) do picão, em que nas concentrações de 3000 e 1500 ppm não teve germinação, porém foi igual ao controle positivo, mostrando a eficiência da NE. Além disso, mesmo a concentração de 375 ppm ser considerada baixa, teve restrição de 89,388% do CA, ou seja, cresceu 10,612%, comparando esse valor com o controle negativo, teve quase o dobro do desenvolvimento da parte aérea (Figura 1D). Posto isso, estudo realizado por Cortés-Rojas, De Souza e Oliveira. (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 a germinação, IVG, CR e CA.

Os resultados citogenotóxicos mostraram que na interfase na concentração de 3000 e 1500ppm foi similar com o controle positivo, os outros tratamentos tiveram resultados similares ao controle

negativo. Na prófase e metáfase todos os ensaios tiveram similaridade e igualdade, evidenciando que as células não conseguiram passar para etapa subsequente (Tabela 3). Na prófase o DNA se torna mais visível. Diferentemente da metáfase, onde os cromossomos atingem sua máxima condensação e se posicionam no centro do fuso, preparando-se para a fase seguinte de separação das cromátides irmãs (Moreira, 2014). Na anáfase, na concentração de 3000ppm foi unicamente idêntica ao controle positivo, nas concentrações de 1500, 750 e 375ppm teve similaridade ao controle positivo e negativo. Já na fase da telófase, na concentração de 3000 ppm, o resultado foi idêntico ao do controle positivo, registrando 0% de progresso. Isso indica que as etapas finais da divisão celular, envolvendo a separação das cromátides e a organização dos núcleos das células filhas, não foram completadas, também apenas as concentrações mais baixas apresentaram similaridade com o controle negativo.

**Tabela 3.** Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *S. aromaticum* sobre a divisão mitótica de células meristemáticas de cebola. Fonte: Produção do próprio autor.

| Soluções                           | Concentrações (ppm) | Interfase | Fases da mitose |          |         |          |
|------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|----------|---------|----------|
|                                    |                     |           | Prófase         | Metáfase | Anáfase | Telófase |
| NE do OE de <i>S. aromaticum</i> . | 3000                | 99,92 a   | 40 a            | 20 a     | 0 b     | 0 b      |
|                                    | 1500                | 96,94 abc | 46,88 a         | 32,99 a  | 4,63 ab | 15,5 a   |
|                                    | 750                 | 95,46 cd  | 43,11 a         | 29,83 a  | 8,8 ab  | 18,25 a  |
|                                    | 375                 | 96,24 bc  | 62,31 a         | 15,57 a  | 8,25 ab | 13,87 ab |
|                                    | 187,5               | 95,78 c   | 45,09 a         | 25,08 a  | 15,45 a | 14,37 ab |
| Controle (-)                       | Solvente            | 95,28 cd  | 52,68 a         | 22,27 a  | 14,21 a | 10,83 ab |
|                                    | Água                | 92,4 d    | 58,04 a         | 20,94 a  | 15,28 a | 8,14 ab  |
| Controle (+)                       | Glifosato           | 99,38 ab  | 83,33 a         | 16,67 a  | 0 b     | 0 b      |

As médias seguidas das letras minúsculas “a”, “b”, “c” e “d” são estatisticamente idênticas ou similares ao solvente, água ou glifosato pelo Teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ).

Os tratamentos e controles positivos com números similares de células nas fases mitóticas sugere que os compostos químicos presentes no OE podem estar efetivamente bloqueando ou retardando o avanço das células para as fases seguintes do ciclo celular. No trabalho conduzido por Silva (2023), relatou que os compostos químicos presentes no OE *S. aromaticum* possui capacidade antioxidante, antibacteriana, capacidade neuroprotetora, eficiência hipolipidêmica, ação antiinflamatória, efeitos anticancerígenos, eficácia antidiabética, atividade antifúngica e anticancerígenas.

Os resultados do índice mitótico (IM) indicaram que o efeito da NE nas duas maiores concentrações foi diferente dos controles, demonstrando uma influência significativa na divisão celular (Tabela 4). Além disso, estudos feitos por Arslan et al. (2001) afirmam que a baixa ou inibição mitótica pode estar relacionada a distúrbios fisiológicos causados pelo funcionamento anormal do núcleo celular, tornando-o incapaz de realizar o ciclo mitótico.

**Tabela 4.** Efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *S. aromaticum* sobre o índice mitótico (IM), frequência de alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN) de células meristemáticas de cebola. Fonte: Produção do próprio autor.

| Soluções                         | Concentrações (ppm) | IM       | AC      | AN      |
|----------------------------------|---------------------|----------|---------|---------|
| NE do OE de <i>S. aromaticum</i> | 3000                | 0,08 d   | 0 c     | 0,38 a  |
|                                  | 1500                | 3,06 bcd | 21,25 a | 0,06 b  |
|                                  | 750                 | 4,52 ab  | 9,99 b  | 0,24 ab |
|                                  | 375                 | 3,76 bc  | 6,77 bc | 0,18 ab |
|                                  | 187,5               | 4,22 b   | 4,25 bc | 0,04 b  |
| Controle (-)                     | Solvente            | 4,72 ab  | 2,51 bc | 0 b     |
|                                  | Água                | 7,6 a    | 0 c     | 0 b     |
| Controle (+)                     | Glifosato           | 0,62 cd  | 0 c     | 0 b     |

As médias seguidas das letras minúsculas “a”, “b”, “c” e “d” são estatisticamente idênticas ou similares ao solvente, água ou glifosato pelo Teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ).

A frequência de alterações cromossômicas (AC) nas maiores concentrações também foi notável, 1500 e 750 ppm, os resultados foram divergentes dos demais tratamentos. Já a frequência de alterações nucleares (AN) mostrou que a maior concentração foi distinta, enquanto os controles positivo e negativo tiveram os mesmos resultados. Sendo assim, a NE teve maior efeito nas maiores concentrações, por outro lado, as menores concentrações foram equivalentes ao controle negativo.

Analisando os resultados das alterações cromossômicas, observamos que a anormalidade do tipo c-metáfase apresentou o maior índice de ocorrência, destacando-se nas concentrações de 1500 e 750ppm, pois nenhuma delas foi similar aos controles (Figura 2). Quando encontradas células na c-metáfase, isso pode significar modificações no fuso mitótico ou nas estruturas dos cromossomos. Nesse caso, os cromossomos estão dispersos, sem o alinhamento típico da metáfase, que seria ao longo da placa metafásica interrompendo o ciclo celular (Amâncio et al., 2016). Também foi encontrado anomalias do tipo cromossomo aderente e perdido tanto nos tratamentos quanto nos controles positivo e negativo.

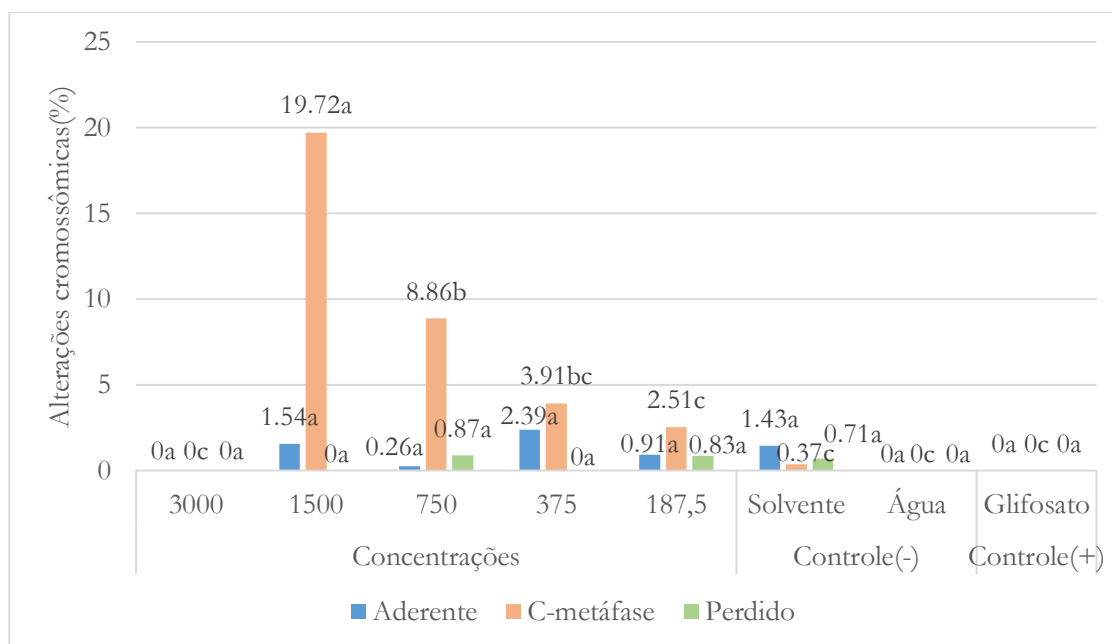
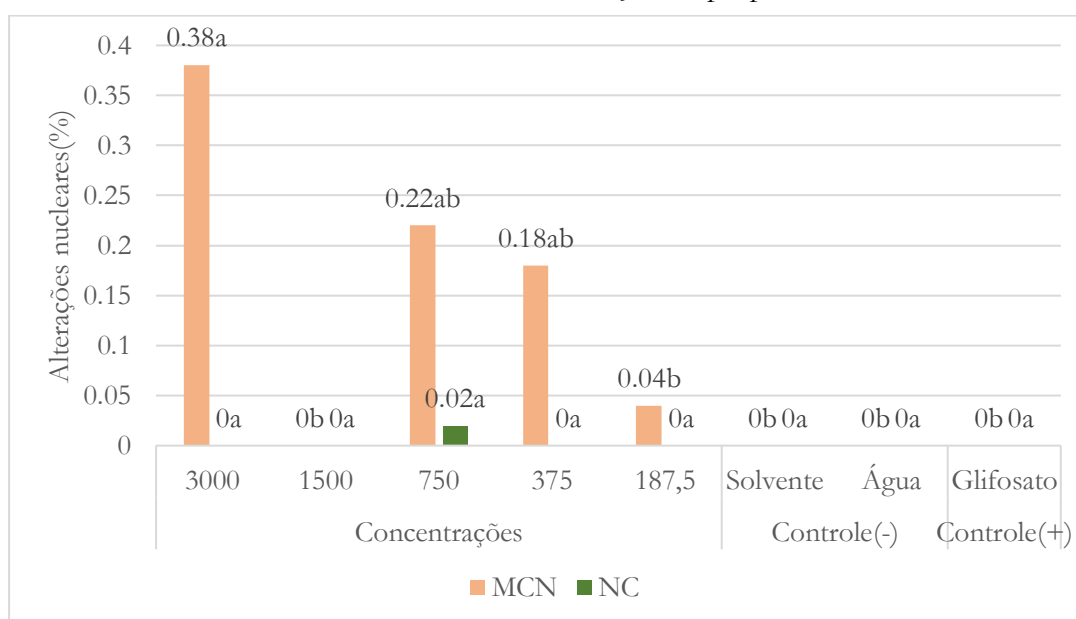


**Figura 2.** Alterações cromossômicas encontradas nos meristemas radiculares de cebola sob o efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *S.aromaticum*. Fonte: Produção do próprio autor. As médias seguidas das letras minúsculas “a”, e “c” são estatisticamente idênticas ou similares à água e solvente pelo Teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ).

Nas análises nucleares, a presença de micronúcleos (MCNs) foi mais significativa na concentração de 3000 ppm, apresentando a maior incidência, com valores diferentes dos controles (Figura 3). Além disso, houve uma alteração do tipo núcleo condensado (NC), com baixa aparição nos tratamentos.

**Figura 3.** Alterações cromossômicas nucleares nos meristemas radiculares de cebola sob o efeito da nanoemulsão do óleo essencial de *S.aromaticum*. Fonte: Produção do próprio autor.



As médias seguidas das letras minúsculas “a” e “b” são estatisticamente idênticas ou similares à água e solvente pelo Teste de Dunnet ( $p > 0,05$ ).

## CONCLUSÃO

Os resultados fitotóxicos indicam que a NE do OE de *S. aromaticum*, nas concentrações mais elevadas testadas, apresentou resultados promissores ao inibir ou retardar a germinação das sementes modelo utilizadas. Além disso, as análises citotóxicas do meristema radicular da cebola mostraram que, nas concentrações mais altas, a atividade celular foi reduzida, com incidência de alterações cromossômicas e nucleares. Isso pode ser atribuído aos compostos químicos presentes no OE de *S. aromaticum* e à técnica de NE, que resultou em partículas de tamanho uniforme, mais homogêneas e estáveis. Portanto, a NE do OE de *S. aromaticum* possui um grande potencial para ser ainda mais estudada e testada, com o objetivo de ser utilizada como uma nova fonte de bioherbicida, mais sustentável e menos prejudicial à saúde humana, apresentando um efeito similar ao dos agroquímicos convencionais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). (Finance Code 001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. P., Sparkman, O. D. Revisão da identificação de componentes de óleos essenciais por cromatografia gasosa/espectrometria de massas. 2007. J. Am. Soc. Mass Spectrom , v. 18, n. 4, p. 803-806. DOI 10.1016/j.jasms.2007.01.001
- Affonso, R. S., Rennó, M. N., Slana, G. B., & Franca, T. C. (2012). Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. Revista Virtual de Química, 4(2), 146-161.
- Amâncio, B. C. S., Govêa, K. P., Trindade, L. O. R., Souza, T. C., & Barbosa, S. (2016). Ação alelopática de diferentes extratos de folha de *Byrsonima spp.* (Malpighiaceae) sobre bioteste de alface (*Lactuca sativa* L.). Brazilian Journal of Botany, 42.
- Amaro, B. B. D. F., Correia, B. B., Freitas, R. A., Teixeira, P. H. R., Nascimento, C. A., Pereira, C. M., Silva, J. R. L., Silva, M. S. A., Cruz, G. V., Queiroz, M. B., Oliveira, J. P. C., Silva, R. A. R., Macedo, G. F., & Kamdem, J. P. (2021). A biossegurança no uso de agrotóxicos na percepção de agricultores do Distrito de Cuncas, Barro – Ceará: Saúde física e ambiental. Research, Society and Development, 10(1).
- Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F. (2015). Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). Allelopathy Journal, 35(1), 259-272.

- Arslan, O., Karataş, A., Kuru, M., & Başaran, S. (2001). Gamma ray-induced mitotic abnormalities in *Helianthus annuus* L. variety Ekiz 1. *Helia*, 24(35), 39-46. DOI: 10.1515/helia.2001.24.35.39.
- Ascensão, V. L., & Mouchrek Filho, V. E. (2013). Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo da índia). DOI: 10.18764/2178-2229.v20n.especialp137-144
- Azevedo, M. M., Almeida, C. A., Chaves, F. C., Ricci-Júnior, E., Garcia, A. R., Rodrigues, I. A., & Alviano, D. S. (2021). *Croton cajucara* essential oil nanoemulsion and its antifungal activities. *Processes*, 9(11). DOI: 10.3390/pr9111872
- Cortés-Rojas, D. F., De Souza, C. F., & Oliveira, W. P. (2014). Cravo (*Syzygium aromaticum*): uma especiaria preciosa. *Revista Ásia-Pacífico de Biomedicina Tropical*, 2, 90-96.
- Costalonga, S. A., & Pimentel Batitucci, M. C. (2014). Avaliação de efeitos mutagênicos de coloração de *Passiflora edulis* Sims (maracujá) no sistema-teste *Allium cepa*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 4, 329-337.
- Cruz, C. D. (2013). GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* (Online, 35), 271-276. DOI: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251
- De Moraes, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2), S3299-S3302
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Nanoemulsões de óleo essencial como agentes antimicrobianos em alimentos. *Journal of Biotechnology*, 233, 106-120. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005
- Dousseau, S., Alvarenga, A., Arantes, L. O., Oliveira, D. V., & Nery, F. C. (2008). Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): Influência da temperatura, luz e substrato. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2), 443-448. DOI: 10.1590/S1413-70542008000200014
- Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2010) Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Biologia Neotropical & Conservação*, v. 2. DOI: 10.4013/nbc.2010.52.08
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). Teste de *Allium cepa* em monitoramento ambiental: Uma revisão sobre sua aplicação. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81. DOI: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
- Li, Z., Jin, C., Xu, J., Luo, S., Bai, Z., Zhou, Y., Han, J., Bai, H., & Ni, X. (2023). Atividades inibitórias de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* na emergência de *Echinochloa crus-galli*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2947818/v1
- Matias, T. P., Castro Neto, T. Z., Botezelli, L., & Imperador, A. M. (2021). Os agrotóxicos mais vendidos no Brasil: Implicações para o meio ambiente e a saúde. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 8, e12110817082. DOI: 10.33448/rsd-v10i8.17082
- Moreira, C. (2014). Ciclo celular. *Revista de Ciência Elementar*, 2(4). DOI: 10.24927/rce2013.052.

- Oliveira, R. A. D., Reis, T. V., Sacramento, C. K. D., Duarte, L. P., & Oliveira, F. F. D. (2009). Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 771-775. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000500020
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rabêlo, W. F., Mouchrek Filho, V. E., & Nascimento, A. R. (2010). Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*). Dissertação de Mestrado, UFMA, Maranhão, Brasil.
- Sato, T. S., Medeiros, T. M. D., & Prochnau, I. S. (2018). Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana. *Revista Fitos*, 12(1). Doi: 10.5935/2446-4775.20180007
- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. D. L., & Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26, 726-737. DOI: 10.1590/S0100-40422003000500017
- Sheikh, N., Patowary, H., & Laskar, R. A. (2020). Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. *Molecular & Cellular Toxicology*, 16, 291-299. DOI: 10.1007/s13273-020-00077-7
- Silva, M. H. S. (2023). Nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo: Estudos de pré-formulação utilizando análise fatorial. Trabalho de Conclusão de Curso, UFRN, Natal, Brasil.
- Silva, V. B., Almeida-Bezerra, J. W., Brito, P. R. V., Cordeiro, L. S., & Silva, M. A. P. (2021). Effect of decomposition of leaves of *Azadirachta indica* A. Juss. on germination and growth of *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *South African Journal of Botany*, 52, 25-45. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.05.031
- Silveira, L. C. P., Bueno, V. H. P., Pierre, L. S. R., & Mendes, S. M. (2003). Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae). *Bragantia*, 62, 261-265. DOI: 10.1590/s0006-87052003000200011
- Singh, N., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., & Yadav, S. S. (2020). Chemical characterization, phytotoxic, and cytotoxic activities of essential oil of *Mentha longifolia*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 13512-13523. DOI: 10.1590/S0006-87052003000200011
- Souza, T. S., Ferreira, M. F. S., Menini, L., Souza, J. R. C. L., Parreira, L. A., Cecon, P. R., & Ferreira, A. (2017). Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. *Scientia Horticulturae*, 216, 38-44. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.12.026
- Vasconcelos, L. C. (2024). Efeito fitocitogenotóxico de óleos essenciais e nanoemulsões de espécies de *Pipe* aplicados em plantas invasoras. Tese de Doutorado, UFES, Alegre, Brasil.

# Propagação *in vitro* de espécies de *Peperomia* visando a extração de óleos essenciais

 10.46420/9786585756549cap4

Ana Luiza Assis Semonato 

Thalya Campelo Vitor 

Aline dos Santos Bergamin 

Milene Miranda Praça Fontes 

## INTRODUÇÃO

A família Piperaceae é uma das oito famílias de angiospermas basais mais abundantes em termos de número de espécies, e foi originalmente descrita por Paul Dietrich Giseke em 1972. Abriga aproximadamente 36% de todas as espécies basais (Wanke et al., 2007; Stevens, 2022), e é notável por sua relevância econômica (Barroso et al., 2002), possuindo uma distribuição pantropical, com uma grande variedade de espécies que habitam florestas tropicais e subtropicais nas Américas, Ásia e no Pacífico-Sul (Jaramillo et al., 2008; Frenzke et al., 2015). Dentre os gêneros descritos para a família, o gênero *Peperomia* é de especial interesse devido ao seu uso ornamental e à sua utilidade como fonte de compostos bioativos obtidos a partir de extratos etanólicos e óleos essenciais (Lorenzi & Souza, 2008; De Souza et al., 2018).

O Brasil é especialmente rico em diversidade de *Peperomia*, com espécies presentes em todo o território nacional. Das 169 espécies descritas, 105 são endêmicas, e a maioria delas é encontrada na Mata Atlântica (Flora do Brasil, 2021). No estado do Espírito Santo, existem 55 espécies de *Peperomia* (Flora do Brasil, 2021), distribuídas em regiões que abrangem fragmentos da Mata Atlântica e unidades de conservação, como o Parque Estadual do Forno Grande.

O nome *Peperomia* deriva do grego, *peperi* (pimenta) *homoios* (similar), que significa similar a pimenta (Spencer, 1995). São plantas que podem ser encontradas como ervas terrestres, epífitas ou rupícolas, com algumas tendo tecidos carnudos. Seus ramos podem crescer de forma prostrada, ascendente ou ereta, frequentemente com raízes nos entrenós (nas epífitas) ou na base (nas terrestres). As folhas são diversas em forma e tamanho, podendo ser membranáceas, cartáceas ou papiráceas, suas inflorescências são em espigas, com ou sem brácteas, e as flores são pequenas, com simetria bilateral, protegidas por brácteas florais e seus frutos são drupas, com diferentes formas e pericarpos (Carvalho-Silva & Guimarães, 2009). Essas características refletem a diversidade deste grupo de plantas, que possui distribuição geográfica confirmada em todas as regiões do Brasil (Flora Brasil, 2021).

O gênero é considerado a segunda maior fonte de compostos bioativos dentro da família Piperaceae, representando 15% do total destas substâncias (Lopez et al., 2010). Apesar do potencial significativo de *Peperomia* como fonte de compostos bioativos para pesquisa científica, a obtenção de espécimes do gênero ao longo de períodos prolongados é desafiadora devido à sua redução durante períodos de seca. Portanto, a conservação desse gênero é de extrema importância para evitar a extinção das espécies nas áreas em que são encontradas.

A *Peperomia alata* é uma espécie que está distribuída geograficamente por todas as regiões do Brasil (Flora do Brasil, 2020), e é facilmente identificada devido aos ramos recumbente, alados, folhas ovado-lanceolado e fruto globoso (Queiroz & Guimarães, 2020). Existem alguns estudos demonstrando a importância e uso dessa espécie para obtenção de óleos essenciais, e compostos a partir de substâncias naturais desses óleos (Ooka et al., 2022). Já *P. stroemfeltii* está localizada principalmente na região sul e sudeste do Brasil (Flora do Brasil, 2021), considerada endêmica, e pertencente ao bioma Mata Atlântica. Ainda é pouco estudada, entretanto, apresenta potencial para estudos *in vitro*, seja visando a extração de óleos como a conservação da mesma.

A técnica de cultura de tecidos vegetais tem se revelado uma ferramenta promissora, a qual envolve a propagação *in vitro* de plantas a partir de pequenos explantes, que são geralmente cultivados em frascos. Nesse ambiente controlado, os meios de cultura e fatores abióticos são ajustados para promover o crescimento e desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas (Cardoso, 2014). Essa técnica oferece diversas vantagens, incluindo a capacidade de multiplicar as plantas em larga escala em curto espaço e tempo, e a obtenção de indivíduos livres de patógenos. Permite ainda, que seja possível manipular a morfogênese vegetal, ou seja, que células, tecidos ou órgãos com diferentes graus de determinação possam adquirir novas habilidades em resposta a sinais químicos específicos (Cardoso, 2014). A técnica permite que seja realizado o balanço hormonal, principalmente de citocininas e auxinas, que são os principais reguladores de crescimento vegetal para a desdiferenciação celular, utilizando-se uma rota alternativa (Almeida et al., 2015).

Diante do exposto, pesquisas biotecnológicas utilizando as técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo adotadas para auxiliar na obtenção rápida e de grande quantidade de plântulas, e assim minimizar problemas relacionados à disponibilidade de material vegetal para estudo e auxiliar na padronização dos constituintes químicos dos óleos essenciais, extraídos destas plantas (Massot et al., 2000).

O objetivo desta pesquisa foi a elaboração de um protocolo de propagação *in vitro* para *Peperomia alata* Ruiz & Pav. e *Peperomia stroemfeltii* Dahlst. visando a multiplicação de plântulas em grande quantidade a fim de prover material para extração de óleos essenciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo. Exemplares de *P. stroemfeltii* e *P. alata* (Figura 1) foram obtidos a partir de coletas realizadas no Parque Estadual Forno Grande, localizado no município de Castelo-ES. Inicialmente foi realizado o processo de desinfestação utilizando-se o protocolo que foi mais eficiente, dentre os previamente testados. Utilizou-se segmentos nodais para indução de brotos, que foram submersos em álcool 70% (v/v) por 1 min e hipoclorito de sódio comercial 50% (v/v) por 20 min. Após os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura utilizado foi o MS acrescido do regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup>, 2,5 mg L<sup>-1</sup> e 5 mg L<sup>-1</sup>. O teste de indução de brotos foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 25 repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por um tubo de ensaio com um segmento nodal em cada, contendo 10 mL de meio de cultivo. Todos os meios utilizados em ambos os experimentos foram suplementados com ágar (7 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8±1 e autoclavados a 121°C por 20 minutos. As condições de cultivo na sala de crescimento foi de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz branca do tipo luz com 25,2 µmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos. As avaliações da indução de brotos foram realizadas computando-se o número de brotos por repetição ao final de 40 dias.

Para a indução de embriogênese somática, utilizou-se segmentos foliares de 1 cm<sup>2</sup> (Figura 2), obtidos de plântulas da organogênese *in vitro* de *P. alata* e *P. stroemfeltii*. Os explantes foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes combinações e quantidades de reguladores de crescimento, sendo o 6-benzilaminopurina (BAP), ácido-1-naftalenoacético (ANA) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Tabela 1). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura aproximada de 25 °C, sob ausência de luz. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições cada tratamento, contendo cinco explantes em cada repetição. As variáveis avaliadas foram porcentagem de calos, brotos e raízes, e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e os valores médios ao Teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando o programa R, versão 4.0.0 (R Core Team 2021).



**Figura 1.** Exemplares coletados em campo, no Parque Estadual do Forno Grande – ES, *Peperomia alata* (A) e *Peperomia Stroemfeltii* (B). Fonte: os autores.



**Figura 2.** Processo de segmentação e inoculação de *P. stroemfeltii* e *P. alata* para a indução de embriogênese somática. Fonte: os autores.

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura utilizados para a indução de embriogênese somática em *P. alata* e *P. stroemfeltii*. Fonte: os autores.

| Componentes                | M1   | M2   | M3   | M4   | M5   | M6   | M7   | M8   | M9   |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| MS <sup>a</sup>            | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  | 4,4  |
| Sacarose <sup>b</sup>      | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| Ác. ascórbico <sup>c</sup> | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Ágar <sup>d</sup>          | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  |
| BAP <sup>e</sup>           | 2,5  | 2,5  | 2,5  | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| ANA <sup>f</sup>           | 1    | -    | 5    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| 2,4-D <sup>g</sup>         | -    | -    | -    | 0,1  | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,5  | 0,6  |

<sup>a</sup>Murashige e Skoog medium (1962) em g L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup>Sacarose em g L<sup>-1</sup>, <sup>c</sup>Ácido ascórbico em g L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup>ágar em g L<sup>-1</sup>,

<sup>e</sup>6-benzilaminopurina (BAP) em mg L<sup>-1</sup>, <sup>f</sup>ácido-1-naftalenoacético (ANA) mg L<sup>-1</sup>, <sup>g</sup>ácido diclorofenoxyacético (2,4-D) em mg

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao teste de indução de brotos utilizando segmentos nodais, notou-se maior desenvolvimento de brotos no tratamento contendo 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP após 40 dias da inoculação (Tabela 2). No tratamento sem regulador de crescimento não houve o surgimento de brotos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Shekhawat et al. (2015) ao utilizar segmentos nodais de *Peperomia pelucida*, no qual o meio MS acrescido com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou melhor resultado no desenvolvimento de brotos do que os demais tratamentos. O resultado superior do BAP na indução de brotos, bem como a capacidade de regeneração de meristemas nodais foi relatado por pesquisadores em diferentes espécies (Patel et al., 2014; Shekhawat et al., 2015). As citocininas aumentam a taxa de divisões celulares que, resultam assim o surgimento de brotos no segmento nodal. As concentrações de auxinas e citocininas são associadas à fase de desenvolvimento dos explantes, indicando que as respostas morfogênicas de um tecido *in vitro* depende da interação destas classes de reguladores (Vongnhay et al., 2024). O sucesso na indução e multiplicação de culturas depende principalmente do tipo de seleção de explantes, na qual deve-se considerar aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. Em teoria, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procuram-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia; Machado, 1998). Uma das vantagens no uso de segmentos nodais está na presença de tecidos meristemáticos, propiciando maior estabilidade genética das plantas micropropagadas.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg/L) sobre o número de brotos de *P. stroemfeltii*.

| Concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) | Número de brotos |
|-------------------------------------|------------------|
| 0.0                                 | *0.00 ± 0.00 b   |
| 2.5                                 | 1.64 ± 1.28 a    |
| 5                                   | 0.44 ± 0.58 b    |

\*As letras pequenas após as médias indicam a diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  $\pm$  desvio padrão da média.

Para a espécie *P. alata*, as repetições dos tratamentos M7, M8 e M9 foram perdidas por contaminação, e, portanto, não foram analisadas. A partir dos resultados apresentados, pode-se notar que não houve a formação de embriões, e a via morfogênica adotada pelos explantes *in vitro*, de ambas as espécies, foi a organogênese direta.

Pôde-se observar que os explantes de *P. alata* expostos ao meio M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA) apresentou a maior porcentagem de calogênese diferindo-se estatisticamente dos demais meios, com uma média de 80% de calos (Gráfico 1-1). Já o meio M6 (0,3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) que não apresenta BAP e ANA em sua composição, apresentou a menor porcentagem média de calos, com apenas 8%. Para *P. stroemfeltii*, não se pôde observar diferença significativa entre os tratamentos testados, quanto a formação de calos (Figura 3).

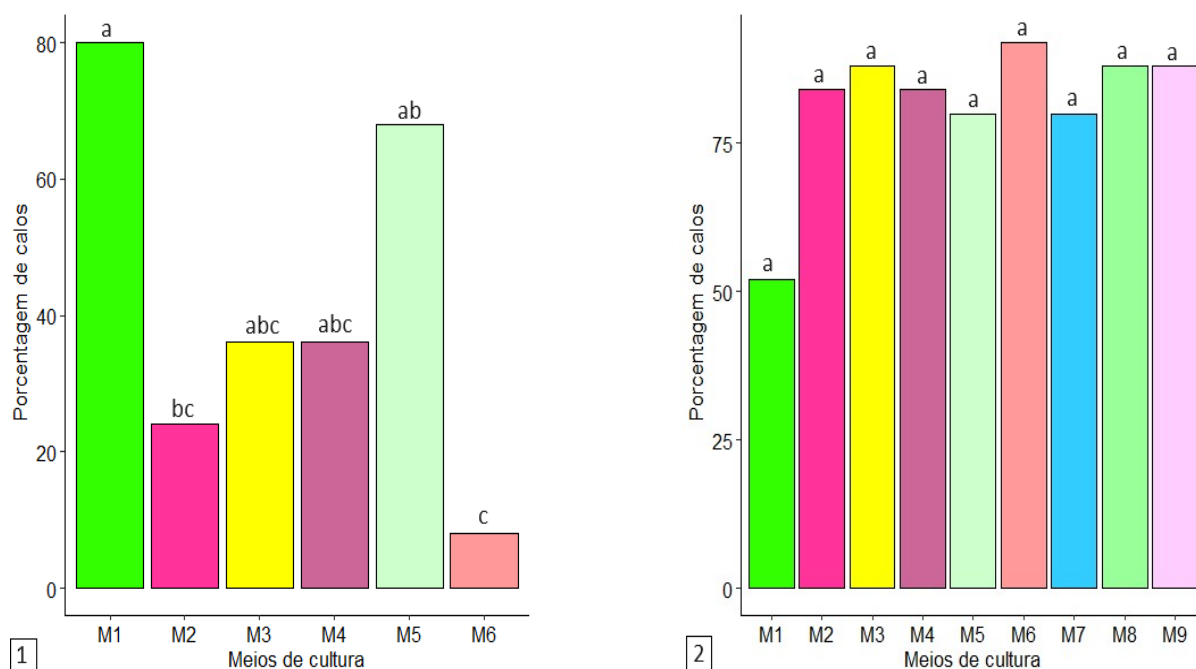


**Figura 3.** Porcentagem média de calos observados em *P. alata* (1) e *P. stroemfeltii* (2), submetidas aos tratamentos: M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M2 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP), M3 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M4 (0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M5 (0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M6 (0,3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M7 (0,4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M8 (0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M9 (0,6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D). As letras pequenas após as médias indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: os autores.

Em relação a formação de brotos para *P. alata*, o M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA) e o M2 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP) foram estatisticamente iguais (Gráfico 2-1), apresentando maior porcentagem média de brotos sendo respectivamente 68 % e 100%. Quanto aos resultados para *P. stroemfeltii*, o tratamento M5 (0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) apresentou maior porcentagem média de brotos (100 %), sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos (Gráfico 2-2). Apesar do tratamento M3 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA) ter sido estatisticamente igual ao tratamento M5, este apresentou a porcentagem média de apenas 80 %. Nos demais tratamentos não foi possível observar a formação de brotos (Figura 4).

Quanto a formação de raízes, observou-se que os tratamentos M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA) e M4 (0,4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) foram estatisticamente iguais, apresentando maior porcentagem média de raízes, 76 % e 64 %, respectivamente. No tratamento M2 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP) não se observou a formação de raízes, diferindo-se M1 e M4. Já para *P. stroemfeltii* não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados, e observou-se a formação de raízes em todos os meios utilizados.

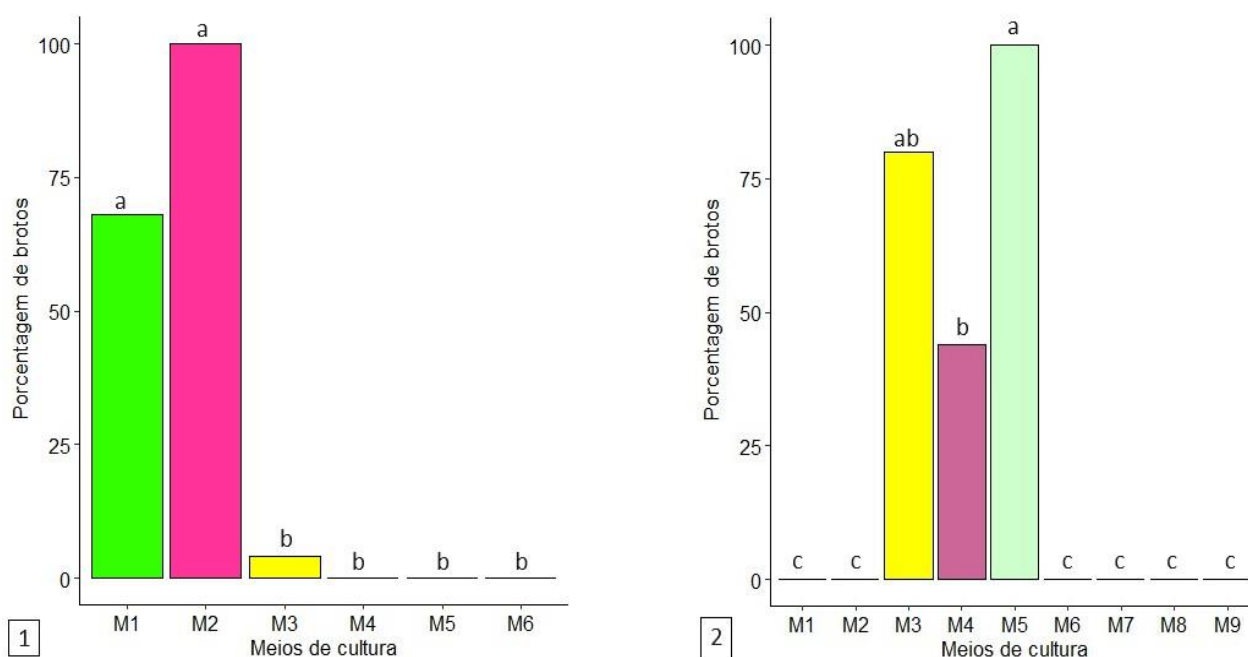


**Figura 4.** Porcentagem média de brotos observados em *P. alata* (1) e *P. stroemfeltii* (2), submetidas aos tratamentos: M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M2 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP), M3 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M4 (0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M5 (0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M6 (0,3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M7 (0,4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M8 (0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M9 (0,6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D). As letras pequenas após as médias indicam a diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: os autores.

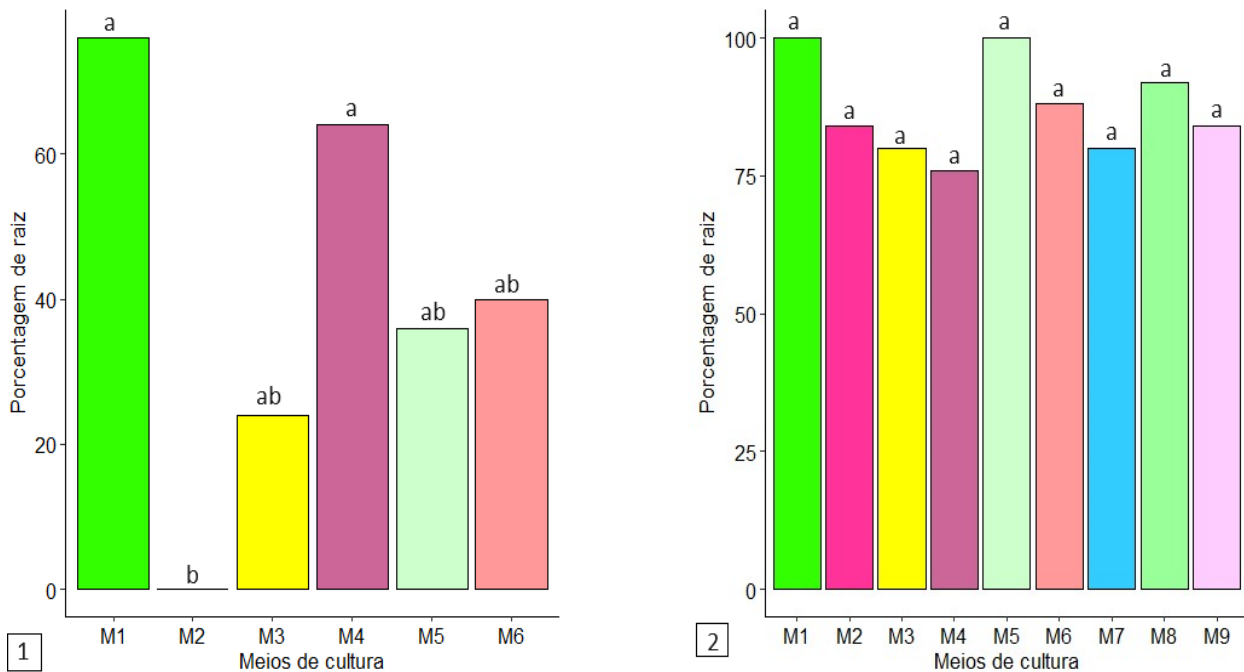


**Figura 5.** Porcentagem média de raízes observadas em *P. alata* (1) e *P. stroemfeltii* (2), submetidas aos tratamentos: M1 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M2 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP), M3 (2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA), M4 (0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M5 (0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M6 (0,3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M7 (0,4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M8 (0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), M9 (0,6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D). As letras pequenas após as médias indicam a diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p < 0,05). Fonte: os autores.

Observa-se que para *P. alata*, o meio M1 composto por 2,5 mg L<sup>-1</sup> BAP e 1 mg L<sup>-1</sup> ANA tiveram bons resultados em relação aos calos, brotos e raízes, o que é coerente já que a citocinina é um hormônio que promove a divisão celular, estimulando a formação de calos e brotos e a auxina é um hormônio que promove o alongamento de células contribuindo na formação de raízes (Cardoso, 2014). De acordo com o estudo realizado por Asghar e colaboradores (2023) através da alteração do balanço entre auxinas e citocininas, é possível induzir calos, que são estruturas que resultam da proliferação celular e desorganização tecidual, em diversas espécies de plantas. Corroborando com resultados encontrados no presente trabalho, Rojas-Idrogo et al. (2020) apresentaram que a maior porcentagem de brotos a partir de explantes foliares e nodais de *P. galioides* foi encontrada em meio MS suplementado com uma combinação de ANA e BAP.

No que se refere a *P. stroemfeltii* tanto para calos como para raízes os efeitos dos meios foram excelentes, mas apenas o meio M5 (0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) foi estatisticamente diferente na indução de brotos, com maior porcentagem média de brotos. Este resultado foi inesperado, considerando que a auxina 2,4-D é mais utilizada para iniciar culturas de calos como foi estudado por Monaly Sado em (2009) quando realizou o estudo do efeito do 2,4-D na calogênese *in vitro* de *Senna specabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva. Apesar disso, outros estudos, cuja o objetivo era a propagação *in vitro* de *Aconitum chasmanthum*, a maior indução e multiplicação de brotos ocorreu em um

meio com baixa concentração de 2,4-D (Rafiq et al., 2021). O que permite pressupor que devido a diversas características fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e de totipotência celular, cada espécie, mesmo que pertencente a um mesmo gênero, pode se comportar de diferentes formas *in vitro*, assumindo diferentes rotas morfogênicas, associadas ou não, com o regulador e estímulos utilizados.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são fundamentais para a otimização dos meios de cultura, especialmente em relação à extração de óleo essencial das espécies estudadas. Esses resultados evidenciam a complexidade do cultivo *in vitro* de *P. alata* e *P. stroemfeltii*, ressaltando a necessidade contínua de pesquisas e ajustes nas condições de cultivo para atender às exigências específicas de cada espécie em diferentes fases de desenvolvimento. Os dados indicam que, mesmo submetidas às mesmas condições e estímulos, as espécies seguem diferentes vias morfogênicas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). (Finance Code 001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M., Graner, É. M., Brondani, G. E., De Oliveira, L. S., Artioli, F. A., De Almeida, L. V., Batagin-Piotto, K. D. (2015) Plant morphogenesis: theoretical bases. *Advances in Forestry Science*, 2, 13-22. <https://doi.org/10.34062/afs.v2i1.2363>.
- Asghar, S., Ghori, N., Hyat, F., Li, Y., & Chen, C. (2023). Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation*, 99(3), 413–428. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00923-9>
- Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Guimarães, E. F., & Costa, C. G. (2002). *Sistemática de angiospermas do Brasil* (2ª ed.). Editora UFV.
- Cardoso, J. C. (2014). Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. *Horticultura Brasileira*, 32, 383.
- Carvalho-Silva, M., & Guimarães, E. F. (2009). Piperaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 235–245.384.
- De Souza, J. A., & Sousa, Z. L. (2018). Estudo da atividade biológica do extrato etanólico da *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. *Revista Cereus*, 10(4), 147–159.

- Flora do Brasil 2021 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Recuperado em janeiro de 2022, de <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12613>
- Frenzke, L., et al. (2015). A revised infrageneric classification of the genus *Peperomia* (Piperaceae). *Taxon*, 64(3), 424–444.
- Grattapaglia, D., & Machado, M. A. (1998). Micropropagação. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, 1, 183–260.
- Jaramillo, M. A., Callejas, R., Davidson, C., Smith, J. F., Stevens, A. C., & Tepe, E. J. (2008). A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ–petA. *Systematic Botany*, 33, 647–660.
- López, S.N., Lopes, A.A., Batista, J.M. Jr, Flausino, O. Jr, Bolzani, Vda. S., Kato, M.J. & Furlan, M. (2010). Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresour Technol.* 2010 Jun;101(12):4251-60. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.041.
- Lorenzi, H., & Souza, H. M. D. (2008). Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. (No Title).
- Massot, B., Milesi, S., Gontier, E., Bourgaud, F., & Guckert, A. (2000). Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 62, 11–19.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Ooka, J. K., Correia, M. V., Scotti, M. T., Fokoue, H. H., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., & Owens, D. K. (2022). Synthesis and activity of 2-acyl-cyclohexane-1,3-dione congeners derived from *Peperomia* natural products against the plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase herbicidal molecular target site. *Plants*, 11(17), 2269.
- Patel, A. K., Agarwal, T., Phulwaria, M., Kataria, V., & Shekhawat, N. S. (2014). An efficient in vitro plant regeneration system from leaf of mature plant of *Leptadenia reticulata* (Jeewanti): a life giving endangered woody climber. *Industrial Crops and Products*, 52, 499–505.
- Queiroz, G., & Guimarães, E. (2020). *Peperomia* (Piperaceae) no Leste Metropolitano do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 71. <https://doi.org/10.1590/2175-78602020711420XX>
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing.
- R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rafiq, S., Wagay, N. A., Bhat, I. A., Kaloo, Z. A., Rashid, S., Lin, F., ... & Elansary, H. O. (2021). In vitro propagation of *Aconitum chasmanthum* Stapf Ex Holmes: An endemic and critically endangered plant species of the western Himalaya. *Horticulturae*, 7(12), 586.

- Rojas-Idrogo, C., Olivera-Morante, M. I., & Delgado-Paredes, G. E. (2020). Propagación in vitro de *Peperomia albobittata* y *Peperomia galioides* por organogénesis. *Biotecnología Vegetal*, 20(2), 92–103.
- Sado, M. (2009). Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva. Tese (Doutorado), Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Spencer, R. (1995). *Horticultural flora of South-Eastern Australia: Flowering plants, dicotyledons: The identification of garden and cultivated plants* (1<sup>a</sup> ed.). Royal Botanic Garden Melbourne.
- Stevens, P. F. (2022). Angiosperm Phylogeny Website. Recuperado em janeiro de 2022, de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>
- Shekhawat, M. S., Manokari, M., Ravindran, C. P. (2015) An Improved Micropropagation Protocol by Ex Vitro Rooting of *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. through Nodal Segment Culture. *Scientifica* (Cairo). <https://doi.org/10.1155/2015/578676>.
- Vongnhay, V., Shukla, M. R., Ayyanath, M. M., Sriskantharajah, K., & Saxena, P. K. (2024). In Vitro Morphogenesis of Tobacco: Modulation of Endogenous Growth Regulators by Tulsi (Holy Basil). *Plants*, 13(14), 2002. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13142002>
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M., Quandt, D., & Neinhuis, C. (2007). Evolution of Piperales–matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 477–497.

## Índice Remissivo

### A

alterações cromossômicas, 12, 20, 22, 23, 29, 34, 36  
alterações nucleares, 20, 22, 24, 29, 34  
antimutagênico, 19, 22, 23

### B

bioatividade, 7, 12, 18

### C

calogênese, 44, 46, 49  
citotóxico, 28, 30  
cravo-da-índia, 28, 32

### E

embriogênese somática, 41, 42, 43

### F

fitotóxico, 7, 31, 32

### H

herbicida, 7, 13, 29, 32

### I

índice mitótico, 20, 22, 29, 33, 34

### M

micronúcleo, 21, 22

### N

nanoemulsão, 4, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35

### O

Orégano, 7

### P

pré-emergentes, 10  
propagação in vitro, 40, 46

### R

regulador de crescimento, 41, 43

## Sobre as organizadoras



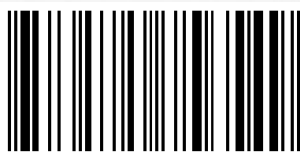
  **Milene Miranda Praça Fontes**

Bióloga, graduada em Ciências Biológicas (2003) na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Mestre (2005) e Doutora (2009) em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Pós-Doutorado (2023) em Citogenética Vegetal na UFV. Atualmente é professora da Universidade Federal do Espírito Santo e realiza pesquisas envolvendo temas em Mutagênese, com o foco em análises de fitotoxicidade e citogenotoxicidade provocadas por substâncias químicas ou do metabolismo secundário de plantas em organismos modelo. Possui 67 artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, 214 resumos completos/simples/expandidos, 2 livros e 27 capítulos de livro. É revisor de 18 revistas nacionais e internacionais. Contato: [mileneufes@gmail.com](mailto:mileneufes@gmail.com)



  **Loren Cristina Vasconcelos**

Bióloga, graduada em Ciências Biológicas Licenciatura (2018) na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Mestra (2020) e Doutora (2024) em Genética e Melhoramento na UFES. Atualmente, é professora da Universidade Federal do Espírito Santo e realiza pesquisas sobre o potencial bioherbicida e citogenotóxico de produtos naturais sobre plantas indesejáveis na agricultura. Possui 11 artigos publicados/aceitos em revistas nacionais e internacionais, 34 trabalhos completos, 15 resumos simples/expandidos e 7 capítulos de livros. Contato: [loren-vasconcelos@hotmail.com](mailto:loren-vasconcelos@hotmail.com)



9786585756549

**Pantanal Editora**

Rua Abaete, 83, Sala B, Centro. CEP: 78690-000

Nova Xavantina – Mato Grosso – Brasil

Telefone (66) 9608-6133 (Whatsapp)

<https://www.editorapantanal.com.br>

[contato@editorapantanal.com.br](mailto:contato@editorapantanal.com.br)

