



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MOZANIEL SANTANA DE OLIVEIRA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) OBTIDO COM CO₂
SUPERCRÍTICO

Belém
Agosto/2016

MOZANIEL SANTANA DE OLIVEIRA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) OBTIDO COM CO₂
SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciência e tecnologia de alimentos do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará - UFPA.

Orientador: Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

Coorientador: Dr Daniel Santiago Pereira

Belém

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Oliveira, Mozaniel Santana de, 1987-

Composição química e atividade fitotóxica de óleo essencial de cravo da índia (*syzygium aromaticum*) obtido com CO₂ supercrítico / Mozaniel Santana de Oliveira. - 2016.

Orientador: Raul Nunes de Carvalho Junior;

Coorientador: Daniel Santiago Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2016.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Óleos vegetais. 3. Extração por solventes. 4. Essencias e óleos essenciais. I. Título.

CDD 22. ed. 660.284248

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) OBTIDO COM CO₂
SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em ciência e tecnologia de
alimentos

Data da defesa: 31 / Agosto / 2016

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior. Orientador
Universidade Federal do Pará – UFPA

Dr. Daniel Santiago Pereira - Co-orientador
Pesquisador Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Dr. Antônio Manoel da Cruz Rodrigues - Membro
Universidade Federal do Pará – UFPA

Dra. Silvia Helena Marques da Silva - Membro
Pesquisadora Instituto Evandro Chagas - IEC

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que se faz presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, namorada, amigos e familiares pela compreensão de minha ausência e pela paciência.

E a todos aqueles que de forma direta e indireta me auxiliaram no desenvolvimento desta árdua tarefa acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder sabedoria e forças nesta trajetória acadêmica, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA- por disponibilização de laboratórios para realização de experimentos, ao Instituto Evandro Chagas pelas análises microbiológicas ao Museu Paraense Emílio Goeldi pelas análises cromatográficas e o CNPq pela Bolsa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais por me concederem a oportunidade de buscar meus objetivos e assim realizá-los e pelo seu amor incondicional.

A minha namorada Joyce Fontes que sempre se fez presente na minha trajetória acadêmica e ajudou na formatação desta dissertação.

Aos meus amigos de infância que sempre se fizeram presentes em minha vida e aos amigos que conquistei ao longo desses 02 anos de curso na Universidade Federal do Pará.

Aos grandes Orientadores: Professor Dr Raul Nunes de Carvalho Júnior, ao Dr Antonio Pedro da Silva Souza Filho, ao Msc. Marcus Arthur Marçal de Vasconcelos (Mavasc), ao Dr Daniel Santiago Pereira, que ao longo desses anos tive a chance de trabalhar e aprender muito com seus conhecimentos.

As Dr^{as} Silvia Helena Marques, Tatiany Menezes, pela disponibilização de amostras e análises microbiológicas e a Professora Dr^a Eloisa Andrade pelas análises cromatográficas.

Aos amigos, Rafael Botelho, Wanessa Almeida, Thomas Moraes, Josenilson Copertino, Clebson Andrade, Carlos Brito, Reinaldo (Jamaica), Thiago Carlos, Wasley Ramos, Marcus Silva, Fernanda Wariss, Robson, Rafael Holanda e ao Renato Cordeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).

RESUMO

Os óleos essenciais de Cravo (*S. aromaticum*) foram obtidos com CO₂ supercrítico nas condições experimentais de 40 °C e 50 °C e pressões de 100, 200, e 300 bar. Os óleos foram caracterizados por cromatografia em fase gasosa (GC) acoplada a um espectrômetro de massa (MS). Foram analisados os efeitos fitotóxicos das frações inicialmente em 600 ppm. A partir dos resultados observados na análise do efeito fitotóxico, a fração obtida na condição de 50 °C e 300 bar foi analisada em níveis de concentração variando de 200 a 800 ppm. O rendimento mais elevado em massa em base seca (bs) ($14,49 \pm 0,2\%$) foi obtido a 50 °C e 300 bar. Mais de 99% dos compostos voláteis foram identificados em óleo essencial de cravo, que compreende 24 substâncias. Em meios globais, 19,72% dos compostos são compostos de hidrocarbonetos de sesquiterpeno, 19,79% de compostos fenólicos, 0,59% de sesquiterpenos oxigenados, 59,75% de monoterpenos oxigenados, e 0,055% de outros compostos. Todas as frações apresentaram atividade fitotóxica para inibir a germinação e o alongamento da radícula e hipocótilo semente. Os melhores resultados foram mostrados por o extrato obtido a 50 °C e 300 bar. Os resultados mostraram que o eugenol desempenha um papel ativo como um agente de promoção de atividade fitotóxica. Em termos de concentração mínima para inibir 50% e 90% de germinação e o alongamento da radícula e do hipocótilo, o extrato obtido a 50 °C e 300 bar de sementes foi o mais eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Fluido supercrítico; Alelopátia; Inibição; Planta daninha; Semente; Radícula; Hipocótilo

ABSTRACT

Clove (*S. aromaticum*) essential oils were obtained with supercritical CO₂ in the experimental conditions of 40 °C and 50 °C and pressures of 100, 200, and 300 bar. The oils were characterized by gas chromatography (GC) coupled to a mass spectrometer (MS). The phytotoxic effects of the fractions initially at 600 ppm were analyzed. From the results observed in the phytotoxic effect analysis, the fraction obtained in the condition of 50 °C and 300 bar was analyzed at concentration levels ranging from 200 to 800 ppm. The highest mass yield in dry basis (db) ($14.49 \pm 0.2\%$) was obtained at 50 °C and 300 bar. Over 99% of the volatile compounds were identified in clove essential oil, comprising 24 substances. In global means, 19.72% of the compounds are composed of sesquiterpene hydrocarbons, 19.79% of phenolic compounds, 0.59% of oxygenated sesquiterpenes, 59.75% of oxygenated monoterpenes, and 0.055% of other compounds. All fractions showed phytotoxic activity to inhibit seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl. The best results were shown by the extract obtained at 50 °C and 300 bar. The results showed that eugenol plays an active role as a phytotoxic-activity-promoting agent. In terms of minimum concentration to inhibit 50% and 90% of seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl, the extract obtained at 50 °C and 300 bar was the most effective.

KEYWORDS: supercritical fluid; allelopathy; inhibition; weed; seed; radicle; hypocotyl.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ARVORE DE CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>SYZYGIUM AROMATICUM</i> L.).	21
FIGURA 2: DIAGRAMA DE FASES DE UMA SUBSTÂNCIA PURA.....	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PROPRIEDADES CRÍTICAS DE DIFERENTES COMPOSTOS. FONTE: (TABERNERO ET AL., 2012).	29
---	----

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO.....	14
1.1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2	HIPÓTESE	16
3	OBJETIVOS DA PESQUISA	17
3.1	GERAL.....	17
3.1.1	<i>Específicos</i>	17
4	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.....	18
5	CAPITULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	20
5.1	CRAVO-DA-ÍNDIA.....	20
5.1.1	<i>Aspectos gerais</i>	20
5.2	PLANTAS DANINHAS.....	21
5.2.1	<i>Controle de plantas daninhas</i>	24
5.3	ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	25
5.4	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	28
6	REFERÊNCIAS	32
7	CAPÍTULO 3 - ARTIGO: CHEMICAL COMPOSITION AND PHYTOTOXIC ACTIVITY OF CLOVE (<i>SYZYGium AROMATICUM</i>) ESSENTIAL OIL OBTAINED WITH SUPERCRITICAL CO₂	38
8	SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	39
9	APÊNDICE II. CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: PHYTOCHEMICAL PROSPECTION OF COMPOUNDS PRODUCED BY WINTER COVER CROPS WITH ALLELOPATHIC POTENTIAL.....	77
10	APÊNDICE III. CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: PHYTOTOXIC POTENTIAL OF THE GEOPROPOLIS EXTRACTS OF JANDAIRA STINGLESS BEE (<i>MELIPONA SUBNITIDA</i> DUCKE) IN WEEDS. DESENVOLVIDO E SUBMETIDO DURANTE O PERÍODO REFERENTE AO DESENVOLVIMENTO DO MESTRADO.....	78
11	APÊNDICE IV. ARTIGO: COPAÍBA (<i>COPAIFERA SP.</i>) LEAF EXTRACTS OBTAINED BY CO₂SUPERCRITICALFLUID EXTRACTION: ISOTHERMS OF GLOBAL YIELD, KINETICS DATA, ANTIOXIDANTACTIVITY AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS. DESENVOLVIDO E ACEITO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.	79
12	APÊNDICE V. ARTIGO: SUPERCRITICAL CO₂EXTRACTION OF AC, AÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) BERRY OIL: GLOBALYIELD, FATTY ACIDS, ALLELOPATHIC ACTIVITIES, AND DETERMINATION OF PHENOLICAND	

ANTHOCYANINS TOTAL COMPOUNDS IN THE RESIDUAL PULP. DESENVOLVIDO E ACEITO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.....	80
13 APÊNDICE VI. TRABALHOS ACEITOS E APRESENTADOS EM FORMA DE RESUMO EM CONGRESSOS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.	81

1 Capítulo.

1.1 Introdução Geral

Ao longo das últimas décadas, muitos esforços vêm sendo despendidos no sentido de detectar espécies de plantas com potencial de uso nas mais variadas atividades humanas, como medicina, cosméticos, higiene pessoal e indústria alimentar. Obviamente, o conhecimento popular e o uso medicinal de muitas espécies de plantas contribuíram para desenvolvimento de pesquisas (MOURÃO JÚNIOR; SOUZA FILHO, 2010).

O uso de produtos naturais como os óleos essenciais ganharam interesse ao longo dos últimos anos principalmente nas áreas agrícolas e farmacológicas, na agricultura pelo seu potencial alelopático, inseticidas, e na indústria farmacêutica pelas suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e por seus compostos serem de origens naturais, os quais geralmente têm apresentado uma baixa toxicidade. As aplicações dos óleos essenciais podem ser vistas nas mais diferentes indústrias como cosméticas, farmacêuticas, sanitárias e agrícolas (BAKKALI et al., 2008; MIRANDA et al., 2015).

A utilização de óleos essenciais de plantas como antimicrobianos naturais tem aumentado. O cravo da Índia (*S. aromaticum*), por exemplo, tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional para o tratamento de infecções fúngicas da pele, boca, urinária e trato vaginal e, mais recentemente, como agente promotor de atividade alelopática para o controle de plantas daninhas (MAZZAFERA, 2003; KHAN; AHMAD, 2012; RODRIGUEZ, 2014; LIU et al., 2015).

O controle de plantas daninhas em muitas culturas ainda é realizado de maneira rudimentar, com emprego de fogo e roçadeira, e, mais recentemente, empregando herbicidas sintéticos. As queimadas e as roçagens, usadas isoladamente ou mesmo em conjunto, demonstram pouca eficiência. Embora os herbicidas sintéticos sejam considerados como um método de controle mais eficaz para um número considerável de plantas daninhas, no entanto, o seu uso tem sido questionado quanto aos possíveis impactos ambientais que podem causar (SOUZA FILHO et al., 2006).

O uso de óleos essenciais para o controle de plantas invasoras vem sendo estudados por diversos autores (TWORKOSKI, 2002; KORDALI et al., 2008; VERDEGUER et al., 2009). No entanto, estes trabalhos utilizam apenas uma fração de óleo essencial, que são

tradicionalmente extraídos por hidrodestilação e ou com uso de solventes orgânicos como o éter de petróleo. Nos últimos anos observa-se uma crescente mudança no modo de extração destes óleos. O uso técnicas que não deixam resíduos tóxicos e nem favorecem a hidrólise dos compostos extraídos é de fundamental importância para as aplicações dos óleos essenciais. Com isso, O CO₂ supercrítico pode ser uma alternativa às práticas de extração utilizadas atualmente (BAKKALI *et al.*, 2008; BIZZO *et al.*, 2009).

Extração supercrítica tem várias vantagens como o fato de ser realizada a baixas temperaturas e o processo de extração ser seletivo. A seletividade da extração supercrítica está diretamente relacionada aos parâmetros utilizados durante o período de extração como temperatura e pressão que alteram a densidade do solvente, possibilitando a extração de diferentes classes de compostos. Componentes adicionais (cossolventes) podem ser usados em pequenas quantidades para manipular o equilíbrio de fases e não gerar resíduos tóxicos. Um componente puro está em estado supercrítico se a sua temperatura e a sua pressão são mais elevadas do que os valores críticos T_c e P_c . Além disso, os possíveis resíduos não causam risco à saúde (BRUNNER, 2005; MERCER; ARMENTA, 2011).

Segundo FORNARI *et al.*, (2012) a extração com fluido supercrítico é uma tecnologia inovadora, limpa e não prejudica o meio ambiente, em se tratando de extração de óleos essenciais de plantas aromáticas, o CO₂ supercrítico é seletivo, e os óleos não precisam passar por nenhum tratamento pós-extração, já que, não há resíduos associados de um solvente tóxico, e os tempos das extrações são relativamente moderados. Além disso, os extratos obtidos com fluido supercrítico são frequentemente reconhecidos pela qualidade superior quando comparados com os produzidos por hidrodestilação ou por extração sólido-líquido.

Além da qualidade superior dos óleos essenciais obtidos com fluido supercrítico, este tipo de extração possibilita a obtenção de frações variadas tanto em termos de rendimento mássico quanto em termos de composição química, e principalmente pelo fato do solvente ser considerado "verde" que não deixa contaminações nos óleos essenciais, o que justifica a aplicação direta nas mais diferentes áreas do conhecimento.

2 Hipótese

- ✓ H1. A utilização do CO₂ supercrítico em diferentes combinações de temperatura e pressão influencia na composição química dos óleos essenciais.
- ✓ H2. A composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais influencia a atividade fitotóxica potencial

3 Objetivos da Pesquisa

3.1 Geral

Obter diferentes frações de óleo essenciais de cravo da Índia em termos de rendimento e composição química extraindo com CO₂ supercrítico, e comparar a atividade fitotóxica das frações e o composto majoritário sobre duas espécies de plantas invasoras da Amazônia.

3.1.1 Específicos

- ✓ Avaliar parâmetros termodinâmicos do processo de extração supercrítica;
- ✓ Analisar as isotermas de rendimento;
- ✓ Caracterizar os óleos essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS);
- ✓ Analisar a atividade fitotóxica das frações de óleos essenciais com o padrão de Eugenol sobre duas espécies de plantas invasoras

4 Estrutura da Dissertação de Mestrado

Esta Dissertação de Mestrado está dividida em 3 capítulos da seguinte forma:

Capítulo 1 (Introdução e Estrutura da Dissertação) insere o leitor ao tema central desta dissertação, colocando, de forma sucinta, os pontos mais relevantes.

Capítulo 2 (Revisão da literatura) contextualiza o leitor no estado da arte referente a este trabalho de Dissertação.

Capítulo 3 Traz o Artigo publicado no Journal Supercritical Fluids intitulado de: **Chemical Composition and Phytotoxic Activity of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil Obtained with Supercritical CO₂**

O artigo compara atividade fitotóxica de diferentes frações de óleos essenciais de cravo da Índia obtido com CO₂ supercrítico e o Eugenol. Os óleos essenciais de cravo da Índia foram obtidos nas condições experimentais de 40°C e 50°C e 100, 200 e 300 bar. Os óleos foram caracterizados por cromatografia em fase gasosa (GC) acoplada a um espectrômetro de massa (MS). Os efeitos fitotóxicos das frações foram analisados inicialmente em 600 ppm. A partir dos resultados observados na análise do efeito fitotóxico, a fração obtida na condição de 50°C e 300bar foi analisada em níveis de concentração variando de 200 a 800 ppm. O rendimento mássico mais elevado foi de (14,49 ± 0,2%) na condição de 50°C e 300bar. Mais de 99% dos compostos voláteis foram identificados em óleo essencial de cravo, que compreende 24 substâncias. Em termos globais, 19,72% das substâncias são de hidrocarbonetos de sesquiterpeno, 19,79% de compostos fenólicos, 0,59% de sesquiterpenos oxigenados, 59,75% de monoterpenos oxigenados, e 0,055% de outros compostos. Os melhores resultados foram mostrados pelo extrato obtido a 50°C e 300 bar. Os resultados mostraram que o eugenol desempenha um papel ativo como um agente de promoção de atividade fitotóxica. Em termos de concentração mínima para inibir 50% e 90% de germinação de sementes e o alongamento da radícula e do hipocótilo, o extrato obtido a 50°C e 300 bar foi o mais eficaz.

APÊNDICES

Os apêndices listados abaixo são de trabalhos em forma de artigo aceitos ou submetidos em revista científica e resumos aceitos em anais de congressos. Onde o autor da presente Dissertação participa de forma efetiva para os seus desenvolvimentos durante o período de 08/2014 - 08/2016.

Apêndice I. Traz o artigo publicado no Journal Supercritical Fluids no ano de 2016: **Chemical Composition and Phytotoxic Activity of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil Obtained with Supercritical CO₂**. Principal Artigo desenvolvido pelo autor desta dissertação.

Apêndice II. Traz a carta de submissão do artigo: **Phytochemical prospection of compounds produced by winter cover crops with allelopathic potential**. Desenvolvido e submetido durante o período referente ao mestrado.

Apêndice III. Traz a carta de submissão do artigo: **PHYTOTOXIC POTENTIAL OF THE GEOPROPOLIS EXTRACTS OF JANDAIRA STINGLESS BEE (*Melipona subnitida* Ducke) IN WEEDS**. Desenvolvido e submetido durante o período referente ao mestrado.

Apêndice IV. Traz o artigo: **Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂supercriticalfluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidantactivity and neuroprotective effects**. Desenvolvido e aceito durante o período do mestrado.

Apêndice V. Traz o artigo: **Supercritical CO₂extraction of ac, aí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Globalyield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolicand anthocyanins total compounds in the residual pulp**. Desenvolvido e aceito durante o período do mestrado.

Apêndice VI. Traz os 14 trabalhos aceitos e apresentados em forma de resumo em congressos durante o período do mestrado.

5 CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA

5.1 CRAVO-DA-ÍNDIA

5.1.1 Aspectos gerais

A árvore produtora do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) é endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas - Indonésia), tendo sido disseminada pelos alemães durante a colonização pelas outras ilhas do arquipélago, assim como para outros países. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores de cravo-da-índia, seguidos pela Indonésia. É usado principalmente como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol (MAZZAFERA, 2003).

Os metabólitos secundários de plantas, em especial os óleos essenciais normalmente são produzidos por células secretoras ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal, como folhas, talos, casca ou frutos e frequentemente apresentam composição diferente. A aplicação de óleos essenciais como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, cosméticas ou ainda em formulações sanitizantes tem despertado grande interesse neste setor industrial devido à grande aceitação dos consumidores por produtos naturais, bem como o desejo de evitar possíveis danos à saúde propiciados pelos aditivos sintéticos (SCHERER *et al.*, 2009).

O óleo essencial de cravo-da-índia é um produto importante para a indústria de alimentos, pois apresenta um poderoso antioxidante e potencial antimicrobiano permitindo a sua utilização para a substituição de produtos comerciais sintéticos para a conservação de alimentos (SCOPEL *et al.*, 2014).

Em relação a dados da literatura, YANG *et al.*, (2014) avaliaram a extração e quantificação de óleos de *Syzygium aromaticum* com CO₂ supercrítico assistida com ultrassom (USC-CO₂), determinaram os rendimentos de extração de óleos e os conteúdos de eugenol, β -cariofileno, acetato eugenilo e α -humuleno de botões de cravo. Comparado à extração tradicional SC-CO₂, a extração USC-CO₂ pode proporcionar um aumento de 13,5% no rendimento de extração para o óleo utilizando parâmetros operacionais menos severos, tais como a temperatura, pressão, taxa de fluxo do CO₂ e o tempo consumido pelo processo. Os resultados foram comparáveis aos obtidos utilizando o método de extração de refluxo de

calor. Neste caso, o uso da USC-CO₂ facilitou o uso de condições de extração mais brandas e melhorou a eficiência da extração e qualidade dos produtos e foi considerado um método interessante para a indústria.



Figura 1: árvore de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) Foto: Mário Franco, fonte: <http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2011/03/cravo-da-india-syzygium-aromaticum-1.html> (Acesso 22/12/2015).

5.2 PLANTAS DANINHAS

As plantas daninhas se constituem no principal problema de ordem biológica a impor limitações ao desenvolvimento da atividade agrícola, especialmente nas regiões tropicais. Muitas das interferências promovidas por essas plantas são competitivas, porém, outras são de cunho químico. O resultado desses dois tipos de interferência é a redução da capacidade produtiva, com reflexos na capacidade competitiva e econômica da atividade. Muitas plantas daninhas são produtoras de metabólitos químicos, que uma vez liberados para o ambiente promovem alterações nas comunidades de plantas cultivadas (SOUSA FILHO, 2015).

Outro problema é o processo evolutivo que as plantas daninhas vêm sofrendo, principalmente por ação do ser humano em áreas de manejo, tornando-as resistentes aos defensivos químicos. Na maioria das vezes, a resistência de biótipos de plantas daninhas aos herbicidas ocorre como consequência do uso repetido do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, sempre associado a monoculturas (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 1994).

As plantas daninhas promovem dois tipos básicos de interferências em cultivos agrícolas: alelospolia e alelopátia. Alelospolia é o tipo de interferência promovida pela competição por fatores essenciais à sobrevivência das espécies, como água, nutrientes e espaço físico. Já alelopátia envolve a produção de aleloquímicos e subsequente liberação para o ambiente (SPIASSI *et al.*, 2010).

Fatores bióticos e as plantas daninhas são uns dos principais responsáveis pela diminuição da produtividade na agricultura. A presença dessas plantas pode interferir no processo produtivo, competindo pelos recursos do meio, principalmente água, luz e nutrientes, liberando substâncias fitotóxicas, atuando como hospedeiro de pragas e doenças comuns à cultura e interferindo nas práticas de colheita (PITELLI, 1985 citado por KUVA *et al.*, 2000) Sabe-se que muitos metabólitos secundários produzidos por plantas invasoras, desempenham um papel importante nas interações complexas entre os organismos vivos no ambiente natural. Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelas plantas que podem trazer benefícios a agricultura podendo atuar de duas formas: uma estimulando o crescimento de plantas e outra inibindo a proliferação de plantas daninhas (SAMPIETRO, 2002).

O processo produtivo pode sofrer degradação com o manejo inadequado de áreas de pastagens causado pela infestação de plantas daninhas. A competição com as gramíneas promovida por plantas invasoras reduz a produtividade das forrageiras. Ao competir pelos fatores de crescimento, as plantas daninhas também promovem queda da capacidade de suporte da pastagem, aumentam o tempo de formação e de recuperação do pasto, podem causar ferimentos e/ou intoxicação aos animais e comprometem a aparência dos pastos onde se localizam (SANTOS, 2004).

Outro problema relacionado às plantas daninhas são as intoxicações de animais, o que significa perdas econômicas para uma região. As consequências das intoxicações são a morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), que conseqüentemente levam à redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias: enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã, e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; CARVALHO *et al.*, 2008; GARCIA, 2009).

CARVALHO *et al.*, (2014) investigaram um surto de intoxicação por *Senna obtusifolia* em bovinos no estado de Mato Grosso do Sul, na região do Pantanal. Em um lote de 313 novilhas, 165 adoeceram e morreram (coeficientes de morbidade de 52,7% e de letalidade de 100%). Os bovinos permaneceram no piquete infestado pela planta por 37 dias. Os sinais clínicos consistiram em: relutância em movimentar-se, andar trôpego (incoordenação), decúbito esternal permanente, diminuição do tônus de língua, estado comportamental em alerta, mioglobinúria caracterizada por urina castanho-escuro e fezes ressecadas com ou sem muco (ocasionalmente diarreicas com estrias de sangue).

As plantas do gênero *Senna* causam miopatia degenerativa em bovinos e o maior número de relatos envolve a *Senna occidentalis*. No entanto, outra espécie de *Senna* como no caso a *Senna obtusifolia* os efeitos toxicológicos consistem em mioglobinúria, incoordenação e decúbito esternal permanente; e a planta demonstra ter efeito miotóxico e hepatotóxico em animais. Os indivíduos intoxicados por este tipo de planta daninha quase sempre vão a óbito (QUEIROZ *et al.*, 2012).

REIS (2012) estudou as lesões traumáticas de pele em equídeos causadas por plantas traumáticas da família Leguminosae Mimosoideae, também conhecidas popularmente como “dorme-maria”, “dormideira”, “arranhadeira”, “malícia” e “não-me-toque”. Os animais apresentaram lesões ulcerativas, de bordos irregulares, na cabeça (narinas, focinho, lábios superiores e inferiores e chanfro), na cavidade oral (vestíbulo bucal e gengiva) e nos membros (boletos, metacarpos e metatarsos e articulação escápulo-umeral). No exame histopatológico foram observados focos de erosões cutâneas, caracterizados por perda e necrose da epiderme, com espongiose e degeneração vesicular da epiderme remanescente, e leve infiltrado inflamatório na derme subjacente, constituído predominantemente por macrófagos e, em menor grau, eosinófilos. Todos estes causados por ação traumática de *Mimosa pudica* e *Mimosa debilis*.

No entanto, as plantas invasoras podem desempenhar funções ecológicas importantes. Alguns grupos podem, por exemplo, promover os mesmos efeitos de cobertura do solo, produção de biomassa e ciclagem de nutrientes para adubação verde. As leguminosas, por exemplo, fixam nitrogênio atmosférico por meio da associação com bactérias que vivem em simbiose nas raízes; produzem grande quantidade de massa e apresenta sistema radicular pivotante, capaz de extrair nutrientes que se encontram em

camadas mais profundas do solo, os quais serão disponibilizados após sua decomposição e incorporação ao solo (FAVERO *et al.*, 2000).

5.2.1 Controle de plantas daninhas

Anteriormente foram analisados alguns fatores que mostram que a plantas daninhas são competitivas. As principais competições causados pelas plantas daninhas são as por espaço, luz, água e nutrientes, além de outras indiretas que também justificam o seu controle. (PEREIRA, 1990) listou alguns métodos preventivos para o controle de plantas daninhas: (1) utilizar sementes de forrageiras livres da presença de sementes de plantas daninhas na formação das pastagens; (2) formar pastagens com espécies e/ou variedades adaptadas às condições locais; (3) dividir os pastos para promover o pastejo rotativo; (4) ajustar a carga animal de acordo com a disponibilidade de forragem do pasto; (5) manter o gado em local restrito por 48 horas quando este vier de pastos com plantas daninhas sementeando e (6) efetuar adubação de manutenção de acordo com a análise do solo e recomendações de pesquisas regionais.

Atualmente o método de controle químico é o mais usado para inibir o crescimento de plantas invasoras com uso de herbicidas sintéticos, que são utilizados em quantidades elevadas principalmente por grandes produtores como relatam alguns autores (BUENO *et al.*, 2013; GAZZIERO, 2015). A utilização de herbicidas em áreas de manejo promove a morte das plantas daninhas de maneira seletiva, e conseqüentemente acaba com a competição entre as plantas, ajudando no aumento da produção de massa verde na pastagem. Após a limpeza das pastagens, é fundamental que se utilize boas práticas de manejo das pastagens para evitar a sua reinfestação por plantas invasoras, e mantê-la produtiva por um longo tempo (FERREIRA *et al.*, 2010).

O uso de agroquímicos está diretamente relacionado à alta produtividade e à demanda crescente por alimentos, no entanto, o crescente aumento do uso de agroquímicos, não é considerado uma pratica sustentável, uma vez que esses produtos contaminam o meio-ambiente e favorecem o aparecimento de plantas invasoras tolerantes (resistência) aos diferentes tipos de herbicidas (SOUZA FILHO; ALVES, 1998).

Segundo CHRISTOFFOLETI *et al.*, (1994), a resistência de plantas daninhas aos herbicidas pode estar relacionado a um processo evolutivo. No entanto, alguns desenvolvimentos de biótipos de plantas daninhas resistentes são impostos pela agricultura através da pressão de seleção causada pelo uso intensivo dos herbicidas. A resistência de plantas daninhas aos herbicidas pode resultar de mudanças bioquímicas e fisiológicas, alterações morfológicas ou mudanças fenológicas de certos biótipos de plantas invasoras. Muitos casos de resistência aos herbicidas resultam tanto de alteração do sítio de ação do herbicida ou aumento do seu metabolismo, quanto da departamentalização e compartimentalização do herbicida na planta (LEBARON; MCFARLAND, 1990).

Novos estudos propõem métodos naturais para o controle de plantas daninhas. (DUART *et al.*, 2013) avaliaram os efeitos de diferentes tipos de cobertura morta de solo de origem vegetal sobre o crescimento, controle de plantas daninhas, produtividade e regime hidrotérmico do solo no cultivo da cenoura. A utilização da cobertura morta de solo mostrou-se como uma prática vantajosa para o cultivo de verão da cenoura, reduziu a temperatura em até 3,5°C aumentou a retenção de umidade do solo em até 2,3% em relação ao controle e melhorou o desenvolvimento das plantas de cenoura. Houve menor incidência de plantas daninhas com o uso de maravilha e capim seco que, juntamente com a serragem, também aumentaram o número de plantas colhidas. (DANTAS *et al.*, 2015) avaliaram a produção de matéria seca e o controle de plantas daninhas por espécies de leguminosas consorciadas com cana-de-açúcar, em cultivo orgânico. O estudo demonstrou que a produtividade de colmos da cana-de-açúcar não foi afetada e o método foi eficiente para o controle de plantas daninhas.

Outra técnica que pode ser utilizada para o controle de plantas daninhas é a utilização de metabólitos secundários (aleloquímicos) de origem vegetal, que não deixa de ser um controle químico, no entanto, oferece menores riscos para a saúde humana, como será relatado na próxima seção.

5.3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A alelopátia é um novo ramo da ciência, o qual pode fornecer base para a sustentabilidade da agricultura nos mais diferentes segmentos. Conseqüentemente, um número considerável de pesquisas com alelopátia em diversos países vêm sendo conduzidas, incluindo o Brasil, embora com uma participação bastante modesta. Em princípio, utiliza-se a alelopátia como meio para explicar determinados fenômenos que ocorrem na natureza.

Entretanto, as reais possibilidades do emprego da alelopátia na agricultura extrapolam essas perspectivas (SOUZA FILHO; ALVES, 1998).

Estudos de alelopátia investigam os efeitos positivos e negativos que metabólitos secundários de plantas ou microrganismos exercem sobre o desenvolvimento de indivíduos vizinhos (CARMO *et al.*, 2007). O termo alelopátia deriva do grego *allelon*, mútuo, e *pathos*, prejuízo, e foi cunhado pela primeira vez em 1937 por Molisch, para designar os efeitos de substâncias venenosas, através das quais as plantas podem impedir a colonização de outras espécies vegetais ao seu redor (FERREIRA; AQUILA, 2000; LARCHER, 2000).

A ciência da alelopátia progrediu a tal ponto que seus fundamentos descritivos e experimentais propiciaram uma base que pode ser utilizada como ferramenta para a produção agrícola. Uma vez que os aleloquímicos são comuns nos vegetais, comprovadamente tóxicos para as plantas, potencialmente efetivos, seletivos e muitas vezes, ambientalmente seguros, admite-se a possibilidade de, conhecida a estrutura química dos componentes ativos envolvidos, obter herbicidas com vantagens ecológicas de produtos naturais (RODRIGUES, 2008).

Quase todos os aleloquímicos herbicidas em plantas existem em formas conjugadas, não tóxicas. O fragmento tóxico pode ser liberado após a exposição a stress ou após a morte do tecido. O uso de maior sucesso de aleloquímicos no controle de plantas daninhas tem sido a gestão de resíduos vegetais seletivamente tóxicos. Por exemplo, resíduo de centeio tem controlado eficazmente ervas daninha em uma variedade de sistemas de cultivo. Várias espécies de plantas daninhas podem interferir com o crescimento da cultura através de agentes químicos libertados por seus resíduos. Um número de espécies perenes nocivas parece explorar aleloquímicos em seus processos de interferência (PUTNAM, 1988).

Uma vez que os aleloquímicos são comuns nos vegetais, admite-se a possibilidade de se obter herbicidas com vantagens ecológicas a partir de produtos naturais, podendo substituir os pesticidas sintéticos, assim reduzindo a poluição ambiental e aumentar a produtividade agrícola. Por meio da modificação de suas moléculas, o produto final pode ser mais ativo, seletivo ou persistente (PUTNAM, 1988).

Novos mecanismos de ação para herbicidas são altamente desejáveis para combater a evolução de resistência em plantas daninhas, uma vez que herbicidas comerciais têm um número limitado de sítios ativos (RODRIGUES *et al.*, 2010). Uma comparação entre os

conhecidos sítios ativos de herbicidas sintéticos e de fitotoxinas naturais revela que existe pequena redundância. Comparativamente pouco esforço tem sido dispensado na determinação dos sítios de ação de fitotoxinas de origem natural, sugerindo que um estudo intensivo destas moléculas pode revelar novos mecanismos de ação (DUKE et al., 2000).

Sob o ponto de vista agrônômico, a alelopátia é de grande interesse, pois possibilita não só a seleção de plantas de pastagens que podem exercer certo nível de controle de determinadas espécies indesejáveis como as plantas invasoras, como também, o estabelecimento de espécies de gramíneas e leguminosas forrageiras que não sejam fortemente alelopáticas entre si e que podem, desta maneira, compor pastagens mais equilibradas, com reflexos favoráveis na produtividade e longevidade da mesma (WARDLE, 1987).

Tem-se demonstrado que diversas espécies, além das cultivadas presentes em agroecossistemas, podem exercer influência alelopática sobre culturas, conseqüentemente afetando sua germinação e crescimento. Em algumas espécies cultivadas observou-se que seus resíduos podem controlar ou até mesmo suprimir a emergência e crescimento vegetativo de algumas espécies de plantas daninhas (CHON; KIM, 2004).

A alelopátia também é investigada quanto aos efeitos promovidos por extratos de plantas sobre a germinação de sementes, alongamento da radícula e do hipocótilo, e analisado quais partes da planta são mais sensíveis à presença de aleloquímicos. Em alguns casos, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula (REIGOSA; PAZOS-MALVIDO, 2007).

Desta forma, a alelopátia poderá desempenhar um importante papel ecológico em um futuro próximo, como fonte de novas substâncias químicas com possibilidades de uso na agricultura brasileira, à semelhança do que já ocorre em outros países como Japão, Alemanha e Estados Unidos; sejam como ferramenta de manejo das pastagens e/ou como fornecedor de estruturas básicas para a produção de biodefensivos agrícolas (SOUZA FILHO; ALVES, 1998).

5.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

O fracionamento de matérias-primas naturais são uma das aplicações mais estudadas na área de fluidos supercríticos. Nos últimos anos, os estudos sobre a extração de compostos clássicos como os dos óleos essenciais a partir de várias fontes como: sementes, frutos, folhas, flores, rizomas, etc., com ou sem a adição de um co-solvente têm sido publicados nos mais diversos periódicos científicos (REVERCHON; MARCO, 2006; LARKECHE *et al.*, 2015; ARRANZ *et al.*, 2015; UQUICHE *et al.*, 2015).

A extração com fluido supercrítico é a combinação de vários tipos de operações unitárias e explora o poder de solvatação do fluido quando a sua pressão e temperatura estão acima dos seus pontos críticos (P_c e T_c) figura 2. Nesse sentido, os fluidos supercríticos apresentam meios bastante atrativos devido às várias características distintas, tais como a facilidade de recuperação do soluto e reciclagem do solvente, com a simples manipulação das condições termodinâmicas de temperatura e/ou a pressão. Desta forma, podemos ter o controle da seletividade do processo (NDIOMU; SIMPSON, 1988; MOHAMED, 1997; KING; SRINIVAS, 2009). A pressão crítica (P_c) é definida como a pressão máxima à qual um líquido pode ser convertido em um gás por um aumento na temperatura. Considerando que a temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais elevada a que um gás pode ser convertido em um líquido por um aumento da pressão (TAYLOR, 1996).

No processo de extração pode ser usada uma grande variedade de fluidos como solventes, como pode ser observado na tabela 01, no entanto, a maioria desses compostos, tais como hidrocarbonetos leves são geralmente inflamáveis e tóxicos. Por outro lado, o dióxido de carbono é o único composto que pode ser usado como um "solvente verde" quando comparados à extração com solventes orgânicos e as propriedades críticas do CO_2 são relativamente baixas. O dióxido de carbono (CO_2) é particularmente vantajoso para o processamento de materiais alimentares, por se tratar de um gás inerte, ou seja, não reagirá com os compostos químicos presentes nos extratos (BRUNNER, 2005; TABERNERO *et al.*, 2012). Na fase crítica, não há alteração súbita das propriedades do componente, ou seja, a distinção entre as fases líquida e gasosa desaparece, o fluido supercrítico, não pode ser liquefeito através do aumento de pressão e o gás não pode ser formado com o aumento da temperatura (BRUNNER, 1994; GUIOCHON; TARAFDER, 2011).

No ambiente supercrítico existe apenas uma fase. O fluido tal como é designado não chega a ser um gás e nem um líquido, e é descrito como um intermediário entre as duas fases. Na fase supercrítica o fluido tem a densidade semelhante ao um líquido, bem como as propriedades de transporte comuns aos gases. Estas qualidades tornam fluidos supercríticos solventes eficazes e seletivos (ASKIN; OTLES, 2005). A separação fracionada dos extratos é outro conceito que pode ser útil para melhorar a seletividade do processo de extração com fluido supercrítico. Durante a extração, o soluto difunde-se à superfície da partícula; a difusão interna é modelada usando o coeficiente de difusão efetivo ou coeficiente de transferência de massa em fase sólida (SOVOVÁ, 2005).

Tabela 1. Propriedades críticas de diferentes compostos. Fonte: (TABERNERO et al., 2012).

Propriedades críticas de diferentes compostos	Tc (K)	Pc (MPa)
Amônia	405.7	11.3
Benzeno	562.2	4.9
Dióxido de Carbono	304.3	7.4
Clorotrifluormetano	384.9	3.9
Etano	305.6	4.9
Etileno	282.5	5.1
Metanol	513.7	7.9
n-Propano	367.0	4.3
Água	647.6	22.1

As propriedades críticas de uma substância pura podem variar de acordo com a interação das ligações químicas (forças intermoleculares), pois se observa na tabela 01 que moléculas com maior polaridade possuem as maiores propriedades críticas (Pc) e (Tc) (BOTELHO *et al.*, 2015). As propriedades críticas maiores (Pc) e (Tc) das substâncias polares tem a ver com as pontes de hidrogênio que por sua vez aumentam as forças de coesão entre as moléculas. Isto explica a maior dificuldade para passarem ao estado gasoso (pontos de ebulição mais altos do que os previstos).

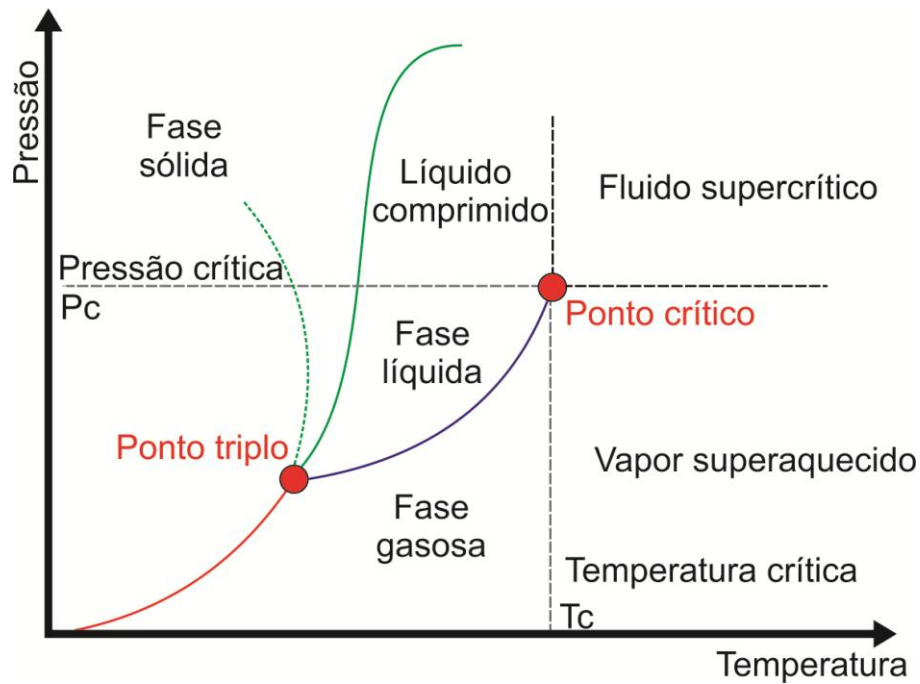


Figura 2: Diagrama de fases de uma substância pura.

O diagrama de fases de uma substância pura (figura 2) mostra a temperatura e região de pressão em que a substância ocorre como uma única fase: sólido (s), líquido (l) ou gás (g). Há três curvas que descrevem a sublimação, fusão e ebulição. As três curvas se intersectam no chamado ponto triplo (PT), em que as fases, sólida, líquida, e gasosa coexistem em equilíbrio. Pontos ao longo da curva (entre as fases) definem o equilíbrio entre as duas fases. A curva de ebulição começa no PE e termina no ponto crítico (PC).

As características das propriedades dos fluidos supercríticos podem ser alteradas numa gama ampla. O seu poder de solvente é o mais elevado para os componentes apolares ou de baixa polaridade e diminui com o aumento do peso molecular. O CO_2 , após a extração, pode ser removido de maneira simples dos solutos, através da expansão do gás à pressão ambiente (BRUNNER, 2005).

As condições de temperatura e pressão estão ligadas à solubilidade dos compostos (BOTELHO *et al.*, 2014). O controle da pressão e temperatura em fluido supercrítico são um dos parâmetros operacionais mais importantes, pois a densidade do fluido supercrítico aumenta com a pressão à temperatura constante, e diminui com a temperatura à pressão constante. A variação da densidade pode acarretar em uma possível alteração na solubilidade dos compostos presentes na matéria-prima (CLIFFORD, 1999; CARRILHO *et al.*, 2001).

A densidade, uma propriedade intensiva, é definida como a razão entre as duas propriedades extensivas massa e volume. O volume molar (V_m) de uma substância pura homogênea é inversamente proporcional à sua densidade (DEVOE, 2011).

Taylor (1996) relata que alta densidade é responsável pelo bom poder de diluição dos fluidos supercríticos, onde as interações entre as moléculas do fluido e soluto são bastante fortes. O fluido supercrítico tem propriedades hidrodinâmicas mais favoráveis do que as de líquidos porque os valores de viscosidade supercríticos são semelhantes às dos gases. A programação da densidade durante uma extração com fluido supercrítico é tão eficiente quanto à programação de temperatura em cromatografia gasosa e/ou gradiente de eluição em cromatografia líquida (CARRILHO *et al.*, 2001).

O próximo capítulo, traz os principais resultados obtidos no presente trabalho, estes por sua vez já foram publicados em revista especializada qualis A.

6 REFERÊNCIAS

ASKIN, R.; OTLES, S. Supercritical Fluids. **Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.**, v. 4, n. 1, p. 3–16, 2005.

ARRANZ, E.; JAIME, L.; LÓPEZ DE LAS HAZAS, M. C.; REGLERO, G.; SANTOYO, S. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, n. July, p. 121–129, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901500014X>>. .

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>>. .

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a05v32n3>>. .

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; et al. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 49–55, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.008>>. .

BOTELHO, J. R. S.; SANTOS, A. G.; ARAÚJO, M. E.; et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 167–171, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.006>>. .

BRUNNER, G. **Gas Extraction**. Heidelberg: Steinkopff, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21–33, 2005.

BUENO, M. R.; ALVES, G. S.; PAULA, A. D. M.; CUNHA, J. P. A. R. Volumes de calda e adjuvante no controle de plantas daninhas com glyphosate. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 705–713, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582013000300022&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

CARMO, F. M. D. S.; BORGES, E. E. D. L. E.; TAKAKI, M. Alelopátia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 697–705, 2007.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509–515, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422001000400012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

CARVALHO, A. Q. DE; CARVALHO, N. M.; VIEIRA, G. P.; et al. Intoxicação espontânea por *Senna obtusifolia* em bovinos no Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 147–152, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

CARVALHO, M. DA S. E; CARDOSO-FILHO, ; OTÁVIO; MORAIS-COSTA,; FRANCIELLEN; et al. Plantas Tóxicas: Importância Para a Pecuária: Revisão Bibliográfica. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 1, n. 1, p. 16–35, 2008. Disponível em: <<http://revistas.pucsp.br/index.php/reb/article/view/1866>>. .

CHON, S.-U.; KIM, Y.-M. Herbicidal Potential and Quantification of Suspected Allelochemicals from Four Grass Crop Extracts. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 190, n. 2, p. 145–150, 2004. Blackwell Verlag GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-037X.2004.00088.x>>. .

CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTORIA, R.; FILHO, S.; DA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1990, p. 13–20, 1994.

DANTAS, R. DE A.; CARMONA, R.; CARVALHO, A. M. DE; et al. Produção de matéria seca e controle de plantas daninhas por leguminosas consorciadas com cana-de-açúcar em cultivo orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 681–689, 2015.

DEVOE, Howard. **Thermodynamics and chemistry**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 520p, 2001.

DUART, V. M.; ADRIANA MODOLON DUART, ; TRAMONTIN, M. T.; SPANNEMBERG, R.; GARBUIO, F. J. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PRÉ EMERGÊNCIA EM SISTEMA DE SEMEADURA DE ARROZ EM SOLO SECO. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, p. 61–68, 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/1055>>. .

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, n. 8-10, p. 583–589, 2000.

FAVERO, C. .; JUCKSCH, I. .; COSTA, L. M. .; ALVARENGA, R. C. .; NEVES, J. C. L. Crescimento E Acúmulo De Nutrientes Por Plantas Espontâneas E Por Leguminosas Utilizadas Para Adubação Verde. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 171–177, 2000.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Allelopathy : an Emerging Topic in Ecophysiology. **Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. Vii, p. 175–204, 2000.

FERREIRA, E. A. .; PROCÓPIO, S. O. .; GALON, L.4; FRANCA, A.C.5; CONCENÇO, G.6; SILVA, A. A. .; et al. Weed Management in Raw Sugarcane. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 915–925, 2010.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.

Journal of Chromatography A, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.051>>. .

GARCIA, A. F. **Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias isoladas de fígado de rato**, 2009. Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/92190>>. .

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 83–92, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582015000100083&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

GUIOCHON, G.; TARAFDER, A. Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1037–1114, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.047>>..

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 416–423, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.045>>. .

KING, J. W.; SRINIVAS, K. Multiple unit processing using sub- and supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 598–610, 2009.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788–8795, 2008.

KUVA, M. A.; PITELLI, R. A.; CHRISTOFFOLETI5, P. J.; ALVES, E P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da 1,2 cana-de-açúcar. i – tiririca. , p. 241–251, 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 531p. 2000.

LARKECHE, O.; ZERMANE, A.; MENIAI, A.-H.; CRAMPON, C.; BADENS, E. Supercritical extraction of essential oil from *Juniperus communis* L. needles: Application of response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, n. February, p. 8–14, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844615000583>>. .

L.D., I. T. S.; SANTOS. Levantamento fitossociológico em pastagens degradadas sob condições de várzea. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 343–349, 2004. Disponível em: <<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SCBR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=017813>>. .

LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. Herbicide Resistance in Weeds and Crops. In: A. C. Society (Ed.); **Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**. p.336–352, 1990. InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/herbicide-resistant-weeds-the-technology-and-weed-management>>. .

LIU, B. BIN; LUO, L.; LIU, X. L.; et al. Essential oil of *syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-erk/p-creb/brain-derived neurotrophic factor expression. **Planta Medica**, v. 81, n. 3, p. 185–192, 2015.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 231–238, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042003000200011>. .

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 5, p. 539–547, 2011. WILEY-VCH Verlag. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201000455>>. .

MIRANDA, C. A. S. F. DE; CARDOSO, M. D. G.; CARVALHO, M. L. M. DE; et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alfaca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 1783, 2015. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/13230>>. .

MOHAMED, R. S. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE PRODUTOS DE OCORRÊNCIA NATURAL COM FLUIDOS SUPERCRITICOS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, p. 344–353, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000400002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A. P. S. Differences in Allelopathic Activity Patterns in Leguminosae. **Planta Daninha**, v. 28, p. 939–951, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582010000500002>. .

NDIOMU, D. P.; SIMPSON, C. F. Some Applications of Supercritical Fluid Extraction. **Analytica chimica acta**, v. 213, p. 237–243, 1988.

PEREIRA, J. R. Plantas invasoras de pastagens - curso de pecuária leiteira. Curso de pecuária leiteira. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/587080>>. Acesso em: 13/5/2016.

QUEIROZ, G. R.; RIBEIRO, R. C. L.; ROMÃO, F. T. N. M. A.; et al. Intoxicação espontânea de bovinos por *Senna obtusifolia* no estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1263–1271, 2012.

REIGOSA, M. J.; PAZOS-MALVIDO, E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 7, p. 1456–1466, 2007.

REIS, Alessandra dos Santos Belo. **Lesões traumáticas na pele causadas pelos espinhos de *Mimosa pudica* e *Mimosa debilis* em equídeos**. 2012. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

REVERCHON, E.; MARCO, I. DE. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importancia economica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38–42, 2001.

RODRIGUES, I. M. C. .; SOUZA FILHO, A. P. S. .; FERREIRA, F. A.; E DEMUNER, A. J. P rospeção Química de Senna alata Chemical Prospecting of Compounds Produced by Senna alata with Allelopathic Activity. **Planta Daninha**, v. 28, p. 1–12, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582010000100001>. .

RODRIGUEZ. Obtaining the essential oil of Syzygium aromaticum, identification of eugenol and its effect on streptococcus mutans. **Journal Oral Research**, v. 3, p. 218–224, 2014. Disponível em: <<http://www.joralres.com/index.php/JOR/article/view/104/120>>. .

SAMPIETRO, D. A. Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. **Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales “Dr. Antonio R. Sampietro” Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho On line: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopátia.htm>. Última visita**, v. 12, 2002.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442–449, 2009.

SCOPEL, R.; FALCAO, M. A.; LUCAS, A. M.; et al. Supercritical fluid extraction from Syzygium aromaticum buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 223–230, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.003>>. .

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; et al. Potencial alelopático de Myrcia guianensis. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649–656, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582006000400005&script=sci_arttext&tIng=ES>. .

SOUZA FILHO A.P.S *Alelopátia e as Plantas Daninhas da Amazônia*. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/267707664> [acessado em 15 de dezembro 2015].

SOUZA FILHO, A.P.; ALVES, S. DE M. **Alelopatia em ecossistema de pastagem cultivada**. 01 ed. Belém, 1998.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 1, p. 35–52, 2005.

SPIASSI, A.; KONOPATZKI, M. R. S.; NÓBREGA, L. H. P. Estratégias de manejo de plantas invasoras. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 01, p. 177–188, 2010. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/variascientiaagraria/article/viewArticle/3493>>. .

TABERNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M. A. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 60, p. 9–25, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.06.004>>. .

Taylor, L.T. **Properties of supercritical fluids**. In: L.T. Taylor (ed.) *Supercritical Fluid Extraction*. New York, John Wiley & Sons Inc., pp. 7-27. (1996).

TWORKOSKI, T. Herbicide effects of essential oils. **Weed Science**, v. 50, n. 4, p. 425–431, 2002.

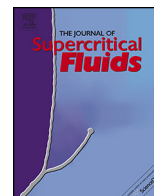
UQUICHE, E.; CIRANO, N.; MILLAO, S. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 77, n. July, p. 307–314, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901530368X>>. .

VERDEGUER, M.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOIRA, H. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 362–369, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2009.06.003>>. .

YANG, Y. C.; WEI, M. C.; HONG, S. J. Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 1323, p. 18–27, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.098>>. .

WARDLE, D. A. Allelopathic in New Zealand pasture grassland ecosystem. **NZJ Exp. Agric**, v. 15, p. 243-255, 1987.

7 CAPÍTULO 3 - ARTIGO: Chemical Composition and Phytotoxic Activity of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil Obtained with Supercritical CO₂



Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂



Mozaniel Santana de Oliveira^{a,*}, Wanessa Almeida da Costa^a, Daniel Santiago Pereira^c, José Rafael Santos Botelho^b, Tatiany Oliveira de Alencar Menezes^f, Eloisa Helena de Aguiar Andrade^d, Silvia Helena Marques da Silva^e, Antonio Pedro da Silva Sousa Filho^c, Raul Nunes de Carvalho Junior^{a,*}

^a LABEX/FEA (Faculty of Food Engineering), Federal University of Para, Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá, 66075-900, Belém, Pará, Brazil

^b Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, Pólo II, Rua Silvio Lima, 3030-790 Coimbra, Portugal

^c Laboratory of Agro-industry, Embrapa Eastern Amazon, Tv. Dr. Enéas Pinheiro S/N, Marco, 66095-100, Belém, Pará, Brazil

^d Adolpho Ducke Laboratory, Botany Coordination, Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1900, Cep: 66077-830, Belém, PA, Brasil, Brazil

^e Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Mycology, Mycology Laboratory Rodovia BR 316, km 7, S/N Levilândia, 67030-000 Ananindeua, PA, Brazil

^f School of Dentistry, Federal University of Para, Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá, 66075-900, Belém, Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2016

Received in revised form 9 August 2016

Accepted 12 August 2016

Available online 12 August 2016

Keywords:

Supercritical fluid

Allelopathy

Inhibition

Weed

Seed

Radicle

Hypocotyl

ABSTRACT

Clove (*S. aromaticum*) essential oils were obtained with supercritical CO₂ in the experimental conditions of 40 °C and 50 °C and pressures of 100, 200, and 300 bar. The oils were characterized by gas chromatography (GC) coupled to a mass spectrometer (MS). The phytotoxic effects of the fractions initially at 600 ppm were analyzed. From the results observed in the phytotoxic effect analysis, the fraction obtained in the condition of 50 °C and 300 bar was analyzed at concentration levels ranging from 200 to 800 ppm. The highest mass yield in dry basis (db) (14.49 ± 0.2%) was obtained at 50 °C and 300 bar. Over 99% of the volatile compounds were identified in clove essential oil, comprising 24 substances. In global means, 19.72% of the compounds are composed of sesquiterpene hydrocarbons, 19.79% of phenolic compounds, 0.59% of oxygenated sesquiterpenes, 59.75% of oxygenated monoterpenes, and 0.055% of other compounds. All fractions showed phytotoxic activity to inhibit seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl. The best results were shown by the extract obtained at 50 °C and 300 bar. The results showed that eugenol plays an active role as a phytotoxic-activity-promoting agent. In terms of minimum concentration to inhibit 50% and 90% of seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl, the extract obtained at 50 °C and 300 bar was the most effective.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past few decades, efforts have expanded in order to detect plant species with potential use in various human activities. Essential oils have received commercial interest primarily because of their potential herbicide, insecticide, antimicrobial, antifungal and antioxidant properties and for being of natural origin, which usually represents lower risk to the environment and human health [1–4].

Clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil is widely used in traditional medicine to treat fungal infections of the skin, mouth, urinary tract, and, more recently, for weed control [5–7]. These properties make this essential oil an alternative to agricultural practices used by producers, such as employing fire, mowing, and using of toxic chemicals, which are questionable because of the possible environmental impacts they may cause [8,9].

Studies have shown that the essential oil of clove is rich in allelochemicals with phytotoxic potential that can be used in various agricultural species [10] and [11]. In nature, allelochemicals are found in conjugated forms and are present in all plant parts such as the root, root exudates, bark, leaf, flower, and fruit [12,13], and they are known for inhibiting the growth of primary meristems of plants by causing damage to the plasma membrane [14–16].

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mozaniel.oliveira@yahoo.com.br (M.S. de Oliveira), raulncj@ufpa.br, raulncj@gmail.com (R.N. de Carvalho Junior).

Recent studies have linked the use of essential oils as promoting agents of bioherbicide activity for weed control [17–20]. Authors such as Pinheiro et al. [21] analyzed the phytotoxic effect of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* and its monoterpenes carvacrol and thymol on germination and elongation of the radicle and hypocotyl of the species *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. They observed that the oil and its monoterpenes decreased or inhibited germination and elongation of the radicle and hypocotyl of the recipient species.

Kordali et al. [22] isolated the essential oil of aerial parts of *Nepeta meyeri Benth* by hydrodistillation, and obtained an extract by steeping in *n*-hexane. The oxygenated monoterpene 4 α , 7 α , 7 β -nepetalactone was the compound found in greater concentration - above 80%. The essential oil and the hexane extract were evaluated regarding phytotoxic activity in concentration levels of 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL. The authors observed that both essential oil and the hexane extract inhibited seed germination and development of the aerial part and root of weeds *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Cirsium arvense* L. and *Sinapis arvensis* L. Other studies also report the phytotoxic activity of essential oils obtained by hydrodistillation, such as essential oils of *Carum carvi* L. seeds, rich in cavone (71.08%) and limonene (25.42%), which inhibited the seed germination and elongation of the radicle [23].

The essential oils of aromatic plants are mainly extracted by hydrodistillation and organic solvents [24,25]. However, there may be some loss of volatiles by thermal degradation of insaturations or hydrolysis, and the use of organic solvents may leave toxic residues in the extract [26]. To avoid possible sensory loss or contamination by toxic solvents, some authors use most efficient separation techniques, such as supercritical CO₂ extraction [27].

The first steps to perform the supercritical fluid extraction (SFE) of essential oils involve optimizing the temperature and pressure conditions, which lead to efficient recovery of terpenic compounds. These compounds are responsible for aroma and help avoid the co-extraction of fatty acids and their methyl esters [28,29].

In Brazil, there are few studies about the potentially phytotoxic activity of oils obtained with supercritical CO₂, and in the Brazilian Amazon, the first report was the article of Batista et al. [30], who evaluated the allelopathic activity of fatty acids obtained from acai (*Euterpe oleracea*) on weeds *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*, and verified two types of effect: phytotoxic and stimulatory. These weeds, *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*, are reported as harmful to field livestock. Articles report that *S. obtusifolia* cause poisoning in animals and can lead them to death [31]. *M. pudica* cause injuries by its thorns on the animals skin and oral mucosa, which cause great economic losses due to the cost of treatments often prolonged.

On these aspects, the plants can provide perspectives that can add up numerous possibilities for exploration of secondary metabolites that can help agriculture. The use of supercritical CO₂ can be an alternative to obtain metabolites with potentially phytotoxic activity, and allelopathy has been shown as an alternative for agricultural practices currently in use for the weed control.

Given the above, this study aims to obtain different fractions of clove essential oil with supercritical CO₂ in order to characterize and evaluate its phytotoxic activity against Amazonian weeds *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and characterization of raw material

Clove samples were purchased in the Ver-o-peso market in the city of Belém (Brazil) on June 5th, 2015. The samples were ground in a knife mill (Tecnal, model TE-631/3, Brazil) with velocity of 2,251.5 rad/s for 10 s. The samples used in the experiments

were selected in the range of 20–35 mesh. Moisture content was determined by distillation with xylene (Ecibra, PA-ACS, São Paulo, Brazil) [32]. The true density of the particles was determined using a helium pycnometer at the Analytical Center of the Chemistry Institute of the University of Campinas (Unicamp).

2.2. Extraction procedures: supercritical CO₂ (SC-CO₂) extraction

SFE was performed using a Spe-ed™ SFE system (model 7071, Applied Separations, Allentown, PA, USA) coupled to a compressor (model CSA 7.8, Schulz S/A, Joinville, Brazil), a CO₂ tank (99.9% purity, White Martins, Belém, PA, Brazil), a recirculator (model F08400796, Polyscience, Nilles, Illinois, USA), and a CO₂ flow meter at the outlet (model M 5SLPM, Alicat Scientific system, Tucson, AZ, USA). The extractions were performed in triplicate. Global yield isotherms were determined using 30 g of ground *S. aromaticum*. The temperatures used were 40 °C and 50 °C while pressures used were 100, 200, and 300 bar according to what was proposed by Guan et al. [33] CO₂ was used at a constant mass flow rate of 8.85×10^{-5} kg/s.

Extraction was performed in two steps: a static period (when the supercritical CO₂ was in the extraction vessel with the sample and the outlet valve was closed) of 1800 s and a dynamic period (when the outlet valve was open and the system was in semi-continuous operation) of 7200 s. After the static period, the system was opened and the oil and CO₂ were continuously released into a closed container in an ice bath to avoid volatilization of the compounds. The schematics of the extraction unit is shown in Fig. 1. The global yield was calculated as the ratio of the oil mass obtained and the initial mass of the raw material used for *S. aromaticum* extraction in dry basis (db). The densities of supercritical CO₂ were calculated using the software *TermoDi* that use the Peng-Robinson cubic equation of state [34], developed by the Laboratory of Physical Separations (LASEFI) of the University of Campinas (Brazil).

2.3. Analysis of volatile compounds

The chemical composition of clove essential oils was obtained by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS), according to the literature [35,36], using a QP 2010 Shimadzu system equipped with an AOC-20i auto injector, Rtx-5MS silica capillary column (30 m \times 0.25 mm, film thickness of 0.25 μ m) at temperatures ranging from 60 °C to 250 °C, with a gradient of 3 °C/min and injector temperature of 250 °C; helium as carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min (measured at 100 °C), splitless injection (solution of 2 μ L of oil in 1000 μ L of hexane), electron impact of 70 eV, and ion source temperature of 200 °C. The compounds were identified based on retention indices, which are determined by the compounds' retention time in a homologous series of hydrocarbons (C8–C20), comparing their mass spectra with those in the literature [37] and on the NIST database [38].

2.4. Bioassays

Phytotoxic activities were evaluated in two bio indicators, which are weeds of common pasture areas in the Amazon region: *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*. The assays were carried out in the Agro-Industry Laboratory at Embrapa Eastern Amazon (Belém, PA, Brazil). The phytotoxic effects were analyzed regarding percentage of seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl. The seeds were collected in degraded cultivated pastures in the city of Terra Alta, PA and underwent a cleaning process. In order to break dormancy, the seeds were treated by immersion in concentrated sulfuric acid for 15 min.

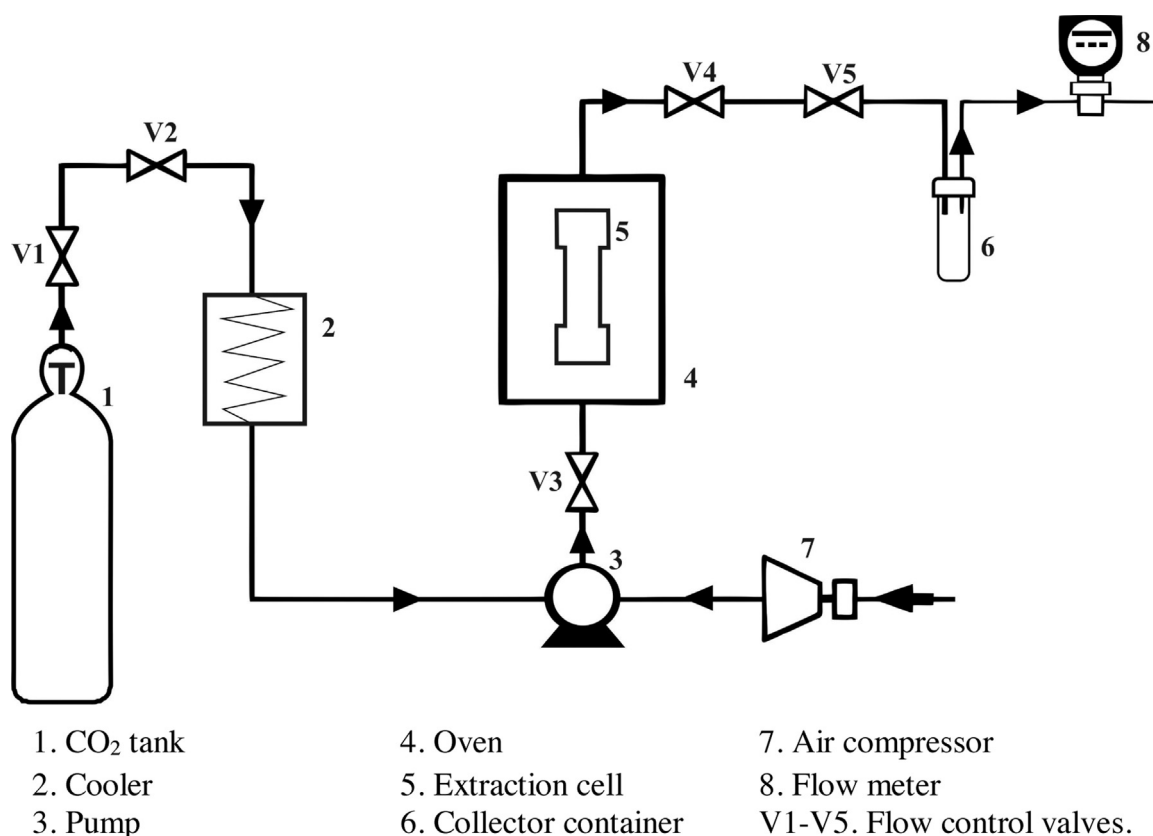


Fig. 1. Schematics of the SFE unit.

2.5. Germination

Bioassays were performed as proposed by Batista et al. [30] A BOD-type chamber was adapted with controlled conditions of 25 °C and 12 h photoperiod and was extensively monitored for three days, including daily counts and elimination of sprouted seeds. Germinated seeds were considered to be those that had radicle length of 2 mm. Each Petri dish 9.0 cm in diameter was lined with qualitative filter paper, to which the test solutions were added only once at the beginning of bioassays. 3 mL of the test solutions diluted in *n*-hexane were used. After total evaporation of the solvent, 2.5 mL of distilled water were added. Then, 20 seeds of each target species *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia* were added to each Petri dish.

2.6. Elongation of the radicle and hypocotyl

Elongation of the radicle and hypocotyl was also analyzed in BOD-type chambers at constant temperature of 25 °C and 24 h photoperiod. Each Petri dish 9.0 cm in diameter was lined with filter paper and received 3.0 mL of the test solution [30]. The essential oils were tested at the same concentrations employed in the germination bioassays. After evaporation of the solvent, 3 mL of distilled water were added, thereby maintaining the original concentration. The test solutions were added only once at the beginning of bioassays and from then on only distilled water was added whenever needed for seedling maintenance.

In each plot, three pre-germinated seeds were arranged for three days. At the end of the seven-day growth period, the radicle and hypocotyl lengths were measured. The control treatment received only distilled water [30]. In all bioassays, essential oils and eugenol standard were tested at 600 ppm diluted in *n*-hexane. The minimum concentrations to inhibit 50% and 90% (IC₅₀ and IC₉₀) of germination and elongation of the radicle and hypocotyl

were obtained by testing concentration levels of 200, 400, 600, and 800 ppm (v/v) of the essential oil fraction with the best results in bioassays and the secondary metabolite eugenol. All assays were performed in triplicate. The eugenol standard was purchased from Sigma-Aldrich (Reagent Plus®, 99% purity).

2.7. Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design was employed with four replications. The data obtained in the quantitative analysis were analyzed with the help of the softwares Minitab 17 and Excel using analysis of variance (ANOVA) and the comparisons between means were performed by Tukey's test (5%). The best response obtained was analyzed by regression compared with eugenol, which is the main quantity component of the oils, with the purpose of determining the IC₅₀ and IC₉₀ doses.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the raw material

The mean moisture of *S. aromaticum* was 3.0% (db). The average particle diameter was 0.6375 mm and the true density was 1.39 ± 0.01 g/cm³. It is important to highlight that, during *S. aromaticum* grinding, essential oil losses can occur. High knife mill temperature results in a type of mechanical extraction, which causes clove oil volatilization and may result in mass global yield losses at the end of extractions. The best way to stop such losses would be grinding small amounts of material at a time and to always monitor the temperature of the mill.

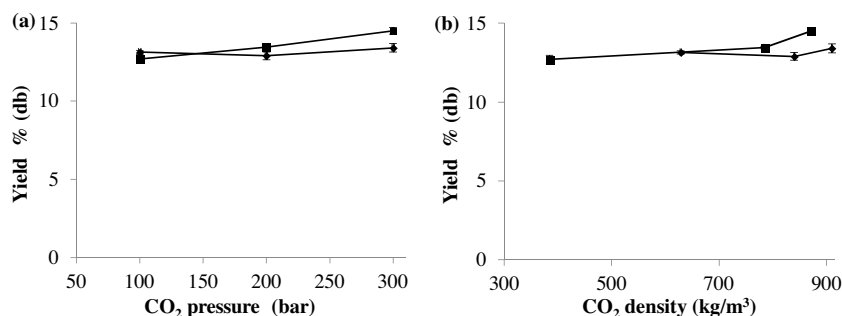


Fig. 2. Global yield isotherms of clove (*S. aromaticum*) extraction performed with supercritical CO₂. Yields expressed in dry basis (db), (◆) 40 °C and (■) 50 °C.

3.2. Yield isotherms

The density of the supercritical fluid and solute vapor pressure are factors that determine the mass yield at the end of the extraction process [39]. Experimentally, it is observed in Fig. 2(a) that, at 40 °C/100 bar, the oil yield is higher than at 50 °C/100 bar: $13.14 \pm 0.1\%$ (db) and $12.70 \pm 0.27\%$ (db), respectively, and in this case, the effect of supercritical CO₂ density prevails. An inflection point is observed at approximately 150 bar, also known as retrograde condensation. In the experimental conditions above the inflection point, the highest yields – $13.45 \pm 0.07\%$ (db) and $14.49 \pm 0.2\%$ (db) – were obtained at the 50 °C isotherm, where the solute vapor pressure prevails (see the Supplementary material S1). The retrograde condensation phenomenon was also reported in the article of Scopel et al. [40], which analyzed the global yields of clove essential oil obtained at the 40 °C isotherm. Souza et al. [29] report that the system CO₂ + clove oil exhibited transitions of the type liquid-vapor at 40.1 °C, 45.4 °C and 55.1 °C, liquid-liquid at 30.1 and 35 °C, and liquid-liquid-vapor at 30.1 and 35.1 °C. These transitions can change the oil yield and the chemical composition.

3.3. Chemical composition

The density of SC-CO₂ also influenced the composition of clove essential oils. The compounds extracted were qualitatively similar. In quantitative terms, the compounds at the highest concentrations in the different essential oil fractions are eugenol, eugenol acetate, (*E*)-caryophyllene, and α -humulene Table 1. The extraction conditions yielded clove essential oil fractions while avoiding co-extraction of other substances such as fatty acids and compounds of higher polarity, which shows that the technique is selective [41,42].

Over 99% of the volatile compounds in the clove essential oil (composed of 24 substances) were identified. In global mean, 19.72% of the compounds were sesquiterpene hydrocarbons, 19.79% were phenolic compounds, 0.59% were oxygenated sesquiterpenes, 59.75% were oxygenated monoterpenes, and 0.05% were other compounds Table 1. The structural formula of the main chemical compounds identified in the oils is shown in Fig. 3. The aliphatic hydrocarbons *n*-tridecane and hexadecane were identified only in the essential oils obtained in operating conditions EO2 and EO4, respectively, and the sesquiterpene compound (*E*, *E*)- α -farnesene was identified only in condition EO3 Table 1. (The

Table 1
Volatiles identified in clove (*Sizygium aromaticum*) essential oils.

RI ^a	Constituents	EO1	EO2	EO3	EO4	EO5	EO6
1194	Methyl salicylate		0.04				
1252	Chavicol	0.08	0.14	0.16		0.16	0.17
1301	Tridecane		0.01				
1365	Eugenol	62.88	60.42	58.77	57.12	58.70	60.61
1384	α -copaene	0.17	0.24	0.32	0.37	0.33	0.28
1430	(<i>E</i>)-caryophyllene	15.60	16.19	16.73	17.05	17.13	17.00
1461	α -humulene	1.86	2.24	2.47	2.62	2.45	2.27
1483	γ -muurolene		0.05	0.06	0.07	0.06	0.05
1488	Germacone D	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03	0.01
1501	α -selinene		0.03	0.05	0.07	0.05	0.03
1505	(<i>E,E</i>)- α -Farnesene				0.01		
1511	β -Bisabolene	0.14	0.19	0.24	0.29	0.24	
1512	γ -cadinene			0.02	0.03	0.02	0.19
1516	δ -cadinene	0.10	0.15	0.18	0.21	0.18	0.15
1529	(<i>Z</i>)- γ -Bisabolene				0.02		
1538	Eugenol acetate	18.69	19.54	20.15	21.20	19.84	18.61
1542	Dihydro-eugenol acetate		0.01				
1587	Caryophyllene oxide	0.34	0.49	0.61	0.69	0.59	0.47
1602	Hexadecane				0.01		
1613	Humulene epoxide II		0.02	0.03	0.04	0.03	0.02
1679	Germacone-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol		0.03	0.05	0.05	0.05	0.03
1774	Benzyl benzoate	0.03	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05
	Sesquiterpene hydrocarbons	17.90	19.11	20.09	20.78	20.49	19.98
	Phenolic compounds	18.77	19.73	20.31	21.2	20.00	18.78
	Oxygenated sesquiterpenes	0.34	0.54	0.69	0.78	0.67	0.52
	Oxygenated monoterpenes	62.88	60.42	58.77	57.12	58.7	60.61
	Other compounds	0.03	0.06	0.06	0.07	0.06	0.05
	Total	99.92	99.86	99.92	99.95	99.92	99.94

^a EOs (Essential Oils); (EO1) 40 °C/100 bar; (EO2) 40 °C/200 bar; (EO3) 40 °C/300 bar; (EO4) 50 °C/100 bar; (EO5) 50 °C/200 bar; (EO6) 50 °C/300 bar. RI - Retention indices on Rtx-5MS.

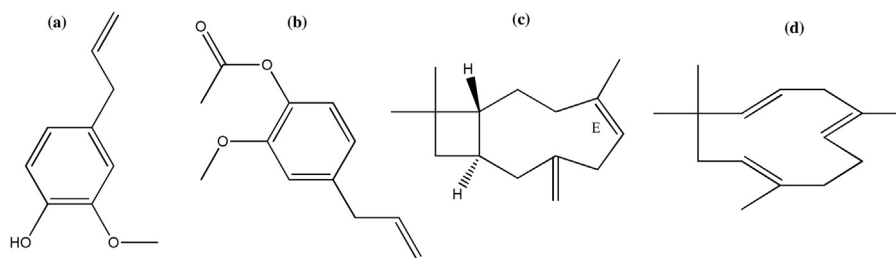


Fig. 3. Structural formulas of the main compounds identified in the essential oils of clove (*S. aromaticum*) obtained using CO₂ in supercritical phase. (a) Eugenol; (b) Eugenol acetate; (c) (E)-caryophyllene; (d) α -humulene.

chromatograms of the chemical profiles can be analyzed in the Supplementary material S2).

Rivera et al. [43] analyzed the chemical composition of clove essential oil obtained by hydrodistillation and observed concentrations of 66.9, 24.8, 3.1 and 2.7% of eugenol, (E)-caryophyllene, α -humulene and eugenol acetate, respectively. In another study using hydrodistillation for clove essential oil extraction, eugenol appears again as the main component 79.4%, followed by isocaryophyllene 7.0% and eugenol acetate 9.2% [44]. In both cases, the values of eugenol content was higher than that found in the present study, however, other compounds were obtained in lower concentrations as is the case of eugenol acetate. The hydrodistillation does not enable the obtainment of different fractions of essential oils of the same raw material, unlike the supercritical CO₂, which depending on the operating conditions of temperature and pressure, the characteristics of the oil can change as can be seen in Table 1.

The various combinations of pressure and temperature used to extract clove essential oils enabled obtaining non-polar compounds, formed mostly by oxygenated monoterpenes.

3.4. Phytotoxic effects

Some factors must be taken into account when evaluating the phytotoxic effect of crude extracts, such as the effect of the osmotic potential. In phytotoxic activity bioassays, the osmotic potential may have additive effects, leading to overestimation of the phytotoxic effects. This becomes more important at higher concentrations. For the present case, this issue was disregarded in view of the articles of [45–47].

The different fractions of clove essential oils showed strong inhibitory effects on germination and elongation of the radicle and hypocotyl of *M. pudica* and *S. obtusifolia*. The inhibitory effects on germination varied according to the oil fraction tested and target species. Overall, EO6 was the fraction with the most intense inhibition against seed germination (92.3%), followed by fractions EO2, EO3, and EO5, with global means above 82% inhibition Table 2.

For radicle elongation, similar effects to those on seed germination were observed, although at slightly higher magnitude. Overall, the different essential oil fractions promoted inhibition always

Table 2

- Mean values and standard deviation of the phytotoxic effects on germination and elongation of the radicle and hypocotyl of *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia*, arranged according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Data expressed as inhibition percentage regarding the control treatment.

Germination (%)			
Essential oil	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>	Global Mean
EO1	85.2 ± 1.2 [Ca]	84.1 ± 0.7 [Ba]	84.7 ± 0.7 [C]
EO2	89.3 ± 0.5 [Ba]	89.6 ± 0.6 [Aa]	89.4 ± 0.2 [A]
EO3	87.9 ± 1.5 [Ba]	89.8 ± 1.0 [Aa]	88.9 ± 1.3 [B]
EO4	84.8 ± 0.0 [Ca]	80.4 ± 0.3 [Cb]	82.6 ± 3.1 [D]
EO5	93.5 ± 0.4 [Aa]	90.2 ± 0.6 [Ab]	91.9 ± 2.3 [A]
EO6	94.5 ± 0.5 [Aa]	90.0 ± 1.0 [Ab]	92.3 ± 3.2 [A]
Eugenol	69.3 ± 1.1 [Da]	78.3 ± 1.0 [Cb]	73.8 ± 6.3 [F]
Global Mean	86.4 ± 8.4 [a]	86.1 ± 5.0 [a]	86.2 ± 0.2
Elongation of the radicle (%)			
Essential oil	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>	Global Mean
EO1	90.4 ± 0.6 [Aa]	80.6 ± 0.2 [Cb]	85.5 ± 6.9 [B]
EO2	90.4 ± 0.6 [Aa]	85.8 ± 0.4 [Bb]	88.1 ± 3.2 [A]
EO3	90.3 ± 0.6 [Aa]	84.2 ± 1.6 [Bb]	87.2 ± 4.2 [A]
EO4	87.8 ± 0.7 [Bb]	91.0 ± 0.9 [Aa]	89.4 ± 2.2 [A]
EO5	87.6 ± 1.3 [Bb]	90.5 ± 1.0 [Aa]	89.1 ± 2.0 [A]
EO6	87.7 ± 0.8 [Bb]	91.1 ± 0.8 [Aa]	89.4 ± 2.4 [A]
Eugenol	77.0 ± 0.8 [Cb]	79.0 ± 0.9 [D]	78.0 ± 1.4 [C]
Global Mean	87.3 ± 4.7 [a]	86.0 ± 5.0 [a]	86.6 ± 0.9
Elongation of the hypocotyl (%)			
Essential oil	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>	Global Mean
EO1	90.7 ± 0.3 [Aa]	85.3 ± 0.5 [Db]	88.0 ± 3.8 [A]
EO2	90.4 ± 0.4 [Aa]	86.3 ± 1.1 [BCDb]	88.4 ± 2.9 [A]
EO3	90.4 ± 1.0 [Aa]	87.3 ± 0.5 [ABCb]	88.8 ± 2.1 [A]
EO4	88.3 ± 0.3 [Ba]	87.9 ± 0.2 [ABa]	88.1 ± 0.2 [A]
EO5	88.4 ± 0.4 [Ba]	88.3 ± 0.5 [ABa]	88.3 ± 0.1 [A]
EO6	88.7 ± 0.2 [Ba]	88.9 ± 0.0 [Aa]	88.8 ± 0.1 [A]
Eugenol	80.5 ± 0.7 [Ca]	85.8 ± 1.0 [CDB]	83.1 ± 3.7 [B]
Global Mean	88.2 ± 3.5 [a]	87.1 ± 1.3 [a]	87.6 ± 0.7

*Means followed by the same capital letters in the column and the same small letters on the row do not differ by Tukey's test, [62], ($P > 0.05$).

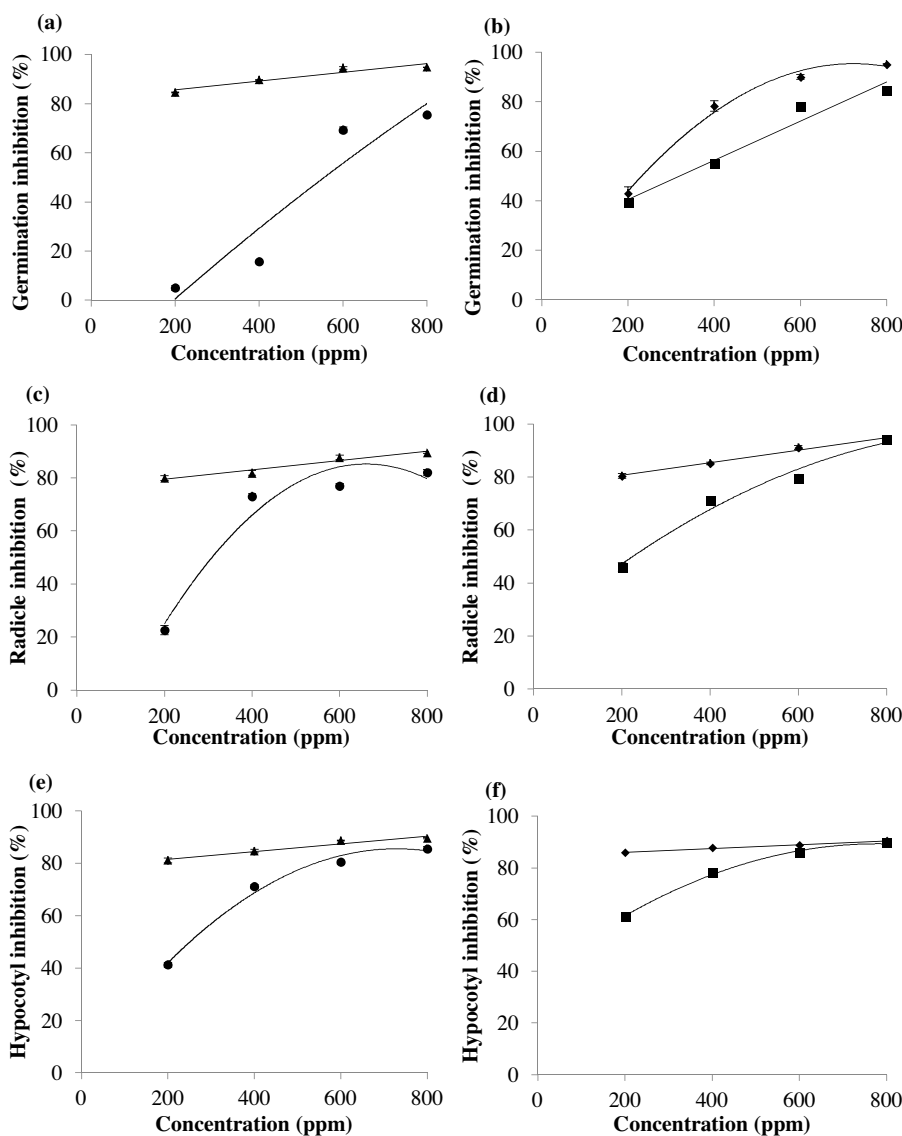


Fig. 4. Regression of the phytotoxic effects of clove essential oil on seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl of *Mimosa pudica* and *Senna obtusifolia* analyzed at 200, 400, 600 and 800 ppm. Data expressed in percentage of inhibition compared to the control treatment. (▲) EO6 vs. *M.pudica*; (●) Eugenol vs. *M.pudica* / (◆) EO6 vs. *S. obtusifolia*; (■) Eugenol vs. *S. obtusifolia*.

above 84%, particularly EO6, which was the most active with inhibition of 89.4%, followed by EO4 and EO5 with inhibitions around 89%. Similarly, intense phytotoxic effects on hypocotyl elongation of the two weed species were observed, with inhibitions always above 88%. As noted, for germination and elongation of the radicle, fraction EO6 was slightly ahead of the others, although no statistical difference was observed for some fractions ($p > 0.05$) Table 2.

The intense inhibitory effects caused by the different fractions and small quantitative differences among them are attributed to small variations in the chemical composition of each fraction Table 1. This indicates that the established isotherms were not able to promote large variations in quantitative composition of the fractions. The main compound in the fractions was eugenol. The effect caused by this compound on germination and elongation of the radicle and hypocotyl was expressive, always above 65%. However, as expected, the effect had lower magnitude than those shown by the oil fractions. The information available in the literature reports that eugenol is an important agent to promote phytotoxicity in various plants [15,48–50] and has proved to have great potential for use in cultivation strategy and weed control [51].

Thus, many of the effects caused by different fractions of clove essential oil can be attributed to eugenol. However, this does not rule out participation, to a lesser extent, of other components present in the fractions, such as γ -cadinene, even if its presence in the fractions was low Table 1. This sesquiterpene is considered an allelochemical and has been shown to have phytotoxic activity [52]. For the other components identified in the fractions, no references were found regarding their phytotoxic potential, although it is recognized that essential oils consisting mainly of sesquiterpenes with ketone or hydroxyl groups have more intense inhibition activities than those without these functional groups, which also happens with essential oils that have monoterpenes and oxygenated monoterpenes [53,54]. In this research, eugenol and eugenol acetate exhibit such characteristics.

In order to determine IC_{50} and IC_{90} , the essential oil extracted under condition EO6, which showed the greatest magnitude inhibitions, and eugenol were analyzed at concentrations from 200 to 800 ppm. The results Fig. 4(a–f) indicate that the phytotoxic effects varied positively with concentration (see the Supplementary material S3–S5). The trend observed for variations as a function

Table 3

Values for the minimum concentrations to inhibit 50% and 90% of seed germination and elongation of the radicle and hypocotyl.

Germination	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>
EO6		
IC ₅₀	< 200 ppm	235 ppm
IC ₉₀	450 ppm	700 ppm
Regression	$\blacktriangle y = 0.0179x + 82.022$ $R^2 = 0.9037$	$\blacklozenge y = -0.0002x^2 + 0.2728x - 3.1496$ $R^2 = 0.9911$
Eugenol		
IC ₅₀	560 ppm	320 ppm
IC ₉₀	> 800 ppm	> 800 ppm
Regression	$\bullet y = -3E-05x^2 + 0.1604x - 30.492$ $R^2 = 0.8958$	$\blacksquare y = 0.0795x + 24.513$ $R^2 = 0.9594$
Elongation of the Radicle	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>
EO6		
IC ₅₀	< 200 ppm	800 ppm
IC ₉₀	< 200 ppm	580 ppm
Regression	$\blacktriangle y = 0.0174x + 76.086$ $R^2 = 0.9501$	$\blacklozenge y = 0.0236x + 75.952$ $R^2 = 0.9854$
Eugenol		
IC ₅₀	275 ppm	230 ppm
IC ₉₀	225 ppm	> 800 ppm
Regression	$\bullet y = -0.0003x^2 + 0.3751x - 38.657$ $R^2 = 0.9499$	$\blacksquare y = -7E-05x^2 + 0.1424x + 21.377$ $R^2 = 0.9791$
Elongation of the Hypocotyl	<i>M. pudica</i>	<i>S. obtusifolia</i>
EO6		
IC ₅₀	200 ppm	< 200 ppm
IC ₉₀	800 ppm	800 ppm
Regression	$\blacktriangle y = 0.0147x + 78.664$ $R^2 = 0.9484$	$\blacklozenge y = 0.0075x + 84.457$ $R^2 = 0.991$
Eugenol		
IC ₅₀	270 ppm	225 ppm
IC ₉₀	800 ppm	800 ppm
Regression	$\bullet y = -0.0002x^2 + 0.2266x + 2.9274$ $R^2 = 0.9887$	$\blacksquare y = -8E-05x^2 + 0.1292x + 38.969$ $R^2 = 0.9969$

*Values calculated from the linear and quadratic regression equations [63].

of concentration points to a linear effect for the inhibition promoted by fraction EO6 and a quadratic effect for eugenol, except for the variations observed in the germination of seeds of both weeds. Regarding IC₅₀ and IC₉₀ of germination and elongation of the radicle and hypocotyl, variable response trends were observed Table 3. *M. pudica* and *S. obtusifolia* showed different responses to established levels for EO6 and eugenol. *M. pudica* was more sensitive to the effects of fraction EO6 on seed germination, i.e., a lower concentration was needed to inhibit the germination of 50% and 90% of *M. pudica* seeds than of *S. obtusifolia* seeds. Eugenol was more efficient to inhibit the germination of 50% of *S. obtusifolia* seeds. For 90% germination inhibition, no differences were observed between the two weeds.

For elongation of the radicle and hypocotyl, the same trend was observed for fraction EO6 to reach IC₅₀ and IC₉₀. For eugenol, the trend was for a smaller concentration to be required to inhibit 50% of radicle elongation of *S. obtusifolia*. To inhibit 90%, eugenol concentration was the same against the two weed species.

The phytotoxic activity of a given allelochemical agent is dependent, first of all, on its concentration and on the response limit of the target species. Two types of responses are expected. At low concentration, allelochemicals tend to have stimulatory effects and, at high concentrations, they tend to have inhibitory effects [55–57]. Batista et al. [30] observed the same trend in a similar study developed with acai extracts.

In general, essential oils have strong phytotoxic activity, being an alternative for use as bioherbicides [58–61]. In this study, even at 200 ppm, the results were always inhibitory, which suggests that stimulatory effects would likely be viable at even lower concentrations.

Weeds may severely limit the economic and productive development of agriculture in the tropics, thus controlling these species is crucial to the success of agricultural enterprises. These plants represent the main component in the maintenance costs of cultivated pastures. Among the weed species that infest cultivation areas, broadleaf ones stand out, especially those of the Fabaceae (*Leguminosae*) family, as is the case of *M. pudica* and *S. obtusifolia*. The effects caused by clove essential oil fractions, especially fraction EO6, and their main component, eugenol, are of great importance to cultivation strategy and control of these species.

The high inhibitory effects on germination hinder the growth of new individuals in cultivated areas, thus reducing the density of species in these areas. The reductions observed in elongation of the radicle and hypocotyl impairs the competitive ability of weeds. The result is areas with lower density of weeds, which favors the desirable species.

4. Conclusions

The highest mass yield was achieved at 50 °C and 300 bar. It was shown that the oils' quantitative chemical composition feature mainly eugenol, E-caryophyllene, eugenol acetate, and α -humulene, with eugenol being obtained at the highest concentrations in all essential oil fractions analyzed. All essential oil fractions had phytotoxic effect against both *M. pudica* and *S. obtusifolia* invasive plant species. The highest phytotoxic effects on germination were observed for fractions EO6 and EO5. Overall, phytotoxic effects on elongation of the radicle and hypocotyl were observed for EO6 and all other fractions. The results of this study showed that eugenol is responsible for the phytotoxic activity of

clove essential oil. In terms of the minimum concentration to inhibit 50% and 90% of seed germination and elongation of the hypocotyl and radicle, EO6 was more effective compared to eugenol.

In all variables analyzed, no stimulatory effects were observed. With the results obtained in this study, it can be inferred that the essential oil of *S. aromaticum* can act as a source of compounds with bioherbicide action for weed control in cultivation areas. This is the first report of bioherbicide action of clove essential oils obtained with supercritical CO₂ extraction against invasive plant species *M. pudica* and *S. obtusifolia*.

Acknowledgements

M. S. Oliveira thanks CNPq - PROPESP/UFPA - Brazil for the master's degree scholarship, W. A. Costa thanks CAPES - Brazil for the doctorate scholarship, and J. R. S. Botelho thanks CNPq - Brazil for the doctorate scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.010>.

References

- [1] D.D. Jayasena, J. Cheorun, Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 34 (2013) 96–108.
- [2] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya, Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole), *Parasitol. Res.* 112 (2013) 69–76.
- [3] J.L. Ríos, M.C. Recio, Medicinal plants and antimicrobial activity, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 80–84.
- [4] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999) 985–990.
- [5] M.S.A. Khan, I. Ahmad, Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*, *J. Ethnopharmacol.* 140 (2012) 416–423.
- [6] O.E. Rodríguez, R.M. Sánchez, M.J. Verde, M.A. Núñez, R. Castro, A. Chávez, Obtaining of the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*, *J. Oral Res.* 3 (2014) 218–224.
- [7] Q.L. Bin-Bin Liu, Liu Luo, Xiao-Long Liu, Di Geng, Cheng-Fu Li, Shao-Mei Chen, Xue-Mei Chen, Li-Tao Luo, Essential oil of *Syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-ERK/p-CREB/brain-derived neurotrophic factor expression, *Planta Med.* 81 (2015) 185–192.
- [8] T.K. Gitsopoulos, P. Chatzopoulou, I. Georgoulas, Herbicidal effects of *Satureja hortensis* L. and *Melissa officinalis* L. essential oils on germination and root length of *Lolium rigidum* L. and *Phalaris brachystachys* L. grass weeds, *Hell. Plant Prot. J.* 6 (2013) 49–54.
- [9] K. Suresh Kumar, H.U. Dahms, J.S. Lee, H.C. Kim, W.C. Lee, K.H. Shin, Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104 (2014) 51–71.
- [10] S.L.F. Meyer, D.K. Lakshman, I.A. Zasada, B.T. Vinyard, D.J. Chitwood, Phytotoxicity of clove oil to vegetable crop seedlings and nematotoxicity to root-knot nematodes, *Horttechnology* 18 (2008) 631–638.
- [11] A. Stoklosa, R. Matraszek, M.B. Isman, M.K. Upadhyaya, Phytotoxic activity of clove oil, its constituents, and its modification by light intensity in broccoli and common lambsquarters (*Chenopodium album*), *Weed Sci.* 60 (2012) 607–611.
- [12] T.L. Weir, S.W. Park, J.M. Vivanco, Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004) 472–479.
- [13] Z.A. Cheema, Application of Allelopathy in Crop Production: Success Story from Pakistan, in: *Allelopathy*, 1st ed., Heidelberg, 2013: p. pp 113–143.
- [14] F.A. Einhellig, Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy, in: *ACS Symp Ser.*, Southwest city, 1995, pp. 96–116.
- [15] L.D. Bainard, M.B. Isman, M.K. Upadhyaya, Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol and the role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to the... Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol, *Weed Sci.* 54 (2009) 833–837.
- [16] T. Tworokski, Herbicide effects of essential oils, *Weed Sci.* 50 (2002) 425–431.
- [17] X. Zhu, C. Han, T. Gao, H. Shao, Chemical composition, phytotoxic and antimicrobial activities of the essential oil of *Scutellaria strigillosa* Hemsley, *J. Essent. Oil Bear. Plants* 19 (2016) 664–670.
- [18] K. Polatoğlu, Ö.C. Karakoç, N. Gören, Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae), *Ind. Crops Prod.* 51 (2013) 35–45.
- [19] A. Grichi, Z. Nasr, M.L. Khouja, Phytotoxic Effects of Essential Oil from *Eucalyptus lehmanii* against Weeds and its Possible Use as a Bioherbicide, 5 (2016), 17–23.
- [20] J.M.S. Faria, I. Sena, C. Moiteiro, R.N. Bennett, M. Mota, A. Cristina Figueiredo, Nematotoxic and phytotoxic activity of *Satureja montana* and *Ruta graveolens* essential oils on *Pinus pinaster* shoot cultures and *P. pinaster* with *Bursaphelenchus xylophilus* in vitro co-cultures, *Ind. Crops Prod.* 77 (2015) 59–65.
- [21] P.F. Pinheiro, A.V. Costa, T.D.A. Alves, Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 8981–8990.
- [22] S. Kordali, A. Tazegul, A. Cakir, Phytotoxic effects of *Nepeta meyeri* Benth. Extracts and essential oil on seed germinations and seedling growths of four weed species, *Rec. Nat. Prod.* 9 (2015) 404–418.
- [23] A.K.A.H.S.A. Marichali, K. Hosni, S. Dallali, S. Ouergemmi, H. Bel Hadj Ltaief, S. Benzarti, Allelopathic effects of *Carum carvi* L. essential oil on germination and seedling growth of wheat maize, flax and canary grass, *Allelopath. J.* 34 (2014) 81–94.
- [24] M.N.I. Bhuiyan, Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston), *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6 (2012) 1260–1263.
- [25] N. Erkan, G. Ayranci, E. Ayranci, Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, *Food Chem.* 110 (2008) 76–82.
- [26] M.Z. Ozel, H. Kaymaz, Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1127–1133.
- [27] S.R.S. Ferreira, Z.L. Nikolov, L.K. Doraiswamy, M.A. a. Meireles, A.J. Petenate, Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil, *J. Supercrit. Fluids* 14 (1999) 235–245.
- [28] G. Della Porta, R. Taddeo, E. D'Urso, E. Reverchon, Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO₂ extraction, *LWT - Food Sci. Technol.* 31 (1998) 454–460.
- [29] A.T. Souza, M.L. Corazza, L. Cardozo-Filho, R. Guirardello, M.A.A. Meireles, Phase equilibrium measurements for the system clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂, *Chem. Eng. Data* 49 (2004) 352–356.
- [30] C.C.R. Batista, M.S. De Oliveira, M.E. Araújo, A.M.C. Rodrigues, J.R.S. Botelho, A.P.S. Souza Filho, N.T. Machado, R.N. Carvalho, Supercritical CO₂ extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp, *J. Supercrit. Fluids* 107 (2015) 364–369.
- [31] S.M. Yagi, S. El Tigani, S.E.I. Adam, Toxicity of *Senna obtusifolia* fresh and fermented leaves (kawal), *Senna alata* leaves and some products from *Senna alata* on rats, *Phyther. Res.* 12 (1998) 324–330.
- [32] J.R.S. Botelho, A.G. Santos, M.E. Araújo, M.E.M. Braga, W. Gomes-Leal, R.N. Carvalho Junior, M.A.A. Meireles, M.S. Oliveira, Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects, *J. Supercrit. Fluids* 98 (2015) 167–171.
- [33] W. Guan, S. Li, R. Yan, S. Tang, C. Quan, Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods, *Food Chem.* 101 (2007) 1558–1564.
- [34] D.-Y. Peng, D.B. Robinson, A new two-constant equation of state, *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 15 (1976) 59–64.
- [35] M. Das Gracas Bichara Zoghbi, R.A. Pereira, G.D.S.L. Do Socorro Luz De Lima, M. De Nazare Do Carmo Bastos, Variation of essential oil composition of *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) from two Sandbank Forests, North of Brazil, *Quim. Nova.* 37 (2014) 1188–1192.
- [36] A.F. Ribeiro, E.H.A. Andrade, F.R.G. Salimena, J.G.S. Maia, Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth, *Biochem. Syst. Ecol.* 55 (2014) 249–259.
- [37] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- [38] S. Stein, D. Mirokhin, D. Tchekhovskoi, G. Mallard, A. Mikaiia, V. Zaikin, D. Sparkmann, The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, US, 2002.
- [39] R.N. Carvalho, L.S. Moura, P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. Supercrit. Fluids* 35 (2005) 197–204.
- [40] R. Scopel, M.A. Falcão, A.M. Lucas, R.N. Almeida, P.H.K. Gandolfi, E. Cassel, R.M.F. Vargas, Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity, *J. Supercrit. Fluids* 92 (2014) 223–230.
- [41] S.B. Hawthorne, C.B. Grabanski, E. Martin, D.J. Miller, Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 421–433.
- [42] T. Fornari, G. Vicente, E. Vázquez, M.R. García-Risco, G. Reglero, Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 34–48.

- [43] J. González-Rivera, C. Duce, D. Falconieri, C. Ferrari, L. Ghezzi, A. Piras, M.R. Tine, Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): chemical composition and thermal analysis, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33 (2015) 308–318.
- [44] M.L. Sameza, L.C. Nguemngang Mabou, S.N. Tchameni, M.A. Boat Bedine, F. Tchoumboungang, P.M. Jazet Dongmo, F. Boyom Fekam, Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.), *J. Phytopathol.* 164 (2016) 433–440.
- [45] A.I. Al-Humaid, M.O.A. Warrag, Allelopathic effects of mesquite (*Prosopis juliflora*) foliage on seed germination and seedling growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*), *J. Arid Environ.* 38 (1998) 237–243.
- [46] E.M. Gross, S. Hilt, P. Lombardo, G. Mulderij, Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton – state of the art and open questions, *Hydrobiologia* 584 (2007) 77–88.
- [47] S. Sisodia, M.B. Siddiqui, Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. on some crop and weed plants, *Development* 2 (2010) 022–028.
- [48] G.J. Evans, R.R. Bellinder, M.C. Goffinet, Herbicidal effects of vinegar and a clove oil product on redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*), *Weed Technol.* 23 (2009) 292–299.
- [49] S. Vaid, D.R. Batish, H.P. Singh, R.K. Kohli, Phytotoxic effect of eugenol towards two weedy species, *The Bioscan* 5 (2010) 339–341.
- [50] J. Kalinova, J. Triska, N. Vrchotova, Occurrence of eugenol coniferyl alcohol and 3,4,5-trimethoxyphenol in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and their biological activity, *Acta Physiol. Plant.* 33 (2011) 1679–1685.
- [51] W.C. Johnson III, M.A. Boudreau, J.W. Davis, Combinations of corn gluten meal, clove oil, and sweep cultivation are ineffective for weed control in organic peanut production, *Weed Technol.* 27 (2013) 417–421.
- [52] M.S. Riffle, G.R. Waller, D.S. Murray, R.P. Sgaramello, Devil's-claw (*Proboscidea louisianica*), essential oil and its components, *J. Chem. Ecol.* 16 (1990) 1927–1940.
- [53] K. Komai, C.-S. Tang, R.K. Nishimoto, Chemotypes of *Cyperus rotundus* in Pacific rim and basin: distribution and inhibitory, *J. Chem. Ecol.* 17 (1991) 1–8.
- [54] J.D. Weidenhamer, F.A. Macias, N.H. Fischer, G.B. Williamson, Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* 19 (1993) 1799–1807.
- [55] M. An, I.R. Johnson, J.V. Lovett, Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation, *J. Chem. Ecol.* 19 (1993) 2379–2388.
- [56] D.R. Batish, H.P. Singh, S. Kaur, R.K. Kohli, S.S. Yadav, Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*), *J. Plant Physiol.* 165 (2008) 297–305.
- [57] E.L. Rice, *Allelopathy*, 2nd, Hopeland city, 1984.
- [58] S. Mabrouk, K.B.H. Salah, A. Elaissi, L. Jlaïel, H. Ben Jannet, M. Aouni, F. Harzallah-Skhiri, Chemical composition and antimicrobial and allelopathic activity of *Tunisian Conyza sumatrensis* (Retz.) E. walker essential oils, *Chem. Biodivers.* 10 (2013) 209–223.
- [59] M. Verdeguer, M.A. Blázquez, H. Boira, Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops, *Biochem. Syst. Ecol.* 37 (2009) 362–369.
- [60] S. Bouajaj, a Benyamama, H. Bouamama, a Romane, D. Falconieri, a Piras, B. Marongiu, Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. growing wild in the Atlas Mountains of Morocco, *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 1673–1676.
- [61] C.M. de Oliveira, M. das, G. Cardoso, A.C. da, S. Figueiredo, M.L.M. de Carvalho, C.A.S.F. de Miranda, L.R. Marques Albuquerque, D. Lee Nelson, M. de Souza Gomes, L.F. Silva, J. de Andrade Santiago, M.L. Teixeira, R.M. Brandão, Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings, *Am. J. Plant Sci.* 05 (2014) 3551–3557.
- [62] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for experimenters*, John Wiley and Sons, New York, USA, 1978.
- [63] C.I. Nimbale, J.F. Pedersen, C.N. Yerkes, L.A. Weston, S.C. Weller, Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm, *J. Agric. Food Chem.* 44 (5) (1996) 1343–1347.

8 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Global Yield Isotherms

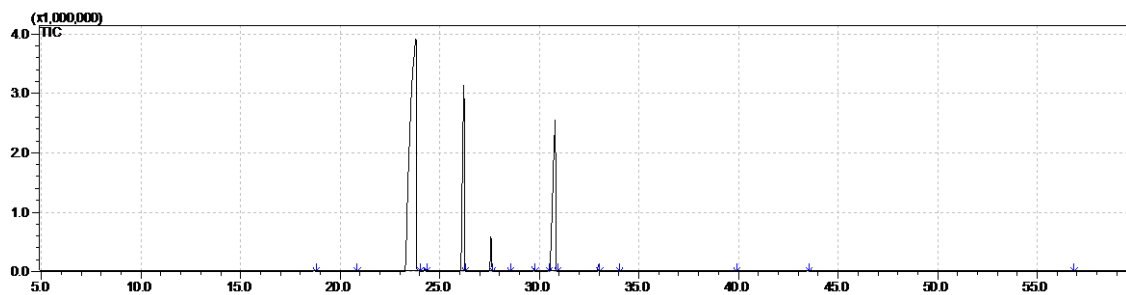
Temperature	Pressure bar	Density (kg/m ³)	Yield Means (%)	SD
40 °C	100	628.61	13.14	0.1
40 °C	200	839.81	12.89	0.24
40 °C	300	909.89	13.40	0.28

Temperature	Pressure bar	Density (kg/m ³)	Yield Means (%)	SD
50 °C	100	384.33	12.70	0.27
50 °C	200	784.29	13.45	0.07
50 °C	300	870.43	14.49	0.2

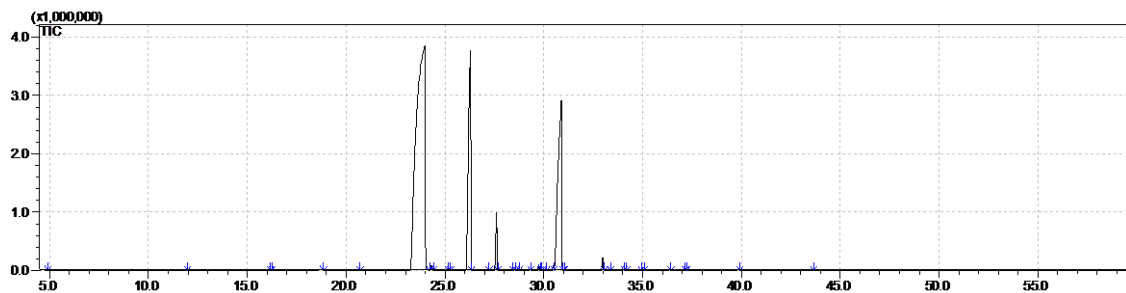
Chromatograms S2.

Chromatograms of the chemical profiles of the compounds identified in the different fractions of clove essential oil obtained with supercritical CO₂.

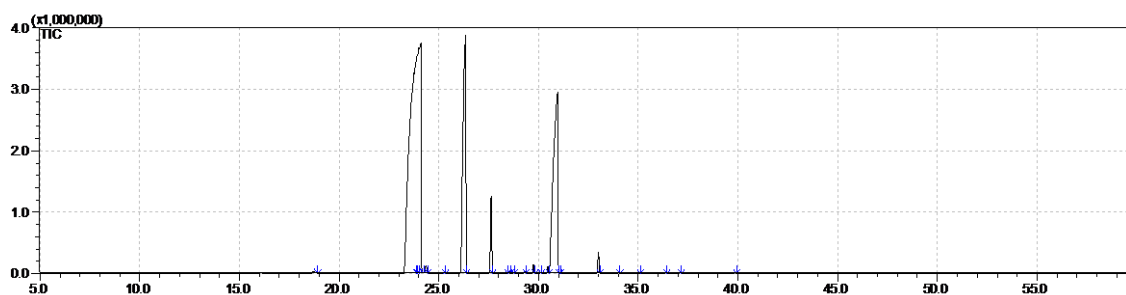
EO1-40 °C/100 bar



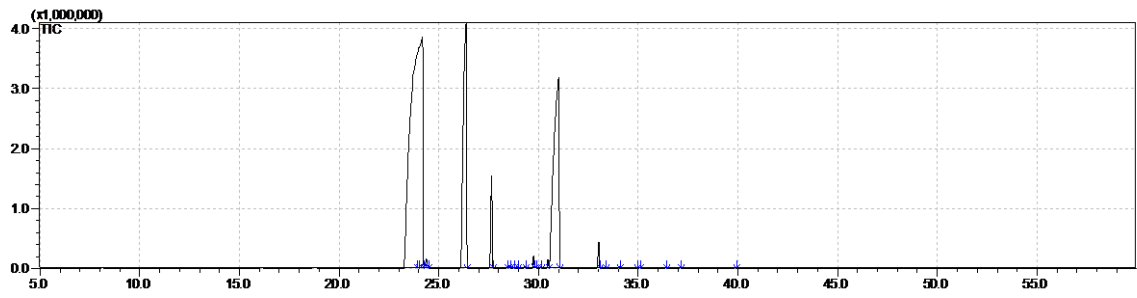
EO2- 40 °C/200 bar



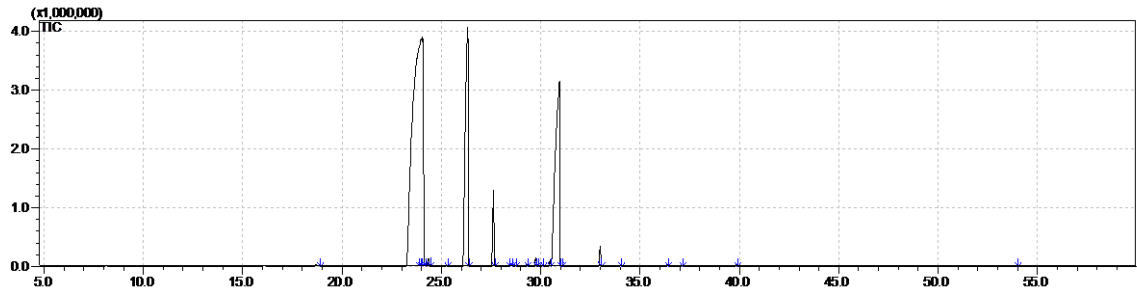
EO3-40 °C/300 bar



EO4-50 °C/100 bar



EO5-50 °C/200 bar



EO6-50 °C/300 bar

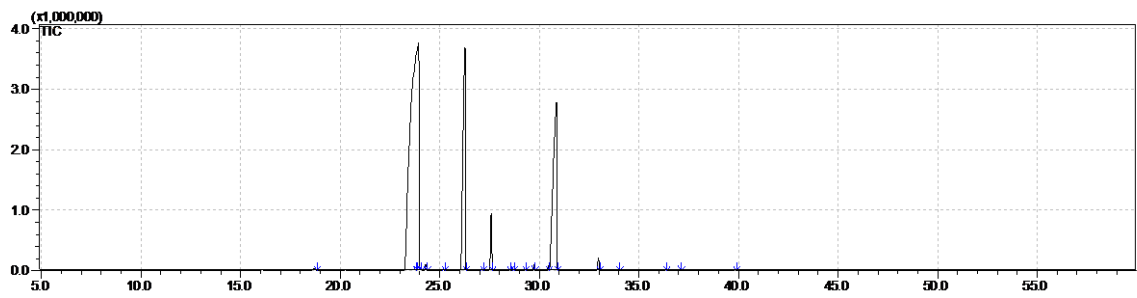


Table S3. Phytotoxic Activity of the fraction E06 obtained at the experimental condition of 50°C/300bar with supercritical CO2 and Eugenol on the seed germination

Phytotoxic effects of the clove essential oil EO6 on seeds germination (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	84.5	0.2
400	89.7	0.11
600	94.5	0.53
800	94.8	0.08

Phytotoxic effects of the Eugenol on seeds germination (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	5.0	1.00
400	15.6	0.55
600	69.3	1.15
800	75.5	0.5

Phytotoxic effects of the clove essential oil EO6 on seeds germination (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	43.0	2.64
400	78.3	2.08
600	89.9	1.00
800	95.1	0.23

Phytotoxic effects of the Eugenol on seeds germination (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	39.2	0.52
400	54.9	0.82
600	78.3	1.00
800	84.4	1.00

Table S4. Phytotoxic Activity of the fraction E06 obtained at the experimental condition of 50°C/300bar with supercritical CO2 and Eugenol on the radicle elongation

Phytotoxic effects of the clove essential oil on elongation of the radicle (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	79.9	0.84
400	81.8	0.85
600	87.7	0.84
800	89.5	0.35

Phytotoxic effects of the Eugenol on elongation of the radicle (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	22.6	1.68
400	73.1	0.91
600	76.9	0.84
800	82.1	1.06

Phytotoxic effects of the clove essential oil on elongation of the radicle (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	80.4	0.91
400	85.2	0.5
600	91.1	0.80
800	94.1	0.91

Phytotoxic effects of the Eugenol on elongation of the radicle (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Means	SD
200	46.1	1.67
400	71.1	1.22
600	79.6	0.57
800	94.1	0.91

Table S5. Phytotoxic Activity of the fraction E06 obtained at the experimental condition of 50°C/300bar with supercritical CO2 and Eugenol on the enlongation of the hypocotyl

Phytotoxic effects of the clove essential oil EO6 on elongation of the hypocotyl (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Mean	SD
200	81.1	0.93
400	84.6	0.65
600	88.7	0.22
800	89.6	0.18

Phytotoxic effects of the Eugenol on elongation of the hypocotyl (*M. pudica*)

Concentration (ppm)	Mean	SD
200	85.8	0.53
400	87.6	1.06
600	88.7	0.26
800	90.4	0.53

Phytotoxic effects of the clove essential oil EO6 on elongation of the hypocotyl (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Mean	SD
200	41.2	0.91
400	71.1	0.73
600	80.5	0.74
800	85.5	0.73

Phytotoxic effects of the Eugenol on elongation of the hypocotyl (*S. obtusifolia*)

Concentration (ppm)	Mean	SD
200	61.2	3.32
400	78.1	1.83
600	85.8	1.06
800	89.5	0.47

As hipóteses levantadas se mostraram parcialmente verdadeiras, ou seja:

H1 # H0 – Para primeira hipótese

H2 # H0 – Para a segunda hipótese

9 Apêndice II. Carta de submissão do artigo: Phytochemical prospection of compounds produced by winter cover crops with allelopathic potential.

Submission ID: EUPH-D-16-00076

Re: "Phytochemical prospection of compounds produced by winter cover crops with allelopathic potential"

Full author list: Márcia Mauli; Lucia Helena Pereira Nóbrega; Antonio Pedro da Silva Souza Filho; Adriana Maria Meneghetti; Mozaniel Oliveira; Heloisa Alves Oliveira; Roney Rocha; Reinaldo Santos

Dear Mr Oliveira,


We have received the submission entitled: "Phytochemical prospection of compounds produced by winter cover crops with allelopathic potential" for possible publication in Euphytica, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Márcia Mauli who will be able to track the status of the paper through his/her login.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Euphytica

10 Apêndice III. Carta de submissão do artigo: PHYTOTOXIC POTENTIAL OF THE GEOPROPOLIS EXTRACTS OF JANDAIRA STINGLESS BEE (*Melipona subnitida* Ducke) IN WEEDS. Desenvolvido e submetido durante o período referente ao desenvolvimento do mestrado.



REVISTA CAATINGA

ISSN 1983-2125 (On-line)
ISSN 0100-316X (Impresso)



Universidade Federal Rural do Semi-Árido

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#) [NOTÍCIAS](#) [APRESENTAÇÃO E PREPARO DO MANUSCRITO](#) [TAXAS E ORIENTAÇÕES PARA PAGAMENTO](#) [MODELO ARTIGO \(SUBMISSÃO\)](#) [MODELO ARTIGO \(VERSÃO FINAL\)](#) [MODELO DE DECLARAÇÃO DE AUTORIA E RESPONSABILIDADE](#) [MODELO DE DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES](#) [CONAC - DIRETRIZES PARA SUBMISSÃO - EDIÇÃO ESPECIAL](#)

Capa > Usuário > Autor > Submissões > #6159 > Resumo

#6159 Sinopse

RESUMO [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores Daniel Santiago Pereira, Mozaniel Santana de Oliveira, João Paulo Holanda Neto, Natanael Santiago Pereira, Patrício Borges Maracajá, Antonio Pedro da Silva Souza Filho

Título PHYTOTOXIC POTENTIAL OF THE GEOPROPOLIS EXTRACTS OF JANDAIRA STINGLESS BEE (*Melipona subnitida* Ducke) IN WEEDS

Documento original [6159-28761-1-SP.DOCX](#) 2016-07-04

Documentos Suplementares [6159-28776-1-SP.PDF](#) 2016-07-04 [6159-28777-1-SP.PDF](#) 2016-07-08 [6159-28843-1-SP.DOCX](#) 2016-07-08 [6159-28856-1-SP.PDF](#) 2016-07-08 [6159-28866-1-SP.PDF](#) 2016-07-08 [INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR](#)

Submetido por Doutor Daniel Santiago Pereira

Data de submissão July 4, 2016 - 04:34 PM

Seção Agronomia

Editor Nenhum(a) designado(a)

Comentários do Autor Estimado Editor,

Informo que o artigo submetido é inédito, relaciona-se com a região semiárida, e apresenta resultados muito importantes frente à crescente busca por controles alternativos advindos do próprio meio ambiente. No artigo em questão constam 6 autores. O sexto autor, Dr Antonio Pedro da Silva Souza Filho, é o desenvolvedor dos estudos alelopáticos em plantas daninhas na Amazônia, a partir de seus estudos houve o início da busca de bioativos naturais que possam ser utilizados como bioherbicidas no controle de ervas daninhas de pastagens. Sua contribuição vai além da citação de seus artigos e usos das metodologias descritas nestes, pois através de sua experiência e apoio ao desenvolvimento deste estudo, disponibilização de equipamentos e laboratório, é que foi possível a obtenção dos dados inéditos para o uso de produtos das abelhas com potencial de biocontrole de plantas daninhas.

Situação

Situação Aguardando designação

Iniciado 2016-07-04

Última alteração 2016-07-08

Metadados da submissão

[EDITAR METADADOS](#)

Autores

Nome Daniel Santiago Pereira

Instituição/Afiliação Embrapa Amazônia Oriental

País —

[POLÍTICA DE CONFLITO DE INTERESSES](#) —

Resumo da Biografia —

Contato principal para correspondência.

Nome Mozaniel Santana de Oliveira

Instituição/Afiliação Universidade Federal do Pará

País Brasil

[POLÍTICA DE CONFLITO DE INTERESSES](#) —

Resumo da Biografia —

Nome João Paulo Holanda Neto

Instituição/Afiliação Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Paraibano - IF Sertão

País Brasil

[POLÍTICA DE CONFLITO DE INTERESSES](#) —

Resumo da Biografia —

11 Apêndice IV. Artigo: Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. Desenvolvido e aceito durante o período do mestrado.

J. of Supercritical Fluids 98 (2015) 167–171



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects



José Rafael S. Botelho^a, Adriano Guimarães Santos^b, Marilena Emmi Araújo^c,
Mara Elga M. Braga^d, Wallace Gomes-Leal^b, Raul N. Carvalho Junior^{a,*},
M. Angela A. Meireles^e, Mozaniel Santana Oliveira^a

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844614004161>

12 Apêndice V. Artigo: Supercritical CO₂ extraction of açáí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. Desenvolvido e aceito durante o período do mestrado.

J. of Supercritical Fluids 107 (2016) 364–369



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



Supercritical CO₂ extraction of açáí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp



Camila de Cássia Rodrigues Batista^a, Mozaniel Santana de Oliveira^a,
Marilena Emmi Araújo^b, Antonio M.C. Rodrigues^a, José Rafael Santos Botelho^c,
Antonio Pedro da Silva Souza Filho^d, Nélio T. Machado^b, Raul N. Carvalho Junior^{a,*}

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844615301522>

13 Apêndice VI. Trabalhos aceitos e apresentados em forma de resumo em congressos durante o período do mestrado.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **OLIVEIRA, M. S.**; Oliveira, A. H ; SOUZA FILHO, A. P. S. ; VENTURIERI, G. C. ; VASCONCELOS, M. A. M. ; PEREIRA, D. S. ; CORDEIRO, H. K. C. ; MENEZES, C. . TAXA DE MASSA MECÂNICA PRESENTE EM DIFERENTES AMOSTRAS PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA. In: VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015, Ilhéus. VI Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura / III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen / VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015.

2. **OLIVEIRA, M. S.**; Oliveira, A. H ; SOUZA FILHO, A. P. S. ; VENTURIERI, G. C. ; VASCONCELOS, M. A. M. ; PEREIRA, D. S. ; MENEZES, C. ; CARVALHO JUNIOR, R. N. . DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA ORIENTAL. In: VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015, Ilhéus. VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015.

3. Oliveira, A. H ; **OLIVEIRA, M. S.** ; SOUZA FILHO, A. P. S. ; VENTURIERI, G. C. ; VASCONCELOS, M. A. M. ; PEREIRA, D. S. ; QUEIROZ, A. C. M. . TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES, TOTAIS E SACAROSE APARENTE EM MÉIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA. In: VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015, Ilhéus. VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015.

4. PEREIRA, D. S. ; VENTURIERI, G. C. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; FREITAS, C. I. A. ; SILVA, J. B. A. ; SILVA, R. A. ; MARACAJA, P. B. ; SOUZA FILHO, A. P. S. . OBTENÇÃO DE MASSA DA PRÓPOLIS APÍCOLA PARAENSE EM SOLVENTES DE DISTINTAS POLARIDADES. In: VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015, Ilhéus. VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015.

5. PEREIRA, D. S. ; VENTURIERI, G. C. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; PEREIRA, N. S. ; FREITAS, C. I. A. ; SILVA, J. B. A. ; MARACAJA, P. B. ; SOUZA FILHO, A. P. S. . CLASSIFICAÇÃO QUANTO A COR E COMPOSIÇÃO DE MICRONUTRIENTES DA PRÓPOLIS DO LESTE POTIGUAR. In: VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015, Ilhéus-Bahia. VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste, 2015.

6. CORDEIRO, R. M. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; PINTO, R. H. H. ; CUNHA, V. M. B. ; SILVA, N. J. N. ; COSTA, W. A. ; SANTOS, A. P. M. ; BEZERRA, V. M. S. ; BOTELHO, J. R. S. ;

CARVALHO JUNIOR, R. N. . DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS EM ÓLEOS DE MURUCI (*Byrsonima crassifolia* L. Rich) OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: CO₂ SUPERCRÍTICO E SOLVENTE ORGÂNICO LÍQUIDO. In: XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, Natal - RS. Anais do XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, 2015, NATAL RN. XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, Natal - RS. Anais do XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, 2015.

7. PEREIRA, D. S. ; ANDELINO, C. J. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; SILVA, M. ; HOLANDA NETO, J. P. . Apicultura como fonte de renda na comunidade de Vaca Morta no município de Marcelino Vieira ? RN, Brasil. In: IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015. v. 10.

8. PEREIRA, D. S. ; SILVA, M. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; SOUZA, C. W. F. ; SABOIA, A. L. . ATIVIDADES ZOOTÉCNICAS DESENVOLVIDAS NA COMUNIDADE DE SÍTIO DE AREIA, NO MUNICÍPIO DE ÁGUA NOVA ? RN, BRASIL. In: IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015. v. 10.

9. **OLIVEIRA, M. S.**; Oliveira, A. H ; SOUZA FILHO, A. P. S. ; VENTURIERI, G. C. ; VASCONCELOS, M. A. M. ; PEREIRA, D. S. ; CORDEIRO, H. K. C. ; MENEZES, C. ; COSTA, W. A. . AVALIAÇÃO DE TRÊS PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS E GEOPROPÓLIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA. In: IX Congresso de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso de Agroecologia, 2015. v. 10.

10. SILVA, M. ; CASTRO, I. R. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; BORGES, F. R. ; PEREIRA, D. S. . USO DO CRÉDITO AGRÍCOLA NA COMUNIDADE DE ARACAJU, MUNICÍPIO DE RIACHO DA CRUZ ? RN, BRASIL.. In: IX Congresso de agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso de agroecologia, 2015. v. 10.

11. SILVA, M. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; PEREIRA, D. S. ; QUEIROZ, H. V. ; SABOIA, A. L. . COMERCIALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA DOS PEQUENOS PRODUTORES DA COMUNIDADE PERÍMETRO IRRIGADO, NO MUNICÍPIO DE PAU DE FERROS - RN, BRASIL. In: IX Congresso de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso de Agroecologia, 2015. v. 10.

12. SILVA, M. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; PEREIRA, D. S. ; QUEIROZ, H. V. ; SABOIA, A. L. . COMERCIALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA DOS PEQUENOS PRODUTORES DA COMUNIDADE PERÍMETRO IRRIGADO, NO MUNICÍPIO DE PAU DE FERROS - RN, BRASIL. In: IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015. v. 10.

13. SILVA, M. ; CONDE, W. A. ; **OLIVEIRA, M. S.** ; OLIVEIRA, P. M. ; PEREIRA, D. S. . ÍNDICE DE PARTICIPAÇÃO EM ASSOCIAÇÃO COMUNITÁRIA DE AGRICULTORES DO SÍTIO DE ENCANTO DE CIMA, ENCANTO-RN, BRASIL. In: IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015, Belém. IX Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2015. v. 10.

Resumos publicados em anais de congressos

1. BEZERRA, P. T. S. ; OLIVEIRA, M. S. ; PEREIRA, D. S. ; VENTURIERI, G. C. ; SOUZA FILHO, A. P. S. . ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATOS DO CERUME DAABELHA JANDAIRA (Melipona subnitida Ducke) EM PLANTAS DANINHAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL. In: XXI Congresso Brasileiro de Apicultura e VII Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2016, FORTALEZA. XXI Congresso Brasileiro de Apicultura e VII Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2016.