

**VINICIUS GUIMARÃES NASSER**

**USO DE BIOINSUMOS E SEU IMPACTO NO PERFIL METABOLÔMICO EM  
PLANTAS DE ALHO (*Allium sativum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Geraldo Humberto Silva

Coorientadores: Frederico Garcia Pinto  
Willian Rodrigues Macedo

**RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Campus  
Rio Paranaíba

T

N267u  
2022 Nasser, Vinicius Guimarães, 1989-  
    Uso de bioinsumos e seu impacto no perfil metabolômico  
em plantas de alho (*Allium sativum* L.) / Vinicius Guimarães  
Nasser. – Rio Paranaíba, MG, 2022.  
    70 f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: Geraldo Humberto Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Química, 2022.

Referências bibliográficas: f.8-10, f.23-24.

1. metabolômica. 2. triptofol. 3. eugenol. I. Silva, Geraldo  
Humberto, 1969-. II. Universidade Federal de Viçosa. Química.  
Doutorado Multicêntrico em Química de Minas Gerais.  
III. Título.

540

Bibliotecário(a) responsável: Ana Paula de Souza CRB-6/2922

**VINICIUS GUIMARÃES NASSER**

**USO DE BIOINSUMOS E SEU IMPACTO NO PERFIL METABOLÔMICO EM  
PLANTAS DE ALHO (*Alium sativum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de dezembro de 2022.

Assentimento:



Vinicius Guimarães Nasser  
Autor



Geraldo Humberto Silva  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus familiares e amigos.

Minha esposa Grazielle Cristina Ferreira Nasser.

Meus Professores e Coorientadores.

Agradeço ao professor Geraldo Humberto Silva pela orientação e pelo conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

Ao produtor Otavio Resende Guimarães e ao grupo Sekita Agronegócios pela confiança de realizarmos nossas pesquisas em parceria.

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Agradeço à CAPES

## RESUMO

NASSER, Vinicius Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Uso de bioinsumos e seu impacto no perfil metabolômico em plantas de alho (*Alium sativum* L.)**. Orientador: Geraldo Humberto Silva. Coorientadores: Frederico Garcia Pinto e Willian Rodrigues Macedo

A região do Alto Paranaíba tem se destacado pela produção de alho, no entanto, produtores relatam problemas com a viabilidade dos bulbilhos semente e presença de anomalias, como o superbrotamento dos bulbos. Na busca por bioinsumos capazes de auxiliar a solucionar estes dois problemas, foram avaliados a substância natural triptofol para melhorar o vigor dos bulbilhos e óleo essencial de cravo para evitar os superbrotamento. Para tanto foram realizados experimentos prévios em laboratório para avaliar a melhores doses respostas. Os melhores resultados obtidos foram avaliados em campo, em parceria com as fazendas produtoras, em duas safras. Os bulbilhos sementes foram tratados em pré-plantio com triptofol e a emulsão óleo de cravo pulverizadas em plantas de alho no período de diferenciação celular utilizando delineamento em blocos casualizados. Os parâmetros avaliados foram a produção, qualidade do alho, alterações na fisiológicas, via análise enzimática e de fotossíntese. Também foi utilizada análise de metabolômica global baseada em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) para verificar possíveis alterações no perfil metabólico dos diferentes tecidos das plantas. Plantas tratadas com triptofol apresentaram maior desenvolvimento inicial, alterações enzimáticas e metabólicas, que proporcionou um aumento na produção e na qualidade dos bulbos produzidos. A pulverização do óleo de cravo em folhas reduziu significativamente a presença de superbrotamento e não impactou na produção dos bulbos, o que comumente ocorre com outras técnicas aplicadas para reduzir está anomalia.

Palavras-chave: Metabolômica. Triptofol. Eugenol.

## ABSTRACT

NASSER, Vinicius Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2022. **Use of bioinputs and their impact on the metabolomic profile of garlic plants (*Alium sativum* L.)**. Advisor: Geraldo Humberto Silva. Co-advisors: Frederico Garcia Pinto and Willian Rodrigues Macedo

The Alto Paranaíba region has stood out for the production of garlic. However, producers report problems with the viability of seed bulbs and anomalies, such as secondary growth or super budding and pseudo budding of the bulbs. In the search for bioinputs capable of helping to solve these two problems, the natural substance tryptofol was evaluated to improve the vigor of the bulbils and clove essential oil to avoid secondary growth. For that, previous experiments were carried out in the laboratory to assess the best response doses, with the best results obtained evaluated in the field, in partnership with the producing farms, in two harvests. The seed bulbs were treated pre-planting with a tryptofol and clove essential oil emulsion sprayed on garlic plants during the cell differentiation period using a randomized block design. The parameters evaluated were production, garlic quality, and physiological changes via enzymatic and photosynthetic analysis. Global metabolomics analysis based on gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was also used to verify possible changes in the metabolic profile of different plant tissues. Plants treated with tryptofol showed more excellent initial development and enzymatic and metabolic alterations, which increased the production and quality of the bulbs produced. Spraying clove oil on leaves significantly reduced secondary growth and did not impact bulb production, which commonly occurs with other techniques applied to reduce this anomaly.

Keywords: Metabolomics. Tryptophol. Eugenol

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABA - ácido abscísico

AIA - ácido indol-3- acético

APX - ascorbato peroxidase

CAT - catalase

CK - citocinina

ET - etileno

FC - *fold change*

GA - giberelina

GC-MS - cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa

IAAId - índole-3-acetaldeído

JA - jasmonato

EOCr - óleo essencial de cravo

PST - proteína solúvel total

P.A./R - relação parte aérea/raiz

TOL – triptophol

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	8
2.	REFERÊNCIAS .....	10
3.	ARTIGO I.....	12
	Perfil fisiológico e metabólico de plantas de alho submetidas ao triptofol, um composto da via metabólica do ácido indol-3- acético.....	12
	Resumo .....	12
	Abstract.....	14
	1. Introdução .....	15
	2. Material e Métodos .....	16
	3. Resultados.....	21
	4. Discussão .....	31
	5. Conclusões .....	34
	6. Referências.....	35
	7. Material Suplementar.....	41
4.	ARTIGO II.....	42
	Óleo essencial de cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ): um potencial inibidor do crescimento secundário no alho em regiões tropicais.....	42
	Resumo .....	42
	Abstract.....	43
	1. Introdução .....	44
	2. Material e métodos.....	46
	3. Resultados.....	51
	4. Discussão .....	58
	5. Conclusões .....	61
	6. Referências.....	62
	7. Material Suplementar.....	68
5.	CONCLUSÃO GERAL.....	70

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os sistemas agropecuários vêm passando por grandes transformações e avanços tecnológicos, buscando incrementos em produtividade e qualidade, e impulsionados pela produção sustentável. Uma das ferramentas que possibilita grandes avanços na produção agrícola e com redução de agroquímicos é a Química de Produtos Naturais (QPNs), que visa a utilização de técnicas como o uso de bioestimulantes, biorreguladores, bioprotetores e bioinsumos (MEYER et al., 2022). Com a grande necessidade de reduzir o volume de uso dos pesticidas e fertilizantes químicos, os bioinsumos têm-se destacado como alternativa economicamente viável e eficaz.

No Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), criou o Programa Nacional de Bioinsumos, com foco no aproveitamento do potencial da biodiversidade brasileira para reduzir a dependência dos produtores rurais em relação aos insumos importados e ampliar a oferta de matéria prima nesse setor. Considera-se bioinsumo ...“o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos”... (BRASIL, 2022).

Dentre os cultivos com potencial aplicação de tecnologias, as olerícolas têm demonstrado significativo avanços nos últimos anos, com destaque à cultura do alho (*Allium sativum* L.), o alho é uma das hortaliças de grande importância econômica e social, com aumento progressivo em produtividade, em 2020 atingiu uma produção de 184,5 mil toneladas, ocupando o 16º lugar no *ranking* mundial em produção (BERLATO, 2022). No entanto, sua produção não atende à demanda interna do país e produtores têm cada vez mais buscado pela autossuficiência, implantando estratégias de manejo, como adensamento populacional, formas de adubação, teor de cobertura vegetal e principalmente a técnica de vernalização (CUNHA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2020). A prática de vernalização consiste na exposição dos bulbilhos pré-plantio a temperaturas de 0 a 4 °C, por até 120 dias (LONGHI; WILPERT; BOSCO, 2020). No entanto, relatam que bulbilhos submetidos a diferentes temperaturas em pré-plantio reduziram os níveis de auxinas ácido indolacético (AIA) e ácido giberélico GA com a diminuição da temperatura no início do ciclo, levando a um desbalanço na relação AIA/GA, bulbilhos submetidos a temperatura ambiente apresentavam uma concentração de AIA 12 vezes maior que a concentração de GA, ao submeter os bulbilhos a 15°C essa concentração reduziu

para 10,52 vezes (WU et al., 2016). O bulbilho contém as reservas nutritivas para a emergência e estabelecimento inicial da cultura, uma rápida emissão foliar e expansão do sistema radicular proporcionam um eficiente consumo destas reservas favorecendo o desenvolvimento da planta. Quanto menor o tempo médio de emergência, melhor será a adaptação da planta às condições ambientais adversas (RESENDE, 2018), além de influenciar no rendimento final da cultura, uma vez que se inicia a formação do aparato fotossintético da planta (BURBA; GALMARINI, 1997).

Uma técnica que visa o melhor aproveitamento das reservas do bulbilho-semente é a aplicação de reguladores de crescimento vegetal, que influenciam a capacidade das plantas em se adaptar as mudanças ambientais, mediam o crescimento, o desenvolvimento, a alocação de nutrientes e as transições fonte/dreno, além de atuar na sinalização entre os órgãos vegetais, como eficientes mecanismos de defesa (PELEG; BLUMWALD, 2011), o que pode favorecer o estabelecimento homogêneo e mais rápido da cultura, e levar a um maior rendimento e qualidade final do alho. Outro problema enfrentado no cultivo de alho em região tropical, com bulbilhos sementes submetidos a vernalização, refere-se ao aumento de uma anomalia fisiológica a superbrotação ou pseudobrotação, também denominado crescimento secundário dos bulbilhos, fator que ocasiona redução na produtividade dos bulbos comerciais (MACÊDO; DE SOUZA; PEREIRA, 2006).

Dentre as técnicas adotadas para reduzir esta anomalia o estresse hídrico tem sido muito utilizado durante o período de bulbificação, causando déficit hídrico moderado visando reduzir o crescimento secundário das plantas (MACÊDO; DE SOUZA; PEREIRA, 2006). Do ponto de vista fisiológico, o estresse hídrico leve estimula o fechamento parcial dos estômatos das plantas, promovendo redução na perda de água, mas sem interromper completamente a fotossíntese. No entanto, o uso dessa técnica causa limitações no vigor vegetativo de diversas culturas e geralmente redução no rendimento (CHAI et al., 2016). Uma técnica que vem sendo explorado em outras culturas e a aplicação de óleos essenciais, podendo destacar o óleo essencial de cravo, que é constituído principalmente por eugenol, substância com diversas funcionalidades, como toxicidade contra insetos, bactérias, fungos patogênicos de plantas e solo, nematóides e ervas daninhas (AHUJA et al., 2015), também retarda ou inibe a germinação de várias espécies de plantas, apresentando atividade herbicida (ALVES et al., 2021; STOKŁOSA et al., 2012).

Para o desenvolvimento do trabalho, foi utilizado dois bioinsumos com intuito de resolver duas problemáticas na cultura do alho. Em um primeiro instante avaliou-se a aplicação de triptofol (TOL), um composto presente nas vias secundárias do AIA, e que pode ser

sintetizado por plantas, fungos, bactérias e leveduras (PALMIERI; PETRINI, 2019), buscando assim uma alternativa para restabelecer um balanço hormonal favorável a aumentar o vigor dos bulbilhos-semente submetidos a vernalização.

Em um segundo instante, visto resultados promissores do óleo de cravo em reduzir a germinação de cereais em pré-colheita, aplicou-se soluções de óleo de cravo em plantas de alho na fase de diferenciação em busca de reduzir a presença de superbrotamento.

A aplicação exógena de bioinsumos em plantas proporciona respostas bioquímicas nos diferentes tecidos o que resulta em alterações no metabolismo da planta, podendo influenciar de modo positivo sua produção. Para melhor compreender essas respostas na cultura do alho, utilizou-se da análise metabolômica global baseada em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria para detectar tais alterações metabólicas.

## 2. REFERÊNCIAS

AHUJA, N. et al. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 209–218, 2015.

ALVES, T. A. et al. Bioactivity and molecular properties of Phenoxyacetic Acids Derived from Eugenol and Guaiacol compared to the herbicide 2, 4-D. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

BERLATO, G. Cultivo do alho ainda é desafio, mas tem potencial de mercado no Ceará. p. 1–8, 2022.

BRASIL, 2020. **Diário oficial da união** Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 (2020). Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos., 2022.

BURBA, J. L.; GALMARINI, C. R. **First international symposium on edible Alliaceae**. International Symposium on Edible Alliaceae 1994: Mendoza, Argentina). **Anais...**International Society for Horticultural Science, 1997.

CHAI, Q. et al. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 1, p. 1–21, 2016.

CUNHA, M. L. P. et al. Modeling of nutrients demands in garlic crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1205–1213, 2015.

DARABI, H. R. et al. Clove bud oil: An efficient, economical and widely available oil for the inhibition of wheat seed germination. **Environmental Chemistry Letters**, v. 9, n. 4, p. 519–524, 2011.

GONÇALVES, F. A. R. et al. Non-destructive evaluation of the leaf area of garlic crop using mathematical models. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 5, p. 1600–1606, 2020.

- HU, Q. et al. Inhibitory effect of eugenol on seed germination and pre-harvest sprouting of hybrid rice (*Oryza sativa* L.). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- LONGHI, C. D. N.; WILPERT, L. S.; BOSCO, L. C. Filocrono de alho nobre cultivado sob influência da vernalização. **Agrometeoros**, v. 27, n. 1, p. 209–216, 2020.
- MACÊDO, F. S.; DE SOUZA, R. J.; PEREIRA, G. M. Controle de superbrotamento e produtividade de alho vernalizado sob estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 629–635, 2006.
- MEYER, M. C. et al. Bioinsumos na cultura da soja. 2022.
- PALMIERI, A.; PETRINI, M. Tryptophol and derivatives: Natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 490–530, 2019.
- PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 290–295, 2011.
- RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortaliças em Revista**, ano, v. 7, p. 16–17, 2018.
- STOKŁOSA, A. et al. Phytotoxic Activity of Clove Oil, Its Constituents, and Its Modification by Light Intensity in Broccoli and Common Lambsquarters ( *Chenopodium album* ) . **Weed Science**, v. 60, n. 4, p. 607–611, 2012.
- WU, C. et al. Response of garlic (*Allium sativum* L.) bolting and bulbing to temperature and photoperiod treatments. **Biology Open**, v. 5, n. 4, p. 507–518, 2016.

### 3. ARTIGO I

#### **Perfil fisiológico e metabólico de plantas de alho submetidas ao triptofol, um composto da via metabólica do ácido indol-3- acético**

V.G. Nasser, W.R. Macedo, F.G. Pinto, G.C.F. Nasser, J.A. Ferreira, G.H. Silva  
Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, Rio Paranaíba - MG, Brasil

#### **Resumo**

Indol-3-etanol, sinônimo de triptofol (TOL), é um álcool indólico produzido por plantas, bactérias e fungos. O TOL é um metabólito da via biossintética do ácido indol-3-acético (AIA) e é biossintetizado pela redução do indol-3-acetaldeído pela enzima triptofol redutase; tal processo pode ser reversível pela enzima álcool desidrogenase que torna o TOL um precursor da auxina AIA. O cultivo do alho (*Allium sativum* L.) ocorre atualmente em diversos países, mesmo naqueles onde as condições ambientais não são as ideais, como fotoperíodo e temperatura; esse fato se deve à adoção da prática da vernalização, que consiste em expor os bulbilhos antes do plantio a temperaturas de 0 a 4 °C, por períodos de até 120 dias. No entanto, alguns estudos relatam que essa redução de temperatura reduz os níveis de AIA e impacta no equilíbrio hormonal dos bulbilhos. Sabendo do alto valor agregado das sementes de bulbilhos e sua relação direta com a qualidade dos bulbos a serem produzidos, a aplicação exógena de TOL para modular positivamente o desenvolvimento dos bulbilhos se apresenta como uma alternativa para acelerar a brotação, emitindo o aparato fotossintético da planta mais rápido e estimulando o desenvolvimento do sistema radicular, o que permitirá maior absorção de água e nutrientes, além do significativo impacto no aproveitamento da adução. Os bulbilhos foram submetidos a diferentes concentrações de TOL (0, 3, 8, 12 e 16 µM) e avaliados *in vitro* quanto ao desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular. Também foram realizados experimentos de campo nas safras de 2020 e 2021, onde foram avaliados o desenvolvimento dos tecidos vegetais, atividade enzimática, alterações metabólicas e efeitos na produção. A aplicação de TOL em bulbos de alho em pré-plantio causou diminuição no teor de sólidos solúveis totais e maior resposta de síntese proteica, além de maior desenvolvimento da parte aérea e volume do sistema radicular. A análise metabolômica global baseada em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) das folhas sete dias após o plantio permitiu separar quimicamente os tratamentos Controle e 12 µM TOL por análise de componentes principais (PCA). As análises de impacto nas vias metabólicas mostraram alterações em quatro vias biossintéticas relacionadas à biossíntese de aminoácidos e energia. O desenvolvimento inicial mais significativo das plantas tratadas com TOL e as alterações

enzimáticas e metabólicas indicam que o TOL proporcionou aos bulbilhos um melhor aproveitamento das reservas energéticas, demonstrando que o TOL estimulou um maior desenvolvimento das plantas quando aplicado ao bulbilho em pré-plantio. O melhor desenvolvimento no início do ciclo das plantas tratadas com TOL levou a maiores rendimentos da cultura e a uma maior proporção de alho de alta qualidade.

Palavras-chave: Auxinas. Metabolômica. *Allium sativum* L.

## Abstract

Indole-3-ethanol, synonymous with tryptofol (TOL), is an indole alcohol produced by plants, bacteria and fungi. TOL is a metabolite of the biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid (IAA) and is biosynthesized by the reduction of indole-3-acetaldehyde by the enzyme triptopol reductase; This process can be reversible by the alcohol dehydrogenase enzyme that transforms TOL into an AIA auxin precursor. The cultivation of garlic (*Allium sativum* L.) currently occurs in several countries, even in those where environmental conditions are not ideal, such as photoperiod and temperature; this fact is due to the adoption of the practice of vernalization, which consists of exposing the bulbs before of planting at temperatures from 0 to 4 °C, for periods of up to 120 days. However, some studies report that this temperature reduction reduces IAA levels and impacts the hormonal balance of the bulbils. Knowing the high added value of bulbil seeds and its direct relationship with the quality of the bulbs to be produced, the exogenous application of TOL to positively modulate the development of bulbils is presented as an alternative to accelerate sprouting, emitting the photosynthetic apparatus of the plant faster and stimulating the development of the root system, which will allow more absorption of water and nutrients, in addition to the significant impact on the cost of the crop that the adduction represents. Bulbs were subjected to different concentrations of TOL (0, 3, 8, 12, and 16  $\mu$ M) and evaluated *in vitro* culture for shoot and root system development. Field experiments were also carried out in the 2020 and 2021 harvests, where the development of plant tissues, enzymatic activity, metabolic changes, and effects on production was evaluated. The application of TOL to garlic bulbs in pre-planting caused a decrease in the total soluble solids content and a more protein synthesis response, in addition to more shoot growth and root system volume. The global metabolomics analysis based on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) of the leaves seven days after planting allowed to chemical separate the Control and 12  $\mu$ M TOL treatments by Principal Component Analysis (PCA). Impact analyses on metabolic pathways showed changes in four biosynthetic pathways related to amino acid and energy biosynthesis. The more significant initial development of plants treated with TOL and the enzymatic and metabolic alterations indicate that TOL led to better use of energy reserves in the seed bulb, demonstrating that TOL exerted an auxinic function when applied to the bulb in pre-planting. The better start of TOL-treated plants led to higher crop yields and a higher proportion of high-quality garlic.

Keywords: Auxins. Metabolomics. *Allium sativum* L.

## 1. Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, e apresenta grande importância econômica, no entanto, mesmo com grandes avanços tecnológicos aplicados a cultura, sua produção nacional não supre o consumo interno do país.

O alho é originário de regiões de clima frio. Para cultivo no Brasil, em locais com fotoperíodo e temperatura não ideais, adota-se a prática da vernalização, que consiste em expor os bulbos pré-plantio a temperaturas de 0 a 4°C, por até 120 dias (LONGHI; WILPERT; BOSCO, 2020). No entanto, relatam que bulbilhos submetidos a diferentes temperaturas em pré-plantio reduziram os níveis de ácido indolacético (AIA) e ácido giberélico GA com a diminuição da temperatura no início do ciclo, levando a um desbalanço na relação AIA/GA, bulbilhos submetidos a temperatura ambiente apresentavam uma concentração de AIA 12 vezes maior que a concentração de GA, ao submeter os bulbilhos a 15°C essa concentração reduziu para 10,52 vezes (WU et al., 2016). O AIA é uma auxina que estimula o alongamento celular, aumenta o conteúdo osmótico e a permeabilidade à água na célula e diminui a pressão da parede celular, o que contribui para um maior desenvolvimento foliar e expansão mais significativa do sistema radicular e, conseqüentemente, melhor absorção de nutrientes (FERRI; M G, 1985; PEIXOTO et al., 2020; TAIZ et al., 2017).

O precursor biossintético do AIA é o aminoácido triptofano, cuja oxidação gera o ácido indol-3-pirúvico, que sofre descarboxilação, formando indol-3-acetaldeído (AIAId), que pode ser oxidado à forma ativa da auxina AIA ou reduzido a triptofol (TOL), em um processo reversível (QUITTENDEN et al., 2009; RAYLE; PURVES, 1967; SANDBERG, 1984; VICKERY; PURVES, 1972; YOKOYAMA et al., 2017). A redução para TOL é uma forma que a planta utiliza para regular os níveis de AIA nos tecidos vegetais. O processo inverso envolve a oxidação do TOL pela enzima álcool desidrogenase produtora de indol-3-acetaldeído (AIAId), que é oxidado a AIA (MAGNUS et al., 1982; PALMIERI; PETRINI, 2019; PURVES; BROWN, 1978).

A aplicação de TOL em bulbos de alho em pré-plantio é uma alternativa para restabelecer a relação AIA/GA e aumentar o vigor dos bulbos-semente. Também pode estimular os processos metabólicos, resultando em melhor aproveitamento das reservas, gerando um estande de plantas uniforme, e proporcionando maior desenvolvimento inicial das plantas, com efeito mais significativo no sistema radicular, facilitando a absorção dos nutrientes disponíveis no solo. No entanto, o uso de reguladores de crescimento em plantas pode afetar várias vias metabólicas. Existem várias abordagens para detectar tais alterações metabólicas envolvidas no

processo. Uma delas é a análise metabolômica não direcionada baseada em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), também chamada de metabolômica global, que consiste na análise qualitativa de um conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da) encontrados em células, fluidos biológicos, tecidos ou organismos, que são os produtos finais das funções celulares (CANUTO et al., 2018).

No presente trabalho, apresenta-se resultados da aplicação do TOL na cultura do alho em pré-plantio e sua influência na produção e qualidade dos bulbos formados, além de avaliações de seus impactos na eficiência no uso de reservas, atividade de enzimas antioxidantes e alterações metabólicas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Experiência *in vitro***

Nos experimentos *in vitro*, foi utilizado um padrão de 3-(2-Hidroxi)etilindol com 97% de pureza (Sigma-Aldrich), bulbos de alho classificados em tamanho (16 mm) e peso ( $5,5 \pm 0,5$  g), estes foram imersos em solução TOL (0, 3, 8, 12 e 16  $\mu\text{M}$ ) por 60 minutos, usando 10 mL bulbilho<sup>-1</sup>. Os bulbilhos tratados foram plantados em copos de 300 cm<sup>3</sup> com areia e cultivados em câmara de crescimento tipo BOD com fotoperíodo de 12 h, 25°C dia e 18°C noite. O comprimento da parte aérea foi avaliado após 7 e 14 dias. Após 14 dias, também foram avaliados peso e volume da parte aérea, classe, número de fibras, diâmetro, área e peso das raízes. A alocação de nutrientes na planta foi calculada pela relação parte aérea/raiz (P.A./R.).

### **2.2. Experimento de campo**

Os experimentos de campo foram conduzidos em área irrigada no município de São Gotardo - MG (19°26'53"S 46°14'35"W) no período de março a junho de 2020 e 2021; a acidez do solo foi corrigida com calcário calcinado 4 toneladas por hectare (44%CaO, 22%MgO). Inseticida, fungicida e bactericida foram aplicados conforme a necessidade da cultura em toda a área plantada. As adubações totais foram: 300 kg de N, 543 kg de P, 375 K, 20 kg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 kg de MgSO<sub>4</sub> e 20 kg de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por ha a cada ano.

Cada tratamento utilizou 5 kg de bulbos de semente de alho geração 1, variedade Ito, classificados em peneira de 16 mm, já submetidos ao processo de vernalização à temperatura de  $1 \pm 2$  °C por 52 dias.

No pré-plantio, os bulbilhos foram imersos em solução de Triptofol (0, 3, 8 e 12  $\mu\text{M}$  TOL) por 60 minutos; junto a esta solução foram adicionados fungicidas e bactericidas comerciais usados rotineiramente na fazenda.

O plantio foi realizado em parcelas de 2,5 metros, cerca de 220 plantas por bloco (370,4 mil plantas por ha) e três blocos por tratamento, canteiro de 2,40 metros de largura com quatro fileiras duplas e espaçamento entre plantas de 9 cm.

O comprimento da parte aérea e as avaliações visuais de fitotoxicidade foram realizadas 7, 14 e 21 dias após o plantio, usando uma régua milimétrica e 25 plantas aleatórias por bloco para medição.

### **2.3. Análises Bioquímicas**

A quantificação de proteínas solúveis totais (PTS) e atividade enzimática foi realizada com folhas frescas ( $n=5$ ) coletadas sete dias após o plantio. As folhas foram maceradas com gral e pistilo utilizando nitrogênio líquido. 200 mg do material triturado foram pesados em um micro tubo de 2 mL, 1500  $\mu\text{L}$  da mistura foram adicionados (750  $\mu\text{l}$  200 mM tampão de fosfato de potássio, pH 7,8, 15  $\mu\text{l}$  10 mM ácido etilenodiamina (EDTA), 150  $\mu\text{L}$  200  $\mu\text{l}$  ácido ascórbico mm e 585  $\mu\text{l}$  de água ultrapura) e vórtex por 5 minutos. Foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, obtendo-se o extrato enzimático.

A quantificação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), onde 10  $\mu\text{L}$  de extrato, 40  $\mu\text{L}$  de solução de NaOH 1 mol  $\text{L}^{-1}$  e 2,5 mL de solução de *Coomassie Blue* foram transferidos para um tubo de ensaio e homogeneizados no vórtice, em seguida, realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm, os valores obtidos foram calculados com base na curva padrão da albumina (BRADFORD, 1976; SPEROTTO, 2014).

Para determinar a atividade da catalase (CAT), 1000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0 e 860  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (900  $\mu\text{L}$  para o branco) foram adicionados aos tubos de ensaio e permaneceram em banho-maria a 27°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  250 mM e 40  $\mu\text{L}$  de extrato. Imediatamente após a adição do extrto, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 240 nm, com leitura cinética a cada 10 segundos durante 1 minuto (AEBI, 1984; SPEROTTO, 2014).

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX) foi determinada pela adição de 1000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM e 775  $\mu\text{L}$  de água ultrapura em um tubo de ensaio e deixado em repouso a 27 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 2 mM e 25  $\mu\text{L}$  de extrato (água foi utilizada para o branco). Uma leitura cinética foi realizada a cada 10 segundos (6 vezes) a 290 nm (SPEROTTO, 2014),

para calcular a atividade específica da enzima; foi utilizado o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NAKANO; ASADA, 1981). As leituras foram feitas com um espectrofotômetro UV/VIS de feixe duplo (PerkinElmer, LAMBDA25) em cubetas de quartzo de 1 cm de comprimento.

Os bulbilhos semente ( $n=5$ ) foram avaliados em 7, 14 e 21 dias após plantio, quanto ao teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) por leitura direta do tecido macerado, em refratômetro analógico (VODEX, VX090). Após todo o bulbilho ser macerado 1 g foi adicionado a um volume de 25 ml de água destilada e aferido o potencial hidrogeniônico (pH) por leitura direta com pHmetro (Lab100, mPA210), em seguida, foi adicionado 2 gotas de solução hidroalcoólica de fenolftaleína 1% e titulada com solução de hidróxido de sódio 0,05 M e calculado a acidez titulável em  $\text{mEq H}_3\text{O}^+/\text{100g}$  (BESSA et al., 2018). Para a determinação da proteína solúvel total foi utilizada a metodologia de Bradford.

Após 120 dias do plantio, as plantas foram coletadas e permaneceram por 30 dias secando à sombra em sistema de pendura. Em seguida, foram retiradas a parte aérea e as raízes, e os bulbos ( $n=200$ ) foram pesados e classificados em sistema de peneira vibratória: classe 3 ( $<45 \text{ mm}$ ), classe 4 (46-55 mm), classe 5 (56-65 mm), classe 6 (66-75 mm), classe 7 (76-85 mm) e classe 8 ( $> 85 \text{ mm}$ ). A produção de cada tratamento foi obtida a partir do peso dos bulbos coletados. No ano agrícola de 2021, o experimento foi repetido em nível de campo, avaliando-se a produção e classificação.

#### **2.4. Metabolômica não direcionada com base na análise CG-MS**

Após sete dias de plantio, foram coletadas plantas para análise CG-MS ( $n=5$ , cada unidade experimental foi composta por três diferentes plantas). A análise dos metabólitos das plantas do grupo controle e das tratadas com  $12 \mu\text{M}$  de TOL foram avaliadas no ano agrícola de 2021. Um grama de tecido fresco, foliar e raiz, foram homogeneizados em 9 mL de solução de água/metanol (80:20) com um dispersor tipo Turrax por 1 minuto a 18000 rpm (Ultra Turrax T25-IKA). Em seguida, 1 mL do extrato foi centrifugado a 10.000 rpm. Em um frasco, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram concentrados sob injeção de nitrogênio (Concentrador TE019-Tecnal). O material seco foi solubilizado com 120  $\mu\text{L}$  de solução de cloridrato de metoxilamina (20 mg  $\text{mL}^{-1}$  de piridina) e 40  $\mu\text{L}$  de solução de ribitol (2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), utilizado como padrão interno, em sistema fechado por 60 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  para a formação de oximas. Para as reações de silição, 40  $\mu\text{L}$  de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida-BSTFA com 1% cloreto de trimetilsilila-TMCS foram adicionados e deixados em repouso por mais 60 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ , transferidos para inserts de 200  $\mu\text{L}$  (BENEDÉ et al., 2019; DING et al., 2017; NIKOLOVA et

al., 2019a). Para a amostra de controle de qualidade (QC), foi utilizada uma mistura de plantas de ambos os tratamentos.

Para análise dos extratos, foi utilizado um cromatógrafo a gás com espectro de massas (Shimadzu CG-MS Q2010 Ultra) com auto-injetor AOC-20i. 1  $\mu$ L da amostra foi injetado com temperatura do injetor a 240°C, com uma razão split para injeção de 1:20. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e velocidade linear como modo de controle de vazão. A coluna capilar utilizada foi a Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), com programação isotérmica por 2 minutos a 80°C, rampa de temperatura de 5°C min<sup>-1</sup> até 300°C, a qual permaneceu por 3 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons 240 °C e interface 280°C, a ionização realizada por impacto de 70 eV, varredura do espectro de massas de 45-700 m/z. O tempo de corte do solvente foi de 3 minutos (LEE et al., 2016a; NIKOLOVA et al., 2019a)

Os dados extraídos do CG-MS no formato mzML foram convertidos para *analysis base framework* (ABF) usando o conversor *AbfConverter*. Uma vez reconhecida a compatibilidade com o software MS-DIAL. Em seguida, os cromatogramas foram alinhados, deconvoluídos e identificados no MS-DIAL 4.70 adotando parâmetros semelhantes aos descritos por Leite (2021) para detecção de pico: método de suavização, média móvel ponderada linear; nível de suavização, três varreduras; largura média do pico, 20 varreduras; altura mínima do pico, amplitude 1000 (LEITE; REIS; PINTO, 2021). Parâmetros de deconvolução: valor da janela Sigma, 0,5; Corte espectral de ionização por elétrons (EI), amplitude 10. Configurações de identificação: índice de retenção (IR); Arquivo MSP, banco de dados CGMSDB-Public-KovatsRI-VS3, para confirmação, os metabólitos foram identificados usando correspondência espectral ( $\geq 85\%$  semelhante), usando a biblioteca espectral de massa NIST 2014 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia); tolerância RI usando uma mistura de alcanos (C7 - C30, Sigma-Aldrich); tolerância RT, 0,5; tolerância m/z, 0,5; Corte de similaridade EI, 85%; pontuação de identificação de corte, 85% (LAI et al., 2018a). O padrão interno ribitol normalizou os metabólitos identificados e os valores normalizados foram usados para comparações estatísticas.

As análises estatísticas foram realizadas usando o Metaboanalyst 4.0, um programa baseado em R projetado para metabolômica. Valores não presentes em 25% dos dados foram removidos da análise e os dados foram filtrados por desvio padrão relativo, normalização por soma, transformação de log (base 10) e escalonamento automático.

Os metabólitos detectados foram comparados em dois grupos, o grupo controle e com a aplicação de 12  $\mu$ M de TOL, em seguida foram realizadas análises univariadas de *fold change*

(FC), teste T de Student, onde p-valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Aplicou-se também uma abordagem estatística multivariada, aplicando Análise de Componentes Principais (PCA) e aplicando modelos gráficos de mapas de calor baseados no cluster hierárquico, onde foi avaliada a medida de similaridade de compostos por medida de distância euclidiana (LEE et al., 2016). Os metabólitos com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foram submetidos à análise de rota metabólicas usando a biblioteca de vias metabólicas da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) de *Arabidopsis thaliana* como base para a compreensão de possíveis alterações metabólicas no tecido. A Taxa de Descoberta Falsa (FDR < 0,05) foi adotada para o critério de impacto significativo.

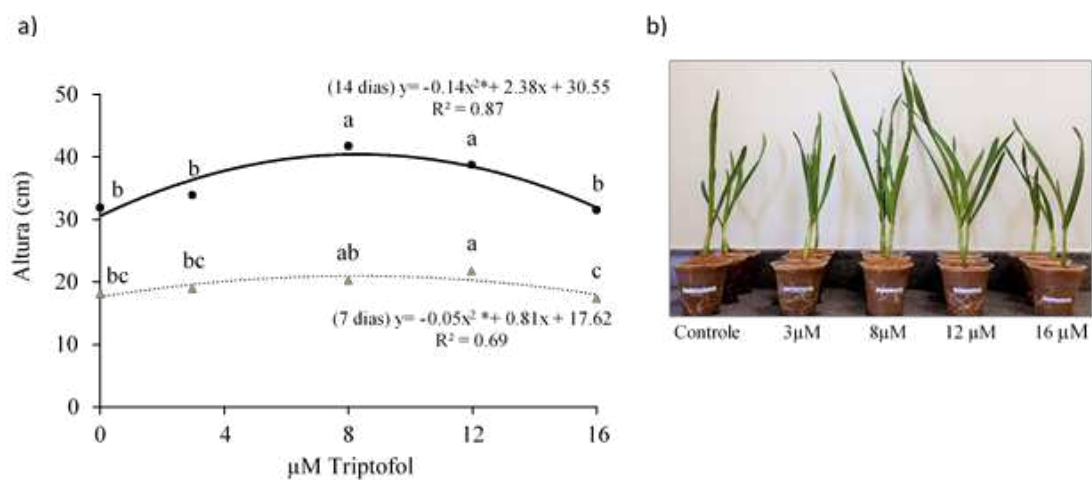
## **2.5. Análise de Dados**

Para todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey e análise de regressão; foram adotadas 5 repetições para cada tratamento; nas figuras, letras diferentes são usadas para indicar médias que diferem significativamente ( $P < 0,05$ ), os dados foram analisados no programa RStudio. As raízes foram analisadas no software Safira e os parâmetros radiculares foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) no software Past 3.0.

### 3. Resultados

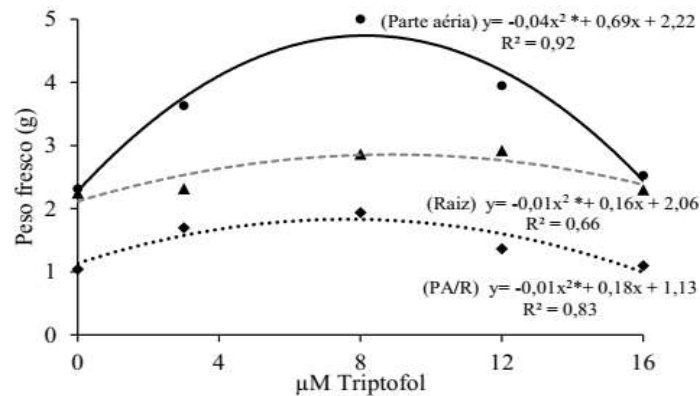
#### 3.1. Experimento *in vitro*

TOL aplicado aos bulbilhos induziu á brotação dos bulbilhos e o crescimento da parte aérea das plantas. Aos 7 e 14 dias após o plantio, conduzido em vasos, as plantas apresentavam resposta quadrática para o parâmetro comprimento foliar em função da concentração, com as melhores respostas obtidas nos tratamentos de 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL em ambos os dias (Figura 01).



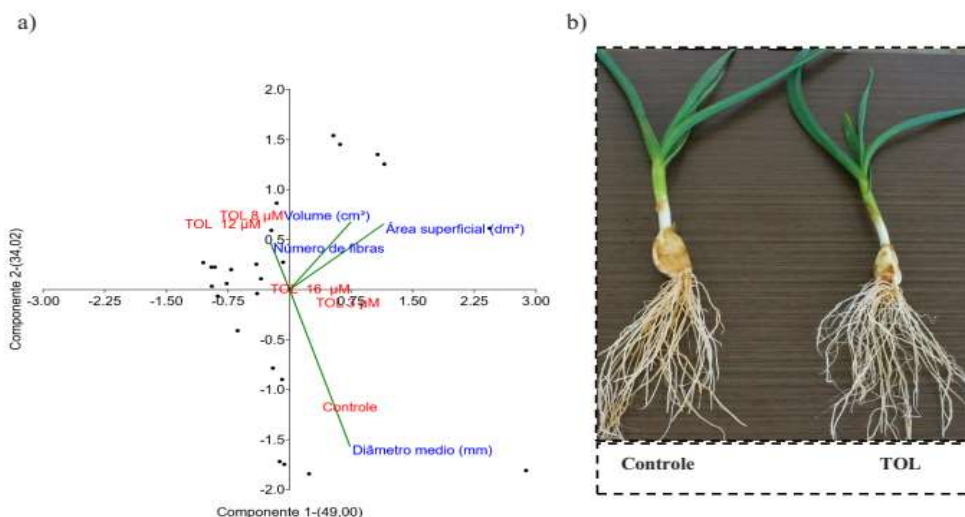
**Figura 01-** Altura (cm) de plantas de alho tratadas com TOL em pré-plantio, 7 e 14 dias após plantio (a) e imagem ilustra plantas de alho após 14 dias de plantio (b), cultivadas em câmara de crescimento tipo BOD a 25°C dia e 18°C noite, fotoperíodo de 12 horas. Letras diferentes se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, \* modelo de regressão significativo a nível de 5%.

O tratamento com TOL também proporcionou ganho mais significativo de massa fresca da parte aérea e raízes em função da concentração (Figura 02). O tratamento com 8  $\mu\text{M}$  de TOL apresentou o maior peso médio da parte aérea. Para o peso da raiz, as doses de 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL apresentaram maiores médias. Plantas tratadas com 3, 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL apresentaram maior alocação de recursos para síntese foliar, com maiores médias para a relação P.A./R. (Figura 02).



**Figura 02-** Peso fresco (g planta<sup>-1</sup>) da parte aérea, da raízes e razão parte aérea/raiz (PA/R) em plantas de alho tratadas com TOL em pré-plantio, após 14 dias de plantio, cultivadas em câmara de crescimento tipo BOD a 25°C dia e 18°C noite, fotoperíodo de 12 horas. Letras diferentes se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, \* modelo de regressão significativo a nível de 5%.

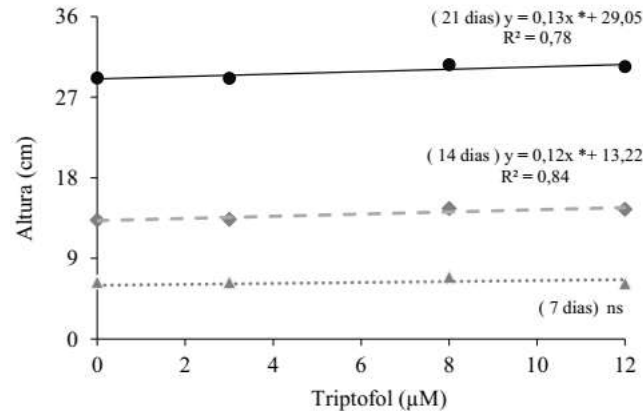
A aplicação de TOL nos bulbilhos apresentou efeitos sobre o sistema radicular das plantas após 14 dias de plantio, onde parâmetros como área superficial, volume, número de fibras e diâmetro médio de raízes, analisados em conjunto, via análise multivariada PCA (Figura 03-a), demonstraram que o grupo controle apresentou raízes de maior diâmetro, em contra partida plantas tratadas com 8 e 12 µM de TOL apresentaram maior volume, área superficial de raiz e maior número de fibras, evidenciando maior expansão de raízes secundárias (Figura 03-b), fato que favorece o desenvolvimento das plantas devido a maior área de contato do sistema radicular, possibilitando uma maior e melhor absorção de água e nutrientes do solo.



**Figura 03-** Análise de componentes principais (ACP) com base nas variáveis do sistema radicular de plantas tratadas com TOL em pré-plantio (a) e foto evidenciando diferenças visuais do sistema radicular de plantas com e sem aplicação de TOL, após 14 dias de plantio, em câmara de crescimento tipo BOD a 25°C dia e 18°C noite, fotoperíodo de 12 horas (b).

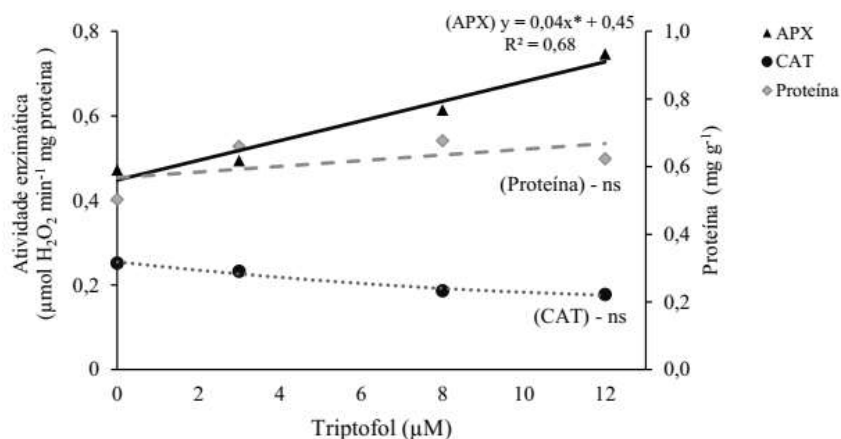
### 3.2. Experimento de campo

O potencial bioestimulante do TOL observado em experimento *in vitro* permitiu identificar as doses mais efetivas, portanto, a dose de 16  $\mu\text{M}$  de TOL não foi utilizada no experimento de campo. O desenvolvimento da parte aérea das plantas tratadas com as concentrações de 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL foi superior ao do controle e 3  $\mu\text{M}$  aos 14 e 21 dias (Figura 04), resultado semelhante ao obtido no experimento *in vitro*.



**Figura 04-** Altura (cm) de planta de alho tratadas com TOL em pré-plantio, 7, 14 e 21 dias após plantio em campo. Letras diferentes se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, \* modelo de regressão significativo a nível de 5%.

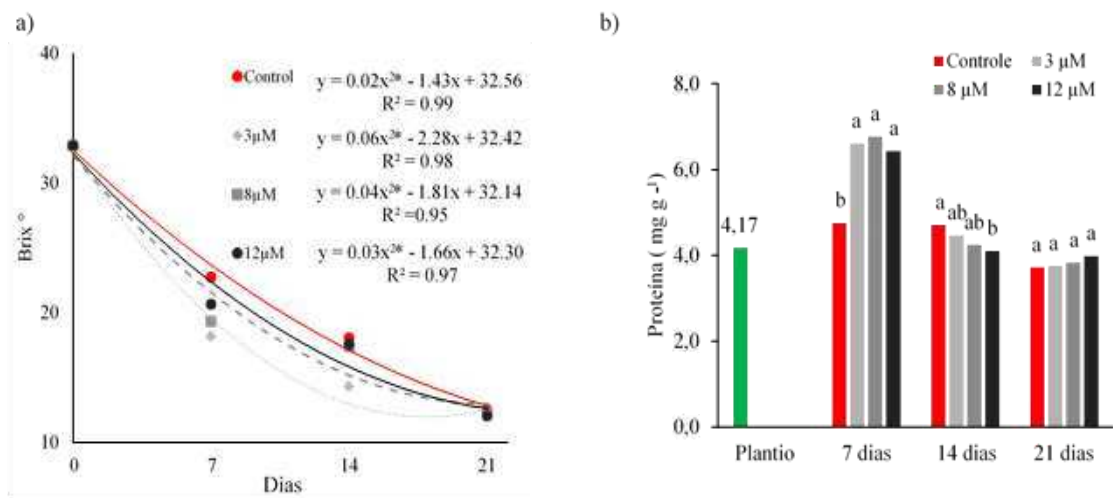
Após o período de emergência (7 dias), as plantas tratadas com TOL apresentaram maiores teores médios de proteína solúvel nas folhas do que no grupo controle. Além de apresentar alterações na atividade da enzima APX, com resposta quadrática, as maiores médias foram obtidas nas doses de 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL. A enzima CAT não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 05).



**Figura 05-** Atividade das enzimas antioxidantes catalase, ascorbato peroxidase e teor de proteína solúvel total da parte aérea de plantas tratadas com TOL em pré-plantio, folhas analisadas após 7 dias de plantio no campo. Letras diferentes se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, \* modelo de regressão significativo a nível de 5%.

A ação do TOL sobre bulbilhos plantados durante a emergência não apresentou alterações nos parâmetros de pH e acidez entre os tratamentos. Quanto ao teor de sólidos solúveis dos bulbilhos, foi possível observar que as plantas tratadas com TOL apresentaram maior consumo de carboidratos de reserva aos 7 e 14 dias após o plantio (Figura 06-a), comportamento que pode estar relacionado ao maior desenvolvimento das plantas.

Bulbilhos tratados com TOL aos 7 dias de plantio apresentaram maiores médias de proteína solúvel em relação ao dia do plantio e ao grupo controle, evidenciando uma maior atividade na síntese proteica no início da brotação. Com decorrer dos dias essas concentrações reduziram e apresentaram próximas ao grupo controle (Figura 06-b).



**Figura 06** - Teor de sólidos solúveis totais (°Brix) (a) e teor de proteína solúvel total (b) dos bulbilhos tratados com TOL, avaliados em pré-plantio e 7, 14 e 21 dias após plantio no campo. Letras diferentes se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, \* modelo de regressão significativo a nível de 5%.

Na safra de 2021 as plantas tratadas com TOL em todas as concentrações, apresentaram produção média superior ao controle, no cultivo do ano de 2020 apenas plantas tratadas com 12 μM de TOL tiveram médias de produção significativamente superior (tabela 01). Evidenciando que a aplicação de 12 μM de TOL aos bulbilhos potencializa a produção de alho.

**Tabela 01-** Classificação de bulbos em porcentagem e produção estimada em toneladas por hectare, das safras 2020 e 2021 produzidas em experimento de campo.

Tratamento	classe 3	classe 4	classe 5	classe 6	classe 7	classe 8	Produção (ton ha <sup>-1</sup> )
<b>Safra 2020 (%)</b>							
Control	1.75 a	5.70 a	20.44 a	38.02 b	31.11 a	2.97 a	11.38 b
TOL 3 µM	1.53 a	5.20 ab	18.44 a	38.67 ab	34.04 a	2.13 a	11.48 b
TOL 8 µM	2.20 a	4.70 ab	20.95 a	38.53 ab	30.93 a	2.71 a	11.60 b
TOL 12 µM	0.47 a	3.93 b	19.40 a	41.87 a	31.87 a	2.47 a	12.57 a
<b>Safra 2021(%)</b>							
Control	2.95 a	23.98 a	30.99 a	15.90 b	19.11 c	7.05 a	11.24 b
TOL 3 µM	0.67 a	6.90 b	17.34 b	24.07 ab	42.76 a	8.25 a	12.83 a
TOL 8 µM	1.71 a	11.16 b	21.01 ab	26.05 a	30.83 b	9.26 a	12.56 a
TOL 12 µM	1.69 a	6.83 b	17.30 b	21.65 ab	42.68 a	9.83 a	12.89 a

\*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey (n=200 plantas).

Os bulbos foram classificados pelo diâmetro, uma categorização comercial para avaliar a qualidade do alho. Os bulbos de alho colhidos na safra 2020 não apresentaram diferença significativa nas classes 3, 5, 7 e 8 em todos os tratamentos. Para a classe 6, que possui maior valor comercial, o tratamento com 12 µM de TOL proporcionou maior produção. Na safra de 2021, as classes 3 e 8 não diferiram significativamente entre os tratamentos. Os grupos tratados com TOL tiveram menor proporção das classes 4 e 5 e maior proporção das classes 6 e 7, de maior valor comercial. Além de apresentar maior produção, as plantas tratadas com TOL proporcionaram maior percentual de alho comercial, somando as classes 5, 6 e 7, o que impacta diretamente na rentabilidade da cultura, pois são classes de maior valor agregado.

### 3.3. Análise metabolômica não direcionada

Metabolômica não direcionada baseada em CG-MS foi aplicado para elucidar o efeito do TOL no pré-plantio de bulbilhos. Este trabalho avaliou o perfil metabólico da parte aérea e do sistema radicular de plantas tratadas com 12 µM de TOL e sem aplicação (Controle). Cromatogramas das amostras QC constam no material suplementar (Figura 01 raízes e figura 02 parte aérea).

### 3.3.1. Análise metabolômica não direcionada das raízes

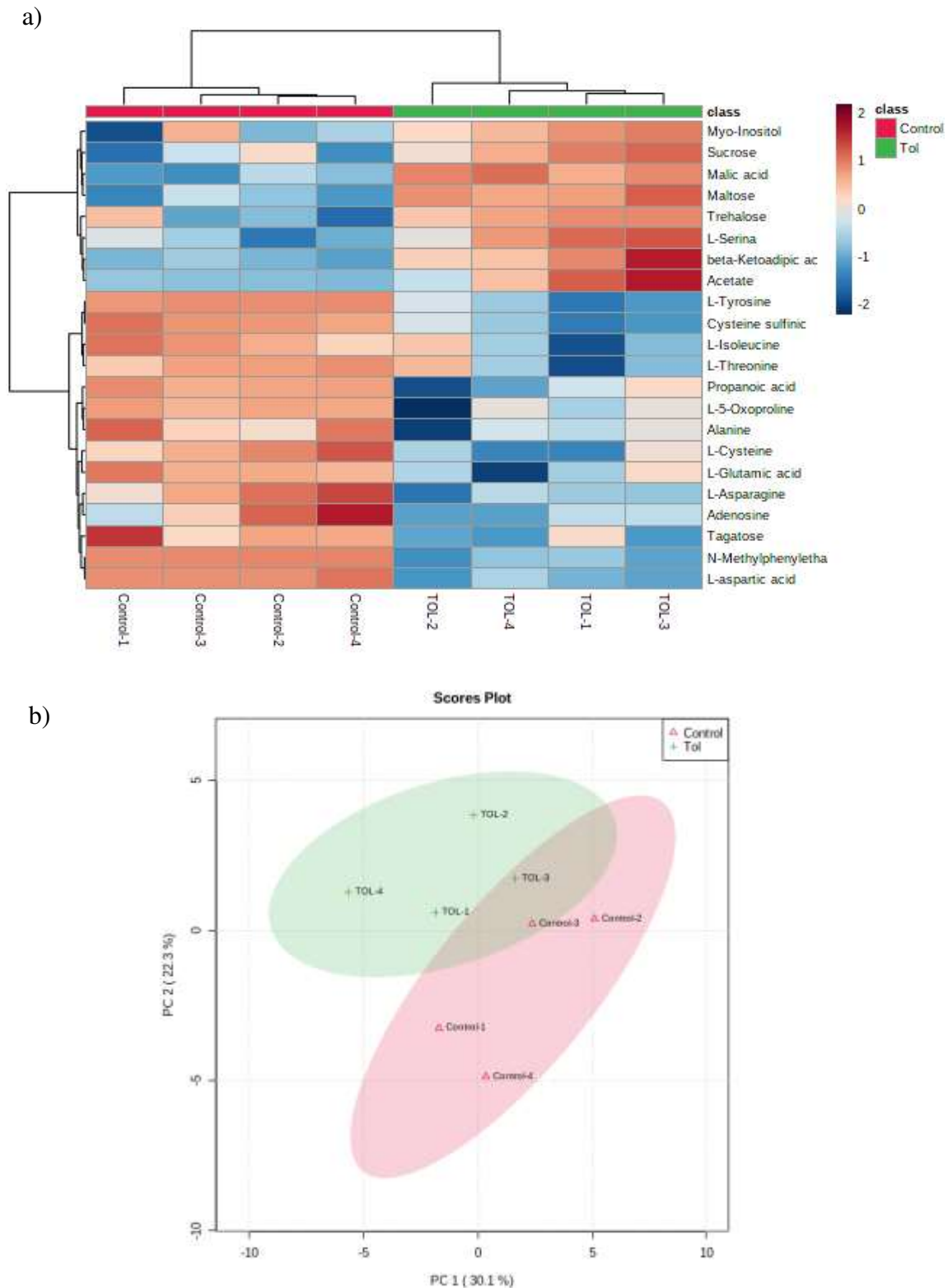
A análise do perfil metabólico do extrato da raiz identificou 80 metabólitos. As análises univariadas identificaram diferentes concentrações em 13 compostos ( $p < 0,05$ ), de forma que todas as combinações tiveram maior concentração no grupo controle (Tabela 02), com valor de FC maior que 01 e clara separação em mapa de calor dos metabólitos (Figura 07-a) que diferem significativamente. A análise de componentes principais permitiu agrupar cada tratamento pela diferença no perfil metabólico entre o grupo controle e o tratamento TOL 12  $\mu\text{M}$ . Os componentes principais, PC 1 e PC 2, descreveram 52,4% da variância total entre os grupos (Figura 07-b).

A menor concentração de metabólitos no tecido radicular das plantas tratadas com TOL sugere uma alta translocação e consumo desses metabólitos em resposta ao desenvolvimento mais significativo do sistema radicular.

Em relação ao distúrbio nas vias metabólicas, os metabólitos da raiz com médias diferentes entre os tratamentos avaliados por meio do Software MetaboAnalyst 4.0 não identificaram impacto significativo ( $\text{FDR} < 0,05$ ) nas rotas envolvendo os metabólitos avaliados.

**Tabela 02-** Metabólitos identificados nos extratos de raízes de plantas de alho que são significativamente diferentes pelo test-T ( $p < 0,05$ ) entre o grupo Controle e o tratamento com 12  $\mu\text{M}$  de TOL.

Metabolitos	Valor p	x- mudança de dobra (Controle/TOL)
D-Frutose	$2,73 \times 10^{-3}$	1,73
Ácido fumarico	$2,43 \times 10^{-3}$	1,77
Ácido málico	$1,72 \times 10^{-3}$	1,91
Ácido succínico	$2,64 \times 10^{-3}$	1,59
Ácido glicérico	$2,09 \times 10^{-4}$	1,63
Ácido gluconico	$2,07 \times 10^{-3}$	2,55
Ácido etoxiacético	$4,21 \times 10^{-3}$	5,97
L-Tirosina	$1,46 \times 10^{-3}$	3,50
L-Valina	$4,87 \times 10^{-3}$	3,82
Cadaverina	$4,62 \times 10^{-3}$	4,79
Halostachina	$1,42 \times 10^{-3}$	1,62
Etanolamina	$2,04 \times 10^{-4}$	4,10
Trietanolamina	$8,06 \times 10^{-4}$	2,12



**Figura 07-** Os extratos de raízes apresentaram 13 metabolitos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) indicados no mapa de calor e agrupados por mensuração de distância Euclidiana (a) e gráfico de análise de componentes principais para grupo controle (rosa) e tratamento com  $12\mu\text{M}$  de TOL (verde) (b). PC1 representa 30,1 % e PC 2 22,3 % do comportamento entre os tratamentos.

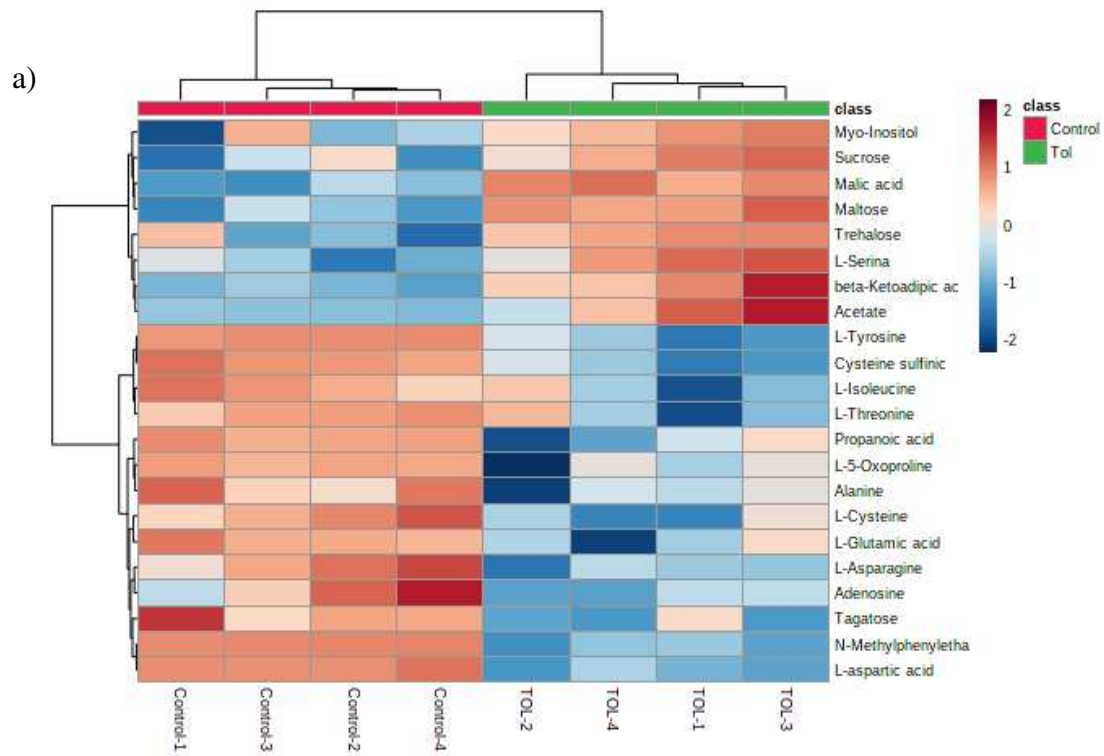
### 3.3.2. Análise metabolômica não direcionada da parte aérea

Para o extrato da parte aérea das plantas controle e tratadas com TOL 12  $\mu\text{M}$ , foi possível identificar 70 metabólitos. Destes, o teste t de Student identificou 22 metabólitos que diferiram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 03). O tratamento controle apresentou maior concentração de aminoácidos, alanina, 5-oxoprolina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, isoleucina, treonina, cisteína, do carboidrato tagatose e ácido propanóico, nucleotídeo adenosina e metabólitos o ácido cisteína sulfínico e halostachine. Plantas tratadas com 12  $\mu\text{M}$  de TOL apresentaram maior concentração de carboidratos sacarose, maltose, trealose e mio-inositol, ácidos acético, málico e cetoadípico e o aminoácido serína.

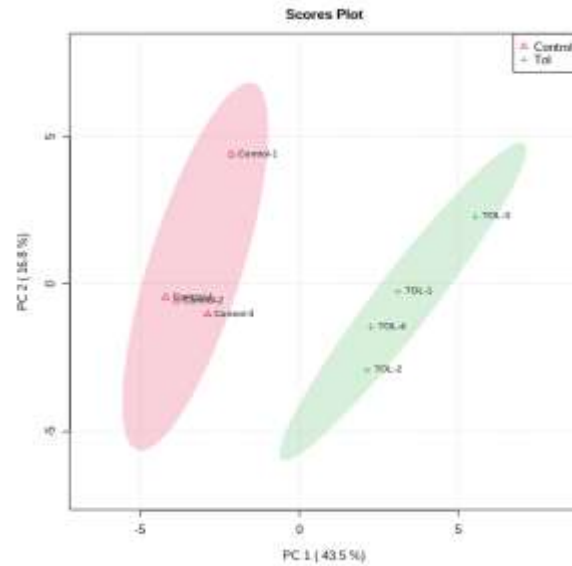
Em relação ao metabolismo da parte aérea a análise de mapa de calor dos metabólitos que diferem significativamente entre os tratamentos (Figura 08-a) ilustra essas diferenças e demonstra a capacidade da metabolômica direcionada em classificar plantas de alho com bulbilhos tratados ou não. A análise dos componentes principais possibilitou evidenciar diferenças existentes entre os perfis metabolômico do grupo controle e tratamento com 12  $\mu\text{M}$  de TOL. Os componentes PC 1 e PC 2 descrevem 60,3% da variância total entre os grupos (Figura 08-b).

**Tabela 03-** Metabólitos identificados nos extratos da parte aérea das plantas de alho que são significativamente diferentes pelo test-T ( $p < 0,05$ ) entre o grupo Controle e o tratamento com 12  $\mu\text{M}$  de TOL. Linha vermelha indica o limiar entre valores de FC inferiores a 1.

Metabólitos	Valor p	x- mudança de dobra (Controle/TOL)
Maltose	$4.77 \times 10^{-5}$	0.44
Myo-Inositol	$4.80 \times 10^{-3}$	0.30
Sucrose	$2.20 \times 10^{-3}$	0.20
Trehalose	$1.83 \times 10^{-3}$	0.26
Acetate	$1.29 \times 10^{-3}$	0.42
Malic acid	$1.59 \times 10^{-5}$	0.16
b-Ketoadipic acid	$2.0 \times 10^{-4}$	0.71
L-Serina	$8.44 \times 10^{-4}$	0.23
Alanine	$4.42 \times 10^{-3}$	1.55
L-Asparagine	$4.10 \times 10^{-4}$	20.98
L-5-Oxoproline	$3.97 \times 10^{-3}$	12.98
L-Cysteine	$8.52 \times 10^{-4}$	2.08
L-Isoleucine	$2.81 \times 10^{-3}$	2.18
L-Glutamic acid	$2.40 \times 10^{-3}$	2.65
L-aspartic acid	$2.70 \times 10^{-4}$	4.30
L-Tyrosine	$9.56 \times 10^{-4}$	6.68
L-Threonine	$3.68 \times 10^{-3}$	1.83
Propanoic acid	$1.95 \times 10^{-3}$	4.99
Tagatose	$9.11 \times 10^{-4}$	14.97
Adenosine	$2.83 \times 10^{-3}$	5.00
Halostachine	$9.00 \times 10^{-6}$	9.21
Cysteine sulfinic acid	$1.72 \times 10^{-4}$	6.60

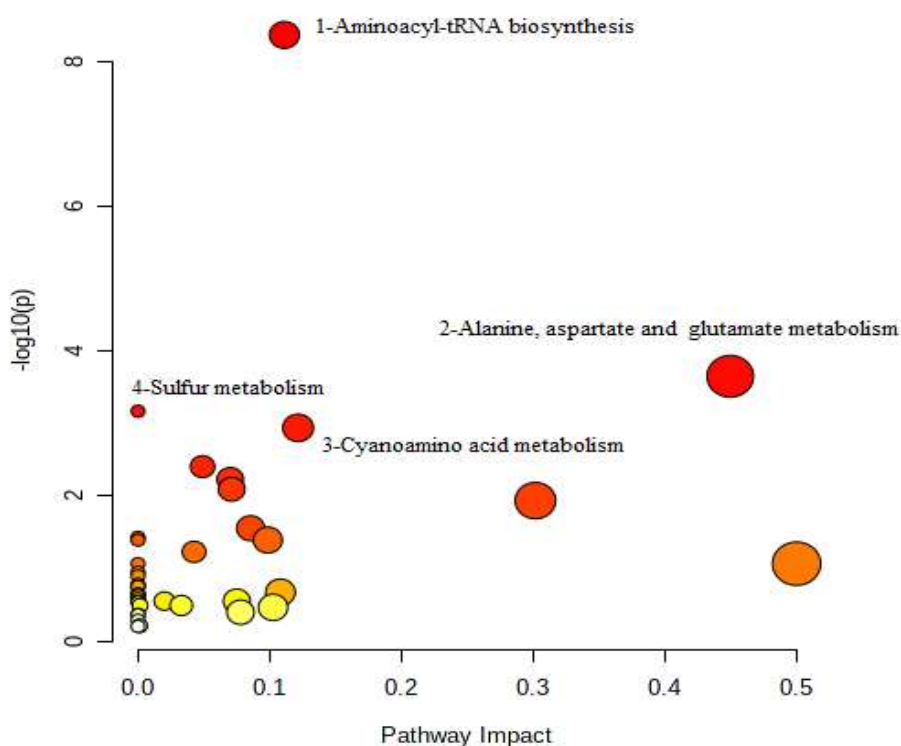


b)



**Figura 08-** Os extratos da parte aérea apresentaram 22 metabólitos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) indicados no mapa de calor e agrupados por mensuração de distância Euclideana (a) e gráfico de análise de componentes principais para grupo controle (rosa) e tratamento com  $12\mu\text{M}$  TOL (verde) (b). PC1 representa 43,5 % e PC2 16,8 % do comportamento dos grupos.

Os metabólitos da parte aérea com médias significativamente diferentes entre os dois tratamentos, sete dias após o plantio estão envolvidos em várias vias metabólicas. A variabilidade da concentração destes compostos gera perturbação em vias biológicas importantes, sendo identificado maior impacto (FDR<0,05) em quatro vias caracterizadas pelo Software MetaboAnalyst 4.0 (Figura 09), sendo, biossíntese de aminoacil-tRNA, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo de cianoaminoácido e metabolismo do enxofre, a lista de vias e valores de significância está disponível na Tabela suplementar 01.



**Figura 09**-Análise de enriquecimento de via dos principais metabólitos da parte aérea das plantas de alho – O impacto do caminho é determinado por análise topológica (eixo x) e o enriquecimento por  $-\log_{10}(P)$  valor ajustado pelo valor P original (eixo y). A cor do nó é baseada em seu valor P e o tamanho do nó é baseado nos valores de impacto da via. As vias metabólicas que apresentaram impactos significativos ( $P < 0,05$ ) e *False Discovery Rate* (FDR) inferior a 0,05% estão enumeradas de 1 a 4 com respectivos nomes.

#### 4. Discussão

Visto a conversão de TOL a IAAId em diferentes espécies de plantas como *Cucumis sativus* (BROWN; PURVES, 1976; VICKERY; PURVES, 1972); *Pinus sylvestris* (SANDBERG, 1984), *Phaseolus vulgaris* (ZHU; SCOTT, 1995), *Pisum sativum* (QUITTENDEN et al., 2009), a aplicação exógena de TOL como fitohormônio vem sendo relatada em diferentes culturas. Estudos com *Arabidopsis thaliana* demonstram que o TOL influencia a arquitetura do sistema radicular (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). A cultura *Phaseolus vulgaris* aumentou as concentrações de pigmentos fotossintéticos e estimulou o crescimento da parte aérea e do sistema radicular (DO NASCIMENTO et al., 2016). A cultura do milho proporcionou maior altura e massa seca das plantas (SARWAR; FRANKENBERGER, 1994). O uso de TOL no tratamento de bulbilhos de alho apresentou resultados semelhantes aos obtidos com outras culturas, uma vez que as plantas tratadas com TOL apresentaram maior comprimento foliar e maior massa de folhas e raízes. Além de influenciar positivamente o sistema radicular, proporcionou maior volume radicular e área superficial, favorecendo a absorção de nutrientes e água no solo. Segundo AHMED et al.(2007), bulbilhos que apresentam melhor crescimento vegetativo devido ao rápido estabelecimento da planta proporcionam melhor desenvolvimento dos bulbos formados e maior produtividade (AHMED et al., 2007).

Para elucidar a influência positiva do TOL no desenvolvimento inicial da planta, avaliou-se a cinética de consumo das reservas energéticas via análise de sólidos solúveis totais e proteínas solúveis totais. A resposta do TOL em diferentes doses é dependente, e os melhores resultados foram obtidos com 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL. Aos 7 dias após o plantio, os bulbilhos tratados com TOL apresentaram maiores médias de proteína solúvel, e o teor de sólidos solúveis totais apresentou queda mais acelerada do que o grupo controle. Tais resultados sugerem um melhor aproveitamento das reservas energéticas, uma vez que a principal fonte de reserva nos bulbos-semente é o amido. O processo de brotação requer enzimas para hidrolisá-lo, liberando mono e oligossacarídeos. Corroborando com esses dados, o teor de PST nas folhas e a atividade da enzima APX foram maiores no tratamento com TOL. O metabólito da asparagina é um dos principais transportadores de nitrogênio das raízes para as folhas. No entanto, a análise metabolômica revelou que as plantas tratadas com TOL apresentaram concentrações menores do que o grupo controle. Mesmo com este transportador em proporções menores, as plantas apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea, mostrando que as plantas tratadas com TOL aproveitam melhor suas reservas.

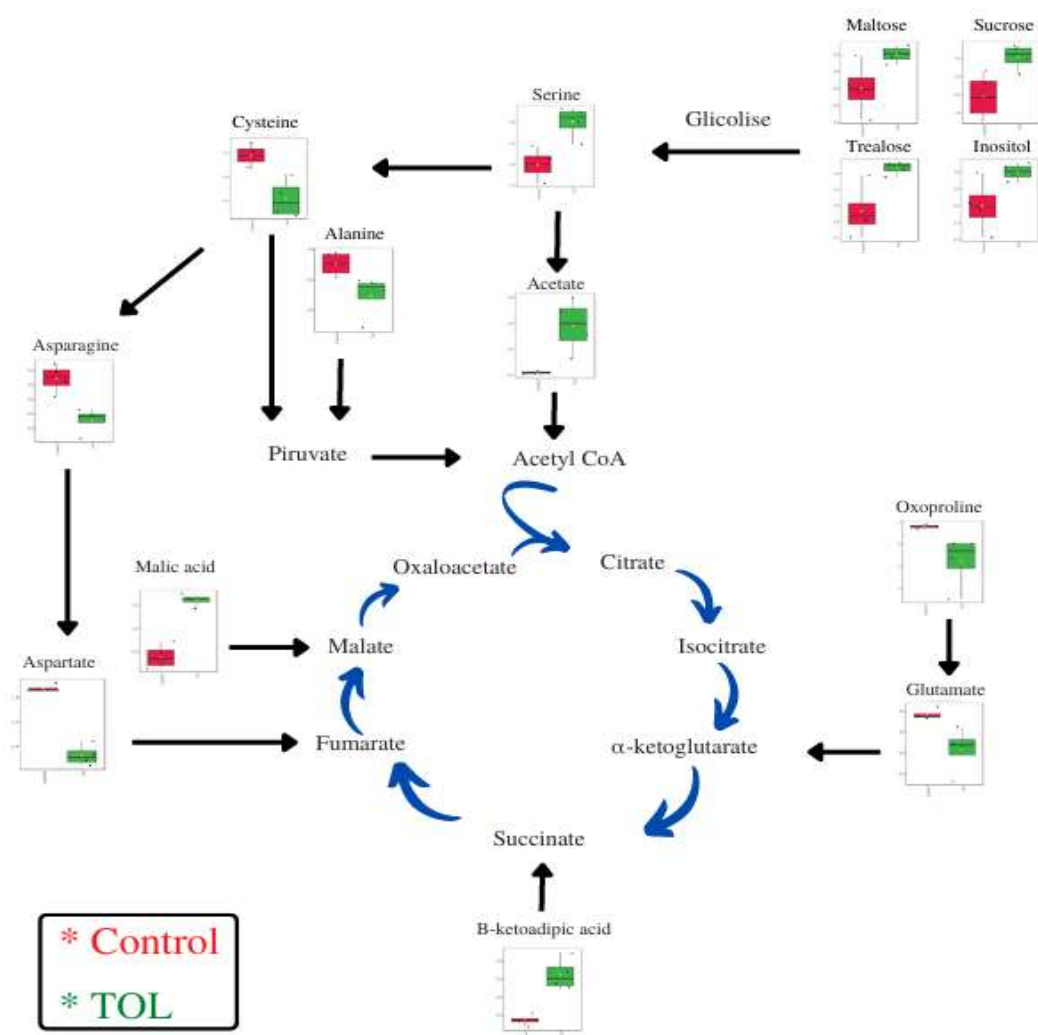
Os bulbos de sementes utilizados nos experimentos foram submetidos à vernalização. Esse processo leva ao acúmulo de citocinas e giberelina, modificando o equilíbrio hormonal, o que leva os bulbilhos vernalizados a se desenvolverem mais rapidamente em altas temperaturas do que em baixas temperaturas (RESENDE et al., 2011). Segundo KAPLAN et al.(2004), o choque térmico no metabolismo de *Arabidopsis* afeta vários aspectos do metabolismo de aminoácidos e carboidratos, alterando os níveis de vários metabólitos, como aminoácidos derivados de oxaloacetato e piruvato, além de asparagina, leucina, isoleucina, treonina, alanina e valina, e os ácidos orgânicos precursores do oxaloacetato, como fumarato e malato (KAPLAN et al., 2004). Além de metabólitos contendo amina, como  $\beta$ -alanina, GABA e putrescina de carboidratos precursores da parede celular e monossacarídeos, como maltose, sacarose, galactinol, mio-inositol e rafinose.

A análise metabolômica das raízes não evidenciou alteração das rotas metabólicas entre o controle e o tratamento com TOL, mas os metabólitos: ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico, os aminoácidos L-valina e L-tirosina, e as aminas cadaverina e di e trietanolamina apresentam menor teor em plantas tratadas com TOL. Outro fator a ser destacado é que o TOL, aplicado de forma exógena pode suprir os níveis de AIA nos bulbilhos e reduzir o estresse decorrente do desequilíbrio hormonal causado pela vernalização, que induz ao aumento dos níveis de citocinina e giberelina. Os resultados observados sugerem que o uso de TOL leva à mitigação do estresse/desequilíbrio causado pela vernalização na emissão de raízes dos bulbilhos vernalizados.

O maior desenvolvimento inicial da parte aérea das plantas tratadas com TOL, confirmam sua ação como promotor de crescimento, assim como AIA, que segundo Cleland (1987) altos teores de AIA estão associados a alongação celular e uma vez que o crescimento celular rápido é iniciado, outras mudanças são necessárias para que a taxa de crescimento seja mantida. Um dos processos realizados pelas plantas para que isso ocorra e a maior absorção de água, à medida que a água é absorvida junto ao processo de crescimento, também iniciasse alterações na osmorregulação; isto é, solutos osmóticos são gerados (por hidrólise de amido ou por fotossíntese) e levados para dentro das células em quantidades suficientes para manter o turgor das células (CLELAND, 1987). A análise metabolômica das folhas indicou o acúmulo dos metabólitos osmorreguladores maltose, mio-inositol, sacarose e trealose; tais resultados se devem à maior absorção de água durante o crescimento da planta, que requer um acúmulo de solutos osmóticos para manter o turgor celular (CLELAND, 1987).

Em comportamento oposto aos carboidratos, a maioria dos aminoácidos apresentaram reduções em seus teores, acarretando impacto significativo nas rotas metabólicas: biossíntese

de aminoacil-Trna (1-maior impacto), metabolismo de alanina, aspartato e glutamato (2), Metabolismo de cianoaminoácido (3) e Metabolismo do enxofre (4), rotas que impactam na síntese de esqueletos carbônicos e produção de energia, sendo principalmente ligados a síntese de compostos intermediários ao ciclo de Krebs (Figura 10) (TAIZ et al., 2017). O aumento na taxa de alongação celular por auxina exógena requer síntese adicional de proteína e de RNA, a taxa de formação de um RNA específico e aumentada pela auxina, levando a uma maior demanda no suprimento de uma enzima ou de um sistema enzimático limitante (CASTRO, 1979) conseqüentemente um maior consumo de substrato enzimático, em conseqüência um maior consumo de aminoácidos.



**Figura 10-** Influência de metabólitos intermediários ao ciclo de Krebs, que diferiram significativamente entre o grupo controle e tratamento com 12  $\mu$ M de TOL após 7 dias de plantio no campo.

## 5. Conclusões

Em conclusão, foi possível observar que as plantas tratadas com 8 e 12  $\mu\text{M}$  de TOL apresentaram maior atividade fisiológica do que o grupo controle. A análise metabolômica não direcionada por CG-MS permitiu elucidar as alterações metabólicas ocorridas nas plantas tratadas, mostrando alterações significativas nos teores de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares; também foi possível relacionar as alterações metabólicas a quatro vias metabólicas associadas à biossíntese de aminoácidos e produção de energia.

Alterações metabólicas resultaram em melhor resposta no desenvolvimento inicial das plantas, o que refletiu em maior produção e qualidade dos bulbos formados no tratamento com TOL sobre o grupo Controle.

Os resultados contribuem para o desenvolvimento de estratégias para aumentar a eficiência de brotação e produção de alho, demonstrando que a aplicação de TOL exógeno é eficiente no tratamento de bulbilhos em pré-plantio.

## 6. Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. [s.l.] Allured publishing corporation Carol Stream, 2007. v. 456
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146–161, 2012.
- AHMED, H. G. et al. **Respon of garlic to irrigation interval and clove size in semi-arid, Nigeria** *Journal of Plant Sciences*, 2007.
- AHUJA, N. et al. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 209–218, 2015.
- ALVES, T. A. et al. Bioactivity and molecular properties of phenoxyacetic acids derived from eugenol and guaiacol compared to the herbicide 2,4-d. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–18, 2021.
- BARBOSA, I. R. Inibidores de giberelina e restrição hídrica na modulação do superbrotamento em alho (*Allium sativum* L.) cultivado no cerrado. 2021.
- BEECKMANS, S.; XIE, J. P. **Glyoxylate Cycle**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.
- BEISSON, F.; LI-BEISSON, Y.; POLLARD, M. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 329–337, 2012.
- BENEDÉ, S. et al. *Allium porrum* extract decreases effector cell degranulation and modulates airway epithelial cell function. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2019.
- BERLATO, G. Cultivo do alho ainda é desafio , mas tem potencial de mercado no Ceará. p. 1–8, 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROWN, H. M.; PURVES, W. K. Isolation and characterization of indole 3 acetaldehyde reductases from *Cucumis sativus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 4, p. 907–913, 1976.
- BÜLL, L. T. et al. Produção de bulbos e incidência de pseudoperfilhamento na cultura do alho vernalizado em função de adubações potássicas e nitrogenadas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 247–255, 2002.
- BURBA, J. L.; GALMARINI, C. R. **First international symposium on edible Alliaceae**. International Symposium on Edible Alliaceae 1994: Mendoza, Argentina).

**Anais...**International Society for Horticultural Science, 1997.

BURBA, J. L.; MULLER, J. J. V; CASSALI, V. W. D. Relaciones entre el índice visual de superación de dormición (IVD) en ajo (*Allium sativum* L.) con el tamaño y posición de bulbillos. **AgriScientia**, v. 4, p. 99–102, 1983.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. **Quimica Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CASTRO, P. R. C. Mecanismo de ação auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 36, n. 0, p. 621–634, 1979.

CHAI, Q. et al. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 1, p. 1–21, 2016.

CHATTOPADHYAY, N.; LALRINPUII, F.; THAPA, U. Influence of plant growth regulators on growth and yield of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Crop and Weed**, v. 11, n. 2, p. 67–71, 2015.

CLELAND, R. E. Auxin and cell elongation. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development**. [s.l.] Springer, 1987. p. 132–148.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

CUNHA, M. L. P. et al. Modeling of nutrients demands in garlic crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1205–1213, 2015.

DARABI, H. R. et al. Clove bud oil: An efficient, economical and widely available oil for the inhibition of wheat seed germination. **Environmental Chemistry Letters**, v. 9, n. 4, p. 519–524, 2011.

DING, S. et al. Changes in pectin characteristics during the ripening of jujube fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4151–4159, 2017.

DO NASCIMENTO, A. L. V. et al. Physiological and agronomical responses of common bean subjected to tryptophol. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 195–202, 2016.

FABEIRO CORTÉS, C.; MARTÍN DE SANTA OLALLA, F.; LÓPEZ URREA, R. Production of garlic (*Allium sativum* L.) under controlled deficit irrigation in a semi-arid climate. **Agricultural Water Management**, v. 59, n. 2, p. 155–167, 2003.

FERRI; M G. **Fisiologia Vegetal I e II**São Paulo: EPV-Editora da Universidade de São Paulo, , 1985.

FINGER, F. L. et al. Action of essential oils on sprouting of non-dormant potato tubers.

**Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

GARCIA, A. **Influencia da irrigacao no crescimento, producao e superbrotamento do alho (Allium sativum, L.)**. [s.l.] Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1964.

GONÇALVES, F. A. R. et al. Non-destructive evaluation of the leaf area of garlic crop using mathematical models. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 5, p. 1600–1606, 2020.

HILDEBRANDT, T. M. et al. Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HU, Q. et al. Inhibitory effect of eugenol on seed germination and pre-harvest sprouting of hybrid rice (*Oryza sativa* L.). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

JOS, R.; SOUZA, D. E. Influência do Nitrogênio , Potássio , Cycocel e Paclobutrazol na Cultura do Alho. 1990.

KAPLAN, F. et al. Exploring the Temperature-Stress Metabolome. **Plant physiology**, v. 136, n. December, p. 4159–4168, 2004.

KRARUP, C. H.; TROBOK, S. V. Efectos de sistemas de plantación sobre rendimiento calidad del bulbo y aprovechamiento de la fertilization nitrogenada en ajo (*Allium sativum* L.). **Fitotecnia Latinoamericana**, v. 11, p. 39–42, 1975.

LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature Methods**, v. 15, n. 1, p. 53–56, 2018a.

LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature methods**, v. 15, n. 1, p. 53–56, 2018b.

LANDAU, E. C.; BARTOLOMEU, R. D. DE S.; DA SILVA, G. A. Evolução da produção de alho (*Allium sativum*, Amaryllidaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.

LEE, D.-K. et al. Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016a.

LEE, D. K. et al. Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016b.

LEITE, V. S. A.; REIS, M. R.; PINTO, F. G. Untargeted Metabolomics Reveals Metabolic Changes Linked to Bulb Purpling in Garlic ( *Allium sativum* L.) . **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 242–248, 2021.

LONGHI, C. D. N.; WILPERT, L. S.; BOSCO, L. C. Filocrono de alho nobre cultivado sob

influência da vernalização. **Agrometeoros**, v. 27, n. 1, p. 209–216, 2020.

MACÊDO, F. S. et al. Produtividade de alho vernalizado em função de doses de nitrogênio e molibdênio. **Bragantia**, v. 68, p. 657–663, 2009.

MACÊDO, F. S.; DE SOUZA, R. J.; PEREIRA, G. M. Controle de superbrotamento e produtividade de alho vernalizado sob estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 629–635, 2006.

MAGNUS, V. et al. Metabolism of Tryptophan, Indole-3-acetic Acid, and Related Compounds in Parasitic Plants from the Genus Orobanche. **Plant Physiology**, v. 69, n. 4, p. 853–858, 1982.

MOON, W.; LEE, B.-Y. Influence of short day treatment on the growth and levels of endogenous growth substances in garlic plants (*Allium sativum* L.). **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v. 21, n. 2, p. 109–118, 1980.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

NIKOLOVA, M. et al. GC/MS Based Metabolite Profiling and Antioxidant Activity of Balkan and Bulgarian Endemic Plants. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 84, n. 1, p. 59–65, 2019a.

NIKOLOVA, M. et al. GC/MS based metabolite profiling and antioxidant activity of balkan and bulgarian endemic plants. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 84, n. 1, p. 59–65, 2019b.

PALMIERI, A.; PETRINI, M. Tryptophol and derivatives: Natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 490–530, 2019.

PARK, Y. B.; LEE, B. Y. Study on the growth and bulb formation of garlic plants (*Allium sativum* L.). I. The effect of day-length on the bulb formation and secondary growth in 6 cloved garlic plants. **Han'guk Wonye Hakhoe chi.= Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 1979.

PEIXOTO, C. P. et al. Princípios de Fisiologia Vegetal: teoria e prática. **Rio de Janeiro: Pod Editora**, 2020.

PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 290–295, 2011.

PURVES, W. K.; BROWN, H. M. Indoleacetaldehyde in Cucumber Seedlings. **Plant Physiology**, v. 61, n. 1, p. 104–106, 1978.

QUITTENDEN, L. J. et al. Auxin biosynthesis in pea: Characterization of the tryptamine pathway. **Plant Physiology**, v. 151, n. 3, p. 1130–1138, 2009.

- RAYLE, D. L.; PURVES, W. K. Conversion of Indole-3-Ethanol to Indole-3-Acetic Acid in Cucumber Seedling Shoots. **Plant Physiology**, v. 42, n. 8, p. 1091–1093, 1967.
- RESENDE, G. M. DE et al. Efeitos do paclobutrazol em diferentes concentrações e períodos de imersão na cultura do alho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 635–639, 1999.
- RESENDE, J. T. V. DE et al. Garlic vernalization and planting dates in Guarapuava. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 193–198, 2011.
- RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortaliças em Revista**, ano, v. 7, p. 16–17, 2018.
- SANDBERG, G. Biosynthesis and metabolism of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by *Pinus sylvestris* L. needles. **Planta**, v. 161, n. 5, p. 398–403, 1984.
- SANTIN, J. R. et al. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p. 149–158, 2011.
- SANTORO, G. F. et al. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283–290, 2007.
- SARWAR, M.; FRANKENBERGER, W. T. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. **Plant and soil**, v. 160, n. 1, p. 97–104, 1994.
- SOUZA, R. J. DE; CASALI, V. W. D. Pseudoperfilhamento: uma anormalidade genético-fisiológica em alho. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 142, p. 36–41, 1986.
- SOUZA, R. J. DE; MACÊDO, F. S. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 651–654, 2004.
- SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Editores da Univates. Lajeado-RS**, 2014.
- STOKŁOSA, A. et al. Phytotoxic Activity of Clove Oil, Its Constituents, and Its Modification by Light Intensity in Broccoli and Common Lambsquarters ( *Chenopodium album* ) . **Weed Science**, v. 60, n. 4, p. 607–611, 2012.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.
- TELES, A. M. et al. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

TRANI, P. E. et al. Produtividade e pseudoperfilhamento do alho influenciados pelo nitrogênio, potássio e cobertura morta. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 330–334, 2008.

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

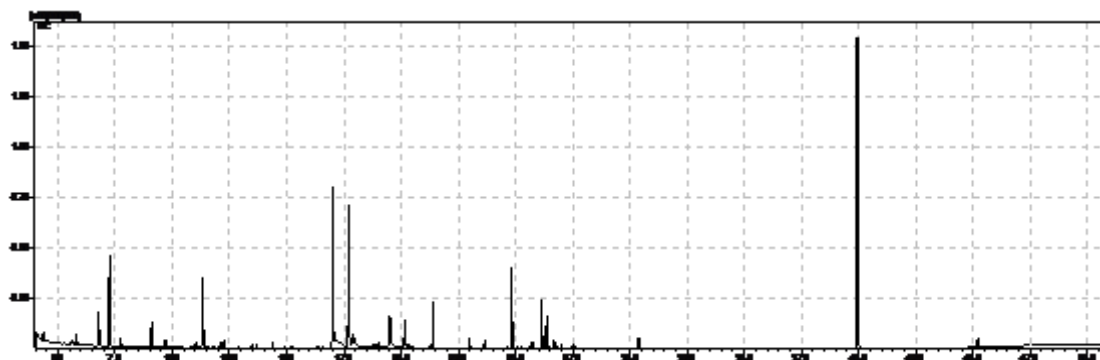
VICKERY, L. E.; PURVES, W. K. Isolation of Indole-3-ethanol Oxidase from Cucumber Seedlings. **Plant Physiology**, v. 49, n. 5, p. 716–721, 1972.

WU, et al. Response of garlic (*Allium sativum* L.) bolting and bulbing to temperature and photoperiod treatments. **Biology Open**, v. 5, n. 4, p. 507–518, 2016.

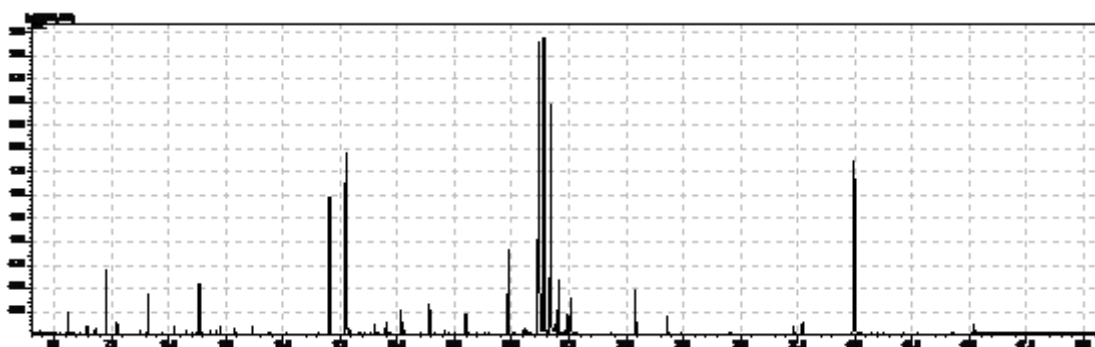
YOKOYAMA, C. et al. Novel tryptophan metabolic pathways in auxin biosynthesis in silkworm. **Journal of Insect Physiology**, v. 101, n. June, p. 91–96, 2017.

ZHU, J. S.; SCOTT, G. K. Purification, characterization and developmental expression of indole-3-ethanol oxidase from seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 2, p. 423–432, 1995.

## 7. Material Suplementar



**Figura 01-** GC-MS cromatograma de íons totais (TIC) das raízes das plantas de alho 7 dias após tratamento com triptofol em pré-plantio.



**Figura 02-** GC-MS cromatograma de íons totais (TIC) da parte aérea das plantas de alho 7 dias após tratamento com triptofol em pré-plantio.

**Tabela 01-** Análise do caminho usando MetaboAnalyst indicando vias metabólicas que apresentaram impacto significativo em plantas de alho tratadas com Tryptophol em pré-plantio.

Rotas metabólicas	Nº de metabolitos envolvidos	Valor p	FDR
1-Biossíntese de aminoacil-tRNA	9/46	$4,36 \times 10^{-9}$	$4,19 \times 10^{-7}$
2-Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	4/22	$2,23 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-2}$
3-Metabolismo de cianoaminoácidos	4/29	$6,77 \times 10^{-4}$	$2,17 \times 10^{-2}$
4-Metabolismo do enxofre	3/15	$1,15 \times 10^{-3}$	$2,76 \times 10^{-2}$

## 4. ARTIGO II

### **Óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*): um potencial inibidor do crescimento secundário no alho em regiões tropicais**

V.G. Nasser<sup>1</sup>, W.R. Macedo<sup>2</sup>, F.G. Pinto<sup>1</sup>, J.H. Silva<sup>2</sup>, G.H. Silva<sup>1</sup>

1-Universidade Federal de Viçosa-Campus Rio Paranaíba, 2- Centro De Ensino Superior De São Gotardo

#### **Resumo**

O cultivo de alho em regiões tropicais induz a formação de crescimento secundário em plantas de alho na fase de bulbificação. Estudos recentes relatam que o uso do eugenol, principal composto do óleo de cravo, inibe a germinação de sementes e tubérculos, diminuindo o vigor dos órgãos das plantas. O presente estudo investigou o efeito inibitório do óleo essencial de cravo na redução da presença de bulbilhos de alho emitindo brotos secundário ou superbrotamento na região do Cerrado de Minas Gerais. Em um experimento *in vitro*, bulbilhos foram tratados com diferentes concentrações de óleo e a atividade inibitória da germinação foi avaliada. Nas safras de 2021 e 2022, foram realizados experimentos de campo, sendo as plantas de alho pulverizadas com diferentes concentrações de óleo essencial de cravo (EOCr) (0,0, 0,2 e 0,4%) na fase de diferenciação; também foi avaliada a aplicação do déficit hídrico, técnica agrícola utilizada para reduzir essa anomalia. A análise do perfil metabolômico foi realizada para entender os impactos metabólicos gerados na planta em resposta à aplicação de óleo. Em experimento *in vitro*, concentrações superiores a 0,5% do óleo inibiram a germinação. No experimento em campo, após três dias de aplicação foliar do EOCr, foram observadas reduções na atividade fotossintética da planta, bem como queda no exercício das enzimas amilolíticas, que foram restabelecidas sete dias após a aplicação, sem danos permanentes às plantas. O teor de bulbos com crescimento secundário e rachados foi reduzido com a aplicação de EOCr, sendo a concentração de 0,4% mais eficaz, pois reduziu a presença desses defeitos e não impactou na produção de bulbos, que foi menor quando aplicada a técnica de déficit hídrico. A análise do perfil metabolômico das folhas de alho revelou que as rotas ligadas à biossíntese de ácidos graxos, ceras, cutina e suberina foram mais ativas no tratamento com 0,4% de óleo do que no grupo controle, indicando possíveis danos à superfície de revestimento das folhas. O ciclo do glioxilato, rota alternativa para a fotorrespiração vegetal e via de degradação de aminoácidos, também apresentaram impactos significativos em resposta à aplicação de óleo, que causou redução nas taxas fotossintéticas e induziu a planta a ativar vias alternativas para suprir sua demanda energética. O óleo de cravo reduziu efetivamente a presença de brotação excessiva em bulbos de alho, mas novos estudos devem ser realizados considerando diferentes concentrações, formas de aplicação e a combinação de tensoativos que possam potencializar seus efeitos.

Palavras chave: Eugenol. Metabolômica. Cromatografia gasosa-espectrometria de massa

## Abstract

The cultivation of garlic in tropical regions induce to the formation of secondary growth in garlic in the bulbification phase. Recent studies report that using eugenol, the primary compound in clove oil, inhibits seed and tuber germination, reducing the vigor of this plant organs. The present study investigated the inhibitory effect of clove essential oil in reducing the presence of secondary-growth garlic bulbs in the Cerrado region of Minas Gerais. In an *in vitro* experiment, bulbils were treated with different oil concentrations, and the germination inhibitory activity was evaluated. In the 2021 and 2022 harvests, field experiments were carried out, and garlic plants were sprayed with different concentrations of essential oil (0.0, 0.2, and 0.4%) in the differentiation phase; the application of water deficit was also evaluated, an agricultural technique used to reduce this anomaly. Metabolomics profile analysis was performed to understand metabolic impacts generated in the plant in response to oil application. In an *in vitro* experiment, concentrations greater than 0.5% of the oil inhibited germination. After three days of foliar application of the oil, reductions in the plant's photosynthetic activity were observed, as well as a drop in the exercise of amylolytic enzymes, which were restored seven days after application, with no permanent damage to the plants. The content of secondary-growth and cracked bulbs was reduced with oil application, with the concentration of 0.4% being more effective since it reduced the presence of these defects and did not impact the production of bulbs, which was lower when the technique was applied—Water deficit. Analysis of the metabolomic profile of garlic leaves revealed that routes linked to the biosynthesis of fatty acids, waxes, cutin, and suberin were more active in the treatment with 0.4% oil than the control group, indicating possible damage to the coating surface of the leaves. The glyoxylate cycle, an alternative route to plant photorespiration and amino acid degradation pathway, also showed significant impacts in response to oil application, which caused a reduction in photosynthetic rates and induced the plant to activate alternative pathways to meet its energy demand. Clove oil effectively reduced the presence of over sprouting in garlic bulbs, but further studies must be conducted considering different concentrations, forms of application, and the combination of surfactants that may potentiate its effects.

Keywords: Eugenol. Metabolomics. Gas chromatography-mass spectrometry.

## 1. Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) é uma cultura de clima temperado, nativa da Ásia Central. Seu desenvolvimento é altamente influenciado pela temperatura, onde a fase inicial requer temperaturas amenas (18 a 20°C); para a fase de bulbificação, baixas temperaturas são essenciais (10 a 15°C), e já para a fase de maturação, temperaturas mais altas (20° a 25°C) são desejáveis. No Brasil, embora o clima predominante seja tropical, as regiões do sul do país apresentam baixas temperaturas no inverno e são propícias ao desenvolvimento das lavouras; no entanto, regiões como Sudeste e Centro-Oeste apresentam condições climáticas desfavoráveis para uma alta produção (LANDAU; BARTOLOMEU; DA SILVA, 2020).

Apesar das altas exigências climáticas da cultura, o Brasil tem apresentado um aumento progressivo no cultivo do alho, em 2020 atingiu uma produção de 184,5 mil toneladas, ocupando o 16º lugar no ranking mundial em produção (BERLATO, 2022). Na busca pela autossuficiência, foram ajustadas estratégias de manejo, como adensamento populacional, formas de adubação, teor de cobertura vegetal e principalmente a técnica de vernalização, que permite sua produção na região tropical (CUNHA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2020).

Embora essa diversidade de técnicas aplicadas à cultura do alho estimule uma produção mais farta, diversos trabalhos relatam o aumento de uma anomalia fisiológica, a superbrotação ou pseudobrotação, também denominado crescimento secundário dos bulbilhos, fator que ocasiona redução na produtividade dos bulbos comerciais (MACÊDO; DE SOUZA; PEREIRA, 2006).

O crescimento secundário no alho é uma anomalia de causa genético-fisiológica que leva à germinação precoce dos bulbilhos durante a fase de crescimento reprodutivo, causando alterações físicas na formação do bulbo, os chamados bulbos ovais, em alguns casos, bulbos denominados de sorriso, aqueles que apresentam o rompimento da tunica de revestimento do bulbo. É uma anomalia onde os tecidos formadores estão se diferenciando nas folhas de reserva, vegetativas e protetoras, por algum fator endógeno da planta; ao invés de ocorrer a formação de folhas protetoras, aquelas que recobrem os bulbilhos, estas sofrem alongamento, anatomicamente no sentido de formar folhas adicionais, dando à planta um aspecto de touceira (JOS; SOUZA, 1990) e produzem bulbos abertos, ou seja, ocorre a exposição da túnica e dos bulbilhos, depreciando o valor comercial do bulbo (SOUZA; CASALI, 1986).

Dentre os principais fatores relacionados ao estímulo do crescimento secundário do alho, destacam-se as mudanças no fotoperíodo (MACÊDO et al., 2009; PARK; LEE, 1979), cultivares suscetíveis/sensíveis, temperatura e períodos de vernalização (SOUZA; MACÊDO,

2004; TRANI et al., 2008), altas doses de adubação nitrogenada (BÜLL et al., 2002; KRARUP; TROBOK, 1975; TRANI et al., 2008), tempo de irrigação e estresse hídrico (GARCIA, 1964) e níveis de giberelinas (CHATTOPADHYAY; LALRINPUII; THAPA, 2015; MOON; LEE, 1980). Segundo Burba et al. (1983), a vernalização dos bulbilhos estimula o acúmulo de citocininas e giberelinas, modificando o equilíbrio hormonal e levando os bulbilhos à germinação precoce (BURBA; MULLER; CASSALI, 1983).

A técnica mais adotada para reduzir esta anomalia é o estresse hídrico durante o período de bulbificação, causando déficit hídrico moderado nas plantas, visando reduzir o crescimento secundário das plantas (MACÊDO; DE SOUZA; PEREIRA, 2006). Do ponto de vista fisiológico, o estresse hídrico leve estimula o fechamento parcial dos estômatos das plantas, promovendo redução na perda de água, mas sem interromper completamente a fotossíntese (CHAI et al., 2016). No entanto, o uso dessa técnica causa limitações no vigor vegetativo de diversas culturas e geralmente redução no rendimento (CHAI et al., 2016). Cortés et al. (2003) testaram a combinação de diferentes níveis de estresse hídrico na cultura do alho e constataram que os tratamentos que receberam déficit durante a bulbificação alcançaram maiores valores de eficiência no uso da água; no entanto, o tratamento testemunha, que não foi submetido ao estresse hídrico, alcançou os maiores valores de produtividade (FABEIRO CORTÉS; MARTÍN DE SANTA OLALLA; LÓPEZ URREA, 2003).

Durante o estresse hídrico, o ácido abscísico (ABA) aumenta acentuadamente nas folhas, o que leva ao fechamento dos estômatos; fisiologicamente, o fechamento é afetado por uma redução na pressão de turgescência que segue o efluxo significativo de  $K^+$  e ânions das células. Reduzir a abertura estomática para conservar água faz com que a absorção de  $CO_2$  atmosférico diminua, reduzindo assim o  $CO_2$  no sítio ativo da rubisco, enzima responsável pela fixação de carbono. Como resultado, o  $CO_2$  interno é rapidamente fixado e convertido em carboidratos pelo ciclo de Calvin-Benson, permitindo o acúmulo de solutos no citoplasma e vacúolo das células vegetais, permitindo assim a manutenção da pressão de turgor, mas podendo afetar a fotossíntese e expansão do tecido foliar (TAIZ et al., 2017).

Uma alternativa para inibir o crescimento secundário de plantas é o uso de inibidores de crescimento. Resende et al. (1999) avaliaram a influência da cicocel e do ácido giberélico nesta anomalia, mas nenhum efeito significativo foi encontrado no controle deste distúrbio fisiológico (RESENDE et al., 1999). Barbosa et al. (2021), avaliando diferentes formas de aplicação de cloreto de cloromequat (CCC) e paclobutrazol (PBZ) na fase inicial de diferenciação de plantas de alho, observaram baixa eficiência no controle do crescimento secundário das plantas. Ao aplicarem o inibidor de crescimento etil-trinexapac (ETP), o

observaram uma restrição efetiva do distúrbio fisiológico, no entanto, as plantas reduziram as trocas gasosas e o crescimento da parte aérea e também aumentou a produção de bulbos não comerciais (BARBOSA, 2021).

A germinação na pré-colheita é um distúrbio que também afeta significativamente as culturas do trigo (DARABI et al., 2011) e do arroz (HU et al., 2017), entre outras. Onde a germinação começa antes da colheita, quando as condições de umidade, temperatura e oxigênio são propícias ao crescimento do embrião; assim, a germinação precoce dos grãos ocorre ainda nas espigas, no campo. Para reduzir a germinação precoce de cereais, trabalhos como Hu et al. (2017) e Dabari et al. (2011) relatam que a aplicação de óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) no período de pré-colheita reduziu significativamente a germinação precoce desses cereais.

O óleo essencial de cravo é constituído principalmente por eugenol, substância com diversas funcionalidades, como toxicidade contra insetos, bactérias, fungos patogênicos de plantas e solo, nematóides e ervas daninhas (AHUJA et al., 2015), também retarda ou inibe a germinação de várias espécies de plantas, apresentando atividade herbicida (ALVES et al., 2021; STOKŁOSA et al., 2012).

Embora seja possível adotar técnicas agrícolas para redução do crescimento de plantas secundárias, na maioria das vezes, elas impactam diretamente na produção das culturas, seja em qualidade ou produtividade. Até o momento, não há relatos sobre a atividade inibitória do EOcr na germinação de bulbilhos de alho e impactos na ocorrência dessa anomalia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do óleo essencial de cravo em inibir a germinação de bulbos de alho na fase de bulbificação, buscando melhorar o potencial produtivo da cultura do alho, produção de bulbos de alta qualidade e menores teores de resíduos químicos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Caracterização química do óleo de cravo**

A análise do óleo essencial de cravo-da-índia (EOcr) foi realizada utilizando uma fração de óleo de 10 mg mL<sup>-1</sup> em diclorometano grau HPLC, por um sistema cromatográfico gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra). Para as medições, o volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção de divisão (split) de 40:1. A temperatura do injetor foi de 240°C. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). A separação cromatográfica foi realizada em sistema de gradiente iniciando em 60°C, rampa de temperatura de 10°C min<sup>-1</sup> até 280°C, que permaneceu por 3 minutos. Os parâmetros de espectrometria de massa utilizados

foram: temperaturas da interface e da fonte de íons a 280°C em ambas, ionização por impacto a 70 eV, espectro de massa escaneado de 35 a 350 m/z. O tempo de corte do solvente foi de 3 minutos (AFFONSO et al., 2012; SANTIN et al., 2011; SANTORO et al., 2007). A identificação de substâncias usando correspondência espectral com a biblioteca espectral de massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST-2014) e cálculo do índice de retenção, usando a série de hidrocarbonetos lineares (C10-C30) para comparação com dados da literatura com colunas da mesma polaridade (ADAMS, 2007).

## **2.2. Experimento exploratório**

### **2.2.1. Atividade do óleo de cravo na inibição da germinação *in vitro***

No experimento *in vitro*, foram utilizados bulbilhos de alho classificados em tamanho (16 mm) e peso ( $5,5 \pm 0,5$  g); estes foram imersos em emulsão de EOCr nas concentrações de 0-controle, 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 2,50 % suspensos em surfactante a base de silício 0,01%, por 30 minutos utilizando uma proporção de 10 mL por bulbilho. Os bulbilhos tratados foram incubados em placas de Petri em papel germinativo umedecido por cinco dias em câmara de crescimento tipo BOD com fotoperíodo de 12 h, 25°C, e avaliados quanto à inibição da germinação.

### **2.2.2. Experimento de campo – safra 2021**

O experimento foi conduzido em condições de campo, no município de São Gotardo no Brasil, de abril a agosto de 2021. Os tratamentos culturais (calagem, adubação) foram aplicados de acordo com a programação da fazenda produtora (SEKITA AGRONEGOCIOS), e a irrigação foi realizada via pivô. Três blocos de 10 plantas de cada tratamento (n=30) foram pulverizados com suspensão de óleo de cravo nas doses de 0-testemunha, 0,2% e 0,4%, com um volume de calda de 200 L hectare<sup>-1</sup>, com 0,01% de surfactante à base de silício, as plantas encontravam-se no período de transição entre o estágio vegetativo (V10) e o reprodutivo (R1- início da diferenciação). Neste período, a irrigação por pivô da área total foi interrompida por 21 dias, e a área experimental foi irrigada manualmente. Os bulbos produzidos foram avaliados quanto ao peso e classe de bulbos e presença de anomalias (tortos, superbrotados e trincados). Também foram avaliadas variáveis fotossintéticas, atividade amilolítica e teor de proteína de folhas frescas e bulbos em desenvolvimento, 3 e 7 dias após a pulverização. A análise de metabólitos por GC MS foi realizada três dias após a pulverização das plantas.

### 2.2.3. Quantificação de proteína solúvel total (TSP)

Foram analisadas folhas e bulbos em formação (n=5) macerados com almofariz e pistilo com nitrogênio líquido. 200 mg do material triturado foram pesados em um micro tubo de 2 mL, 1500  $\mu$ L do mix de extração foram adicionados (750  $\mu$ l 200 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,8, 15  $\mu$ l 10 mM ácido etilenodiamina (EDTA), 150  $\mu$ l 200  $\mu$ l ácido ascórbico mM e 585  $\mu$ l de água ultrapura) e agitados em vórtex por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, obtendo-se o extrato bruto (SPEROTTO, 2014).

A quantificação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), onde 10  $\mu$ L de extrato, 40  $\mu$ L de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e 2,5 mL de solução de Coomassie Blue foram transferidos para um tubo de ensaio e homogeneizados no vortex, em seguida, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro (PerkinElmer-LAMBDA25) a 595 nm, os valores obtidos foram calculados com base na curva padrão da albumina (BRADFORD, 1976; SPEROTTO, 2014).

### 2.2.4. Determinação da atividade amilolítica

Amostras de folhas e bulbos foram congeladas com nitrogênio líquido e moídas em um pó fino, homogeneizadas com água destilada e centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram usados para a reação como um extrato enzimático. A atividade amilolítica foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados pela reação de hidrólise do amido catalisada por amilases. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi utilizado para a formação do complexo e determinação colorimétrica, onde a glicose foi utilizada para a construção da curva padrão, conforme descrito por Speroto et al. 2014 (HU et al., 2017; SPEROTTO, 2014).

### 2.2.5. Análise de trocas gasosas foliares

As variáveis de troca gasosa de folhas de alho foram realizadas no terço médio da oitava folha completamente expandida entre 9h00 e 11h00, utilizando um sistema portátil de troca gasosa (LI-6400XT; LI-COR, EUA) equipado com um fluorômetro modulado (LCF-40 LI-COR Inc.) sob saturação de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1.000  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para medir os seguintes parâmetros: A- Taxa de fotossíntese ( $\mu$ mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), g<sub>s</sub>- condutância (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), Trmol-Taxa de transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), PhiPS2 -Eficiência quântica do transporte fotossintético de elétrons através do fotossistema II, qP-coeficiente de extinção fotoquímica (radiação fotossintética ativa 400 a 700 nm), ETR- eficiência do transporte de elétrons e razão Ci/Ca – CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> externo.

### 2.2.6. Perfil metabólico baseado em GC-MS

No início da fase de diferenciação, plantas foram pulverizadas com uma emulsão de EOCr a 0,4% e sem óleo (testemunha). Após três dias de pulverização, foram avaliadas as folhas e os tecidos que recobriam o bulbo em desenvolvimento quanto ao perfil metabólico, onde foram avaliadas quatro repetições por tratamento. Cada amostra consistiu em uma mistura de tecido de plantas diferentes (n=4, cada amostra consiste em três plantas diferentes). Um grama de tecido foi homogeneizado em 9 mL de solução água/metanol (80:20) usando um dispersor tipo Turrax por 1 minuto a 18.000 rpm (Ultra Turrax T25-IKA).

Em seguida, 1 mL do extrato foi centrifugado a 10.000 rpm. Em um vial, 200 µL do sobrenadante foram concentrados sob injeção de nitrogênio em bloco termico (Concentrador TE019-Tecnal). O material seco foi solubilizado com 120 µL de solução de cloridrato de metoxilamina (20 mg mL<sup>-1</sup> de piridina) e 40 µL de ribitol (2 mg mL<sup>-1</sup>) como padrão interno, em sistema fechado por 60 minutos a 65°C para a formação de oximas. Para as reações de silição, 40 µL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida-BSTFA com 1% cloreto de trimetilsilila-TMCS foram adicionados e deixados em repouso por mais 60 minutos a 65°C, transferidos para insertos de 200 µL (BENEDÉ et al., 2019; DING et al., 2017; NIKOLOVA et al., 2019a). Para a amostra de controle de qualidade (QC), foi utilizada uma mistura de plantas de ambos os tratamentos.

Para a análise cromatográfica dos extratos, foi utilizado um cromatógrafo a gás com espectro de massas. (Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra) com autoinjeter AOC-20i. 1µL da amostra foi injetado com temperatura do injetor a 240°C, com uma razão de split para injeção de 1:20. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e velocidade linear como modo de controle de vazão. A coluna capilar utilizada foi a Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), com programação isotérmica por 2 minutos à 80°C, rampa de temperatura de 5°C min<sup>-1</sup> até 300°C, que permaneceu por 3 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massa, as temperaturas da fonte de íons 280°C e interface 280°C, ionização de impacto a 70 eV, varredura de espectro de massa de 45-700 m/z. O tempo de corte do solvente foi de 3 minutos (LEE et al., 2016b; NIKOLOVA et al., 2019b)

Os dados extraídos do GC-MS no formato mzML foram convertidos para *Analysis Base Framework* (ABF) usando o conversor *AbfConverter*, uma vez reconhecida a compatibilidade com o software MS-DIAL. Em seguida, os cromatogramas foram alinhados, deconvoluídos e identificados no MS-DIAL 4.90, adotando parâmetros semelhantes aos descritos por Leite et al. (2021) para detecção de pico: método de suavização, média móvel ponderada linear; nível de suavização, três varreduras; largura média do pico, 20 varreduras; altura mínima do pico,

amplitude 1000 (LEITE; REIS; PINTO, 2021). Parâmetros de deconvolução: valor da janela Sigma, 0,5; Corte espectral de ionização por elétrons (EI), amplitude 10. Configurações de identificação: índice de retenção (IR); Arquivo MSP, banco de dados GCMSDB-Public-KovatsRI-VS3, para confirmação, os metabólitos foram identificados usando correspondência espectral ( $\geq 85\%$  semelhante), usando a biblioteca espectral de massa NIST 2014 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia); tolerância RI usando uma mistura de alcanos (C7-C30, Sigma-Aldrich); tolerância RT, 0,5; tolerância m/z, 0,5; Corte de similaridade EI, 85%; pontuação de identificação de corte, 85% (LAI et al., 2018b). O padrão interno ribitol normalizou os metabólitos identificados; que foram então submetidos à análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas usando o Metaboanalyst 5.0 um programa baseado no *software* R projetado especificamente para metabolômica. Valores não presentes em 15 % dos dados foram removidos da análise e os dados foram filtrados por desvio padrão relativo, normalização por soma, transformação de log (base10) e escalonamento automático. Aplicou-se também uma abordagem estatística multivariada, aplicando análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e aplicando um modelo gráfico de mapa de calor baseado no cluster hierárquico, onde foi avaliada a medida de similaridade dos compostos por medida de distância euclidiana (LEE et al., 2016b). Os metabólitos detectados nos diferentes grupos foram comparados análises de variância ANOVA e test Tukey, onde p - valor  $< 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

A análise da via metabólica foi realizada usando a ferramenta MetPA MetaboAnalyst 5.0 para interpretar a relevância biológica de nossos achados ao analisar o grupo controle e o grupo tratado com a maior dose de óleo de cravo (tratamento 0.4 %), integrando duas abordagens para análise de caminho - enriquecimento e análise de caminho de topologia, metabólitos expressos foram identificados usando o banco de dados da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e o Human Metabolome Database (HMDB) para interpretar as alterações metabólicas ocorridas, a análise de enriquecimento e via foi realizada a partir dos metabólitos discriminantes destacados nos modelos PLS-DA.

## **2.3. Ensaio de campo - safra 2022**

### **2.3.1. Avaliação da qualidade e presença de anomalias em experimento de campo**

A investigação foi realizada em esquema de DBC onde foi aplicada solução de EOcr nas doses de 0, 0,2 e 0,4% via pulverização foliar com volume de calda de 200 L hectare<sup>-1</sup>, com 0,01% de tensoativo à base de silício; as plantas encontravam-se no período de transição entre

os estádios vegetativo e reprodutivo. Os blocos foram constituídos por 100 plantas e cinco blocos por tratamento, onde bulbos de 10 plantas por bloco (n=50) foram avaliados quanto ao peso, diâmetro, número de bulbos e presença de anomalias (tortos, superbrotados e rachados), tais parâmetros foram avaliados dez dias após a colheita. O experimento foi conduzido em condições semelhantes à safra 2021, de abril a agosto de 2022. Nesse período, a irrigação via pivô da área total foi interrompida por 20 dias. Os blocos experimentais continuaram recebendo irrigação manual, de modo que as plantas não sofressem déficit hídrico. Plantas submetidas ao déficit hídrico (DH) representaram um grupo controle negativo, com restrição hídrica de 20 dias.

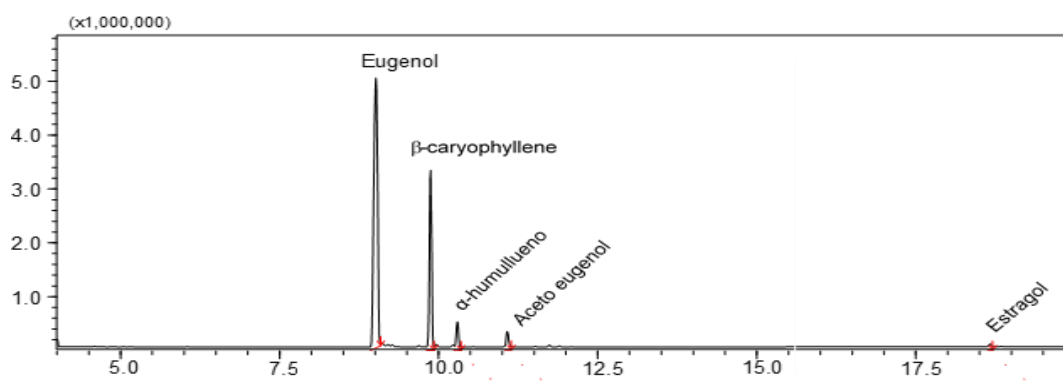
#### 2.4. Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste T, adotando-se cinco blocos e dez repetições, para cada tratamento. Nas figuras, letras diferentes indicam médias que diferem significativamente ( $P < 0,05$ ), barras indicam o erro padrão das medias, os dados foram analisados no programa RStudio.

### 3. Resultados

#### 3.1. Composição do óleo essencial de cravo

A análise cromatográfica identificou os principais componentes do EOcr e suas proporções relativas, sendo eugenol em 68,18%, seu composto majoritário, seguido de  $\beta$ -cariofileno com 25,69%,  $\alpha$ -humuleno 3,40%, acetato de eugenol 2,37% e estragol 0,37%, conforme cromatograma da Figura-01. Trabalho de revisão de literatura realizado por Affonso et al. (2012) relata uma série de publicações que apresentam uma concentração de eugenol entre 78,00 a 91,2%, o óleo utilizado neste trabalho apresentou teores inferiores. Ainda assim, semelhante à caracterização química do óleo essencial detectada por GC-MS realizada por STOKŁOSA et al., (2012) e TELES et al., (2021), que encontraram 63,96% e 52,53%, respectivamente.

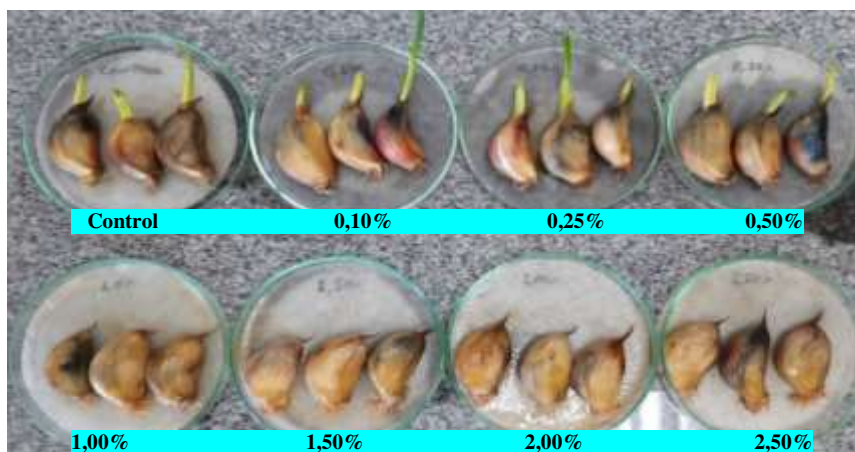


**Figura 01-** Cromatograma demonstra os componentes majoritários do óleo essencial de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) usado em nossos experimentos.

### 3.2. Experimentos 2021

#### 3.2.1. Inibição da germinação de bulbilhos *in vitro*

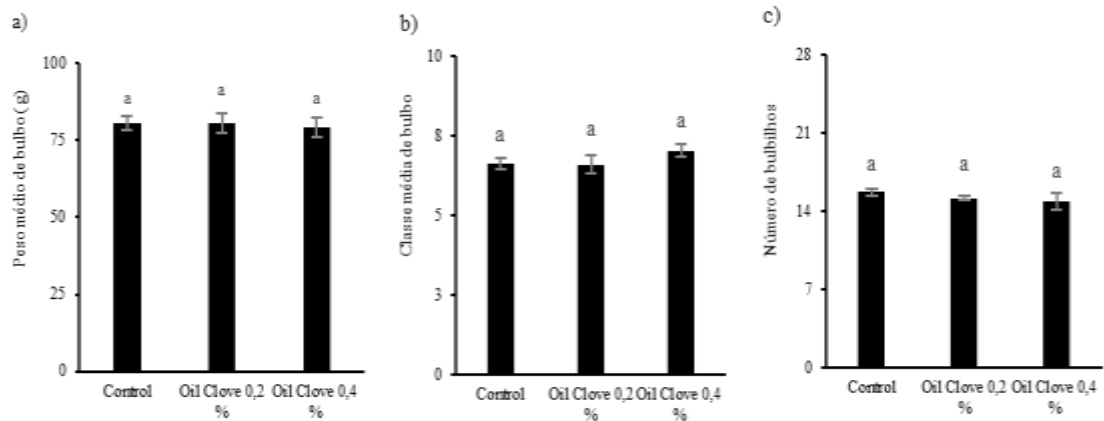
O óleo essencial de cravo foi ativo na germinação de bulbilhos de alho, conforme Figura 02. A aplicação de concentrações crescentes de óleo de cravo permitiu identificar a existência de efeito inibitório na germinação de bulbilhos. Soluções com concentração igual ou inferior a 0,5% não afetaram a germinação. Entretanto, concentrações de 1% ou mais do óleo inibiram 100% da germinação, confirmando que doses maiores do óleo possuem atividade herbicida inibindo a germinação dos bulbilhos de alho.



**Figura 02-** Ensaio inibitório da germinação de bulbilhos de alho tratados com óleo de cravo em diferentes concentrações (0-control, 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 2,50 %) após 5 dias em câmara de crescimento tipo BOD a 25 °C.

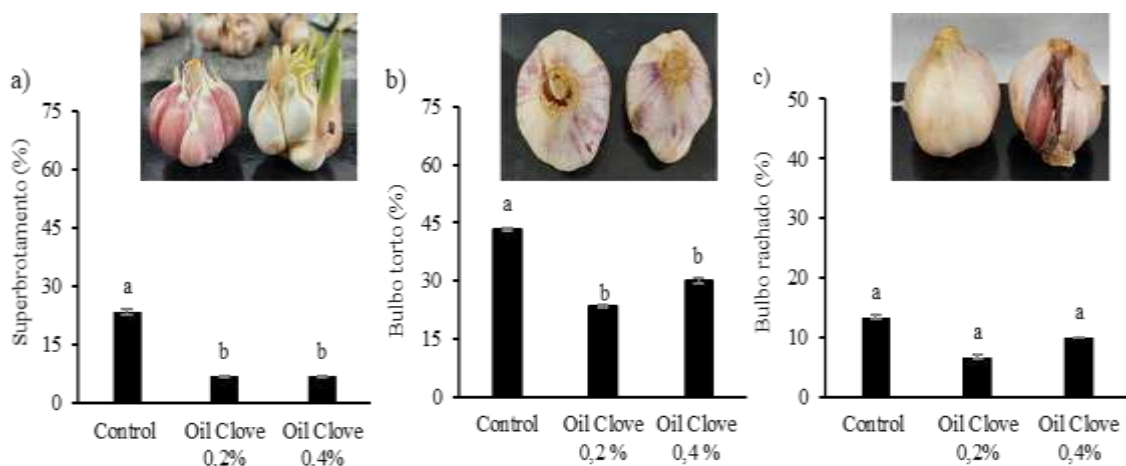
#### 3.2.2. Experimento de campo – safra 2021

Os parâmetros peso médio dos bulbos, classe e número de bulbilhos não foram afetados pela aplicação do EOcr, não apresentando diferenças entre o grupo controle e os tratamentos com 0,2 e 0,4% do óleo (Figura 03), mostrando que as doses aplicadas não apresentam impacto na produtividade.



**Figura 03-** Qualidade de bulbos de alho de plantas submetidas a pulverização com diferentes concentrações de solução de óleo de cravo (0-control, 0,20 e 0,40 %) na safra 2021. Medias de peso de bulbo (a), classe (b) e número de bulbilhos (c). Os dados foram as médias de 30 plantas, o erro padrão foi indicado por barras e letras iguais indicam que não há diferença estatística pelo test T a 5 %.

A aplicação de EOcr apresentou redução no número de alhos com crescimento secundário, onde os grupos pulverizados com óleo de cravo apresentaram teor de 6,67%, já o grupo controle apresentou porcentagem de 23,33%. Também foi observada redução de bulbos tortos, onde o grupo controle teve 43,33% e os grupos pulverizados com 0,2 e 0,4% reduziram para 23,33% e 30,00%, respectivamente. Quanto ao teor de bulbos rachados, observou-se média de 13,33% para o grupo controle, 6,67% e 10,00% para os grupos pulverizados com 0,2% e 0,4%; entretanto, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Figura 04).



**Figura 04-** Presença de anomalias em bulbos de alho de plantas submetidas a pulverização com diferentes concentrações de solução de óleo de cravo (0-control, 0,20 e 0,40 %) safra 2021. Teor de superbrotamento (a), bulbo torto (b) e bulbo rachado (c). Os dados foram as médias de

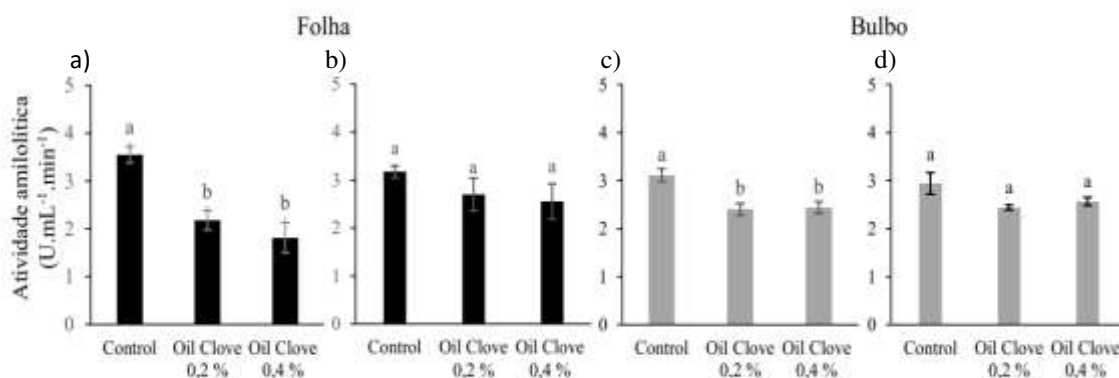
30 plantas, o erro padrão foi indicado por barras e letras iguais indicam que não há diferença estatística pelo test T a 5 % de probabilidade.

### 3.3.2. Concentração de proteína solúvel total (PST)

A aplicação de óleo de cravo não alterou o teor de proteína solúvel nos tecidos vegetais, tanto para folhas quanto para bulbos em formação, nas duas datas analisadas, mostrando que a aplicação do óleo não impacta na síntese proteínas soluveis (Figura 01-Suplementar material).

### 3.3.3. Atividade amilolítica

Após três dias de pulverização com óleo de cravo, as plantas apresentaram redução significativa ( $P < 0,05$ ) na atividade amilolítica. Em média, as plantas tratadas com o óleo tiveram atividade 1,79 vezes menor nas folhas e 1,28 vezes menor nos bulbos em desenvolvimento em relação ao grupo controle. Após sete dias de pulverização, observou-se que a atividade das enzimas foi restabelecida. Porém, as plantas tratadas com o EOcr apresentaram valor médio inferior; não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 05).



**Figura 05-** Efeito na atividade amilolítica de folhas e bulbos em desenvolvimento de plantas de alho pulverizadas com diferentes concentrações de solução de óleo de cravo (0-control, 0,20 e 0,40 %) após 3 (a e b) e 7 (c e d) dias à pulverização. Os dados foram as médias de cinco repetições, e o desvio padrão foi indicado por barras, letras iguais indicam que não há diferença estatística pelo test T a 5 % de probabilidade.

### 3.3.4. Impacto na atividade fotossintética de plantas tratadas com óleo de cravo

Os parâmetros fotossintéticos das plantas tratadas com óleo de cravo três dias após a pulverização apresentaram alterações semelhantes para as doses de 0,2 e 0,4% (Tabela-01), onde foi possível observar uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) de A, gs, Trmmol, PhiPS2, qP

e ETR A alteração dessas características funcionais foliares confirma que a aplicação de óleo de cravo causa danos ao tecido, gera uma condição de estresse para as plantas e, conseqüentemente, impacta sua eficiência e desenvolvimento. No entanto, após sete dias, ambos os tratamentos já haviam restabelecido as condições fotossintéticas semelhantes ao grupo controle. Em nenhum momento foi observado dano visual ao tecido foliar. A relação Ci/Ca não apresentou diferenças estáticas entre os tratamentos.

**Tabela 01-** Variáveis fotossintéticas das folhas de alho 3 e 7 dias após aplicação foliar das soluções de óleo de cravo (0, 0,2 e 0,4 %).

Dose (%)	A	g <sub>s</sub>	Trmmol	PhiPS <sub>2</sub>	qP	ETR	Ci/Ca
Após 3 dias							
Controle	18,04a	0,34a	4,06a	0,28a	0,58a	141,91a	0,74a
Óleo de cravo 0,2	13,68b	0,29b	3,22b	0,22b	0,44b	113,58ab	0,72a
Óleo de cravo 0,4	13,92b	0,26b	2,85b	0,22b	0,40b	106,20b	0,69a
Após 7 dias							
Controle	20,51a	0,51a	3,57a	0,20a	0,36a	103,30a	0,81a
Óleo de cravo 0,2	20,34a	0,55a	3,74a	0,22a	0,39a	115,53a	0,80a
Óleo de cravo 0,4	20,06a	0,55a	3,74a	0,20a	0,33a	103,63a	0,82a

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de média Tukey com  $P < 0,05\%$ .

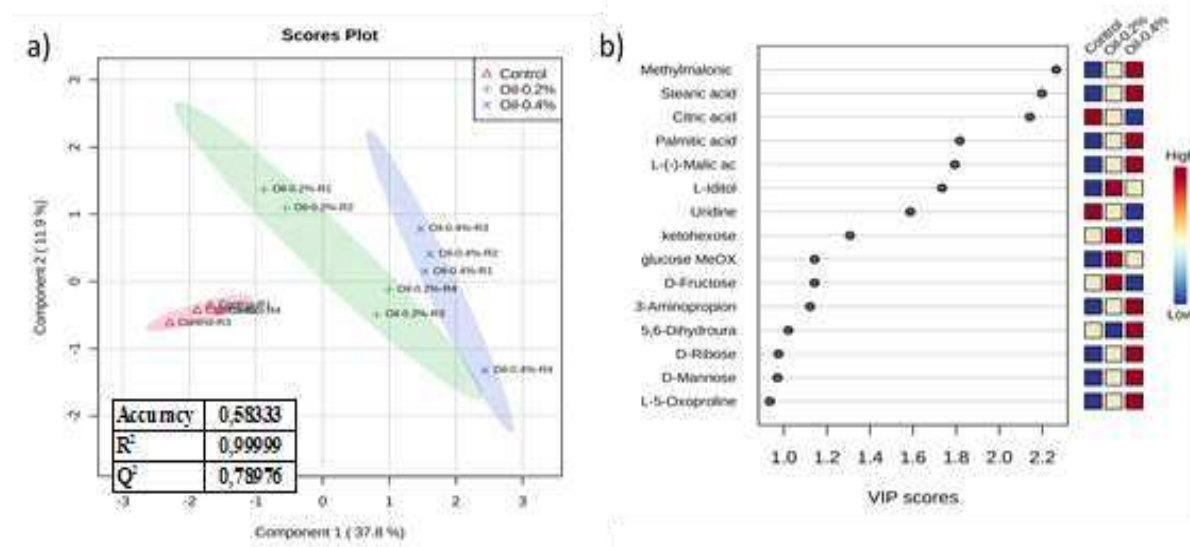
(A) Taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (g<sub>s</sub>) Condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (Trmmol) Taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (PhiPS<sub>2</sub>) Eficiência quântica do transporte fotossintético de elétrons por meio do fotossistema II, (qP) Coeficiente de extinção fotoquímica (radiação ativa fotossintética 400 a 700 nm), (ETR) Eficiência de transporte de elétrons, (Ci/Ca) concentração de CO<sub>2</sub> intercelular / CO<sub>2</sub> ambiente.

### 3.3.5. Perfil metabólico das plantas

Em relação aos metabólitos do tecido que reveste o bulbo, que posteriormente formará a túnica, foram identificados 35 compostos. No entanto, não foram identificadas diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. A análise multivariada PLS-DA mostrou perfil semelhante para todos os grupos, não discriminando diferenças entre o grupo controle e os tratados com óleo de cravo (Figura 02-Material Complementar), demonstrando que a aplicação de óleo de cravo nas folhas não causou alterações na síntese de metabólitos em tecidos em bulbificação.

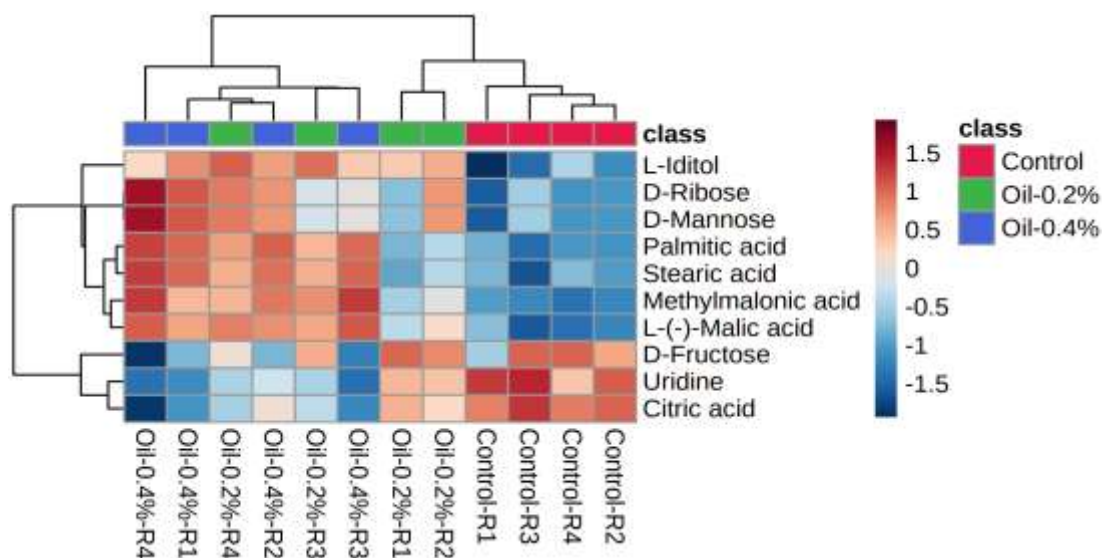
Nas folhas analisadas foram identificados 41 metabólitos mais expressivos, sendo que a análise de variância identificou 10 metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 01-Material Complementar). O PLS-DA usado para discriminar o comportamento entre o grupo controle e grupos tratados com óleo de cravo foi eficaz em separar os tratamentos de forma distinta entre eles, onde o grupo controle apresentou maior distanciamento dos demais grupos tratados com 0,2 e 0,4% de óleo de cravo (Figura 06-a), mostrando a existência de comportamento diferenciado na síntese metabólica das plantas. Os

grupos 0,2 e 0,4% apresentaram tendência de separação parcial, evidenciando diferente efeito em resposta às concentrações de óleo aplicado. Os metabólitos primários (15 primeiros) responsáveis pela discriminação entre os grupos são indicados pelo gráfico da importância da variável de projeção (escores VIP) (Figura 06-b). Como o PLS-DA é um modelo supervisionado, a validação cruzada foi realizada para avaliar o nível de sobre ajuste do modelo, com um  $Q^2$  de 0,789, indicando um bom modelo preditivo para o conjunto de dados.



**Figura 06-** PLS-DA (*Partial least square–discriminant analyses*) referente aos 41 metabólitos encontrados no extrato das folhas de plantas de alho tratadas com solução de óleo de cravo. Grupo Controle (vermelho) e tratamento com 0,2 % (verde) e 0,4 % (azul) da solução (a). Análise de pontuação VIP (*Variable Importance in Projection*) revela principais componentes que contribuíram para o modelo de discriminação dos tratamentos (b).

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi realizada para os dez metabólitos significativamente diferentes no estudo de variância. Um mapa de calor permite uma visão abrangente de quais metabólitos são mais distintos em cada coorte (Figura 07), de modo que a composição metabólica permitiu separar os grupos tratados com óleo de cravo do grupo controle. Os metabólitos D-frutose, uridina e ácido cítrico foram menores nos grupos tratados com óleo de cravo, que apresentaram maior intensidade dos carboidratos iditol, ribose, manose e ácidos palmítico, esteárico, metilmalônico e málico.



**Figura 07-** Os extratos das folhas apresentaram 10 metabólitos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) indicados no mapa de calor e agrupados por mensuração de distância Euclidiana, grupo controle (vermelho) e tratamentos com 0,2 % (verde) e 0,4 % (azul) de óleo de cravo após 3 dias a pulverização.

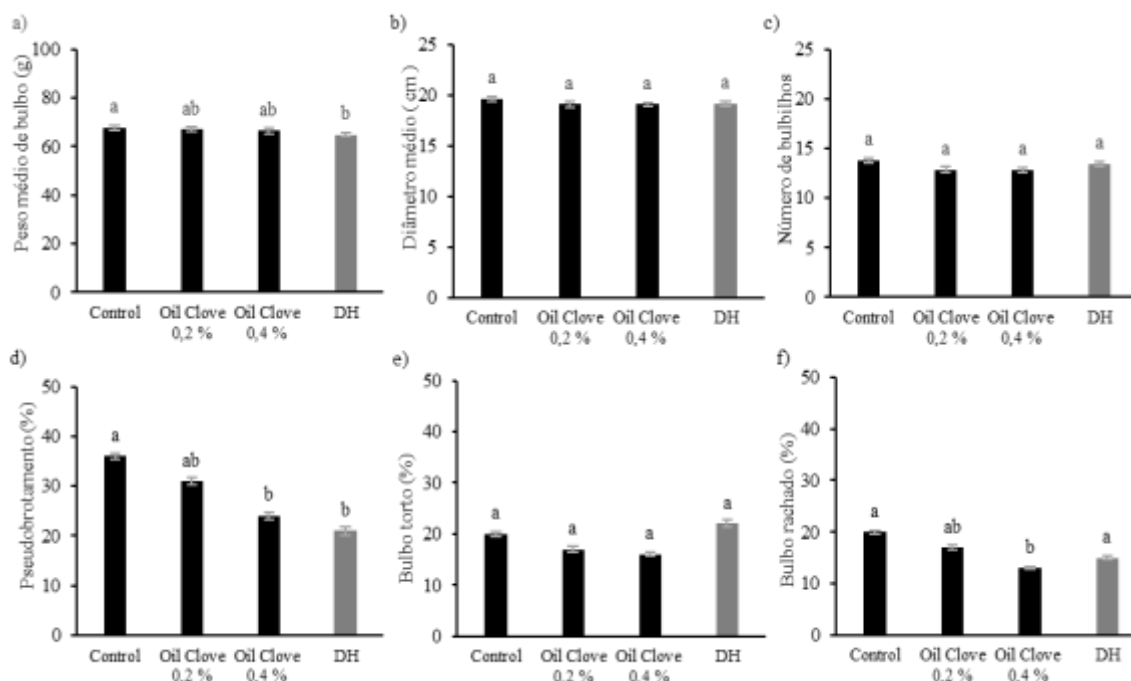
A análise de enriquecimento e impacto de vias foi realizada em contraste com o grupo controle e tratamento com óleo de cravo 0,4% de todos os metabólitos indicados na análise discriminante PLS-DA VIP, uma vez que, dentre estes estavam presentes todos os metabólitos significativos na análise de variância. Foi identificado distúrbio nas vias: Alongamento de ácidos graxos (1), Biossíntese de cutina, suberina e cera (2), Biossíntese de ácidos graxos (3), Biossíntese de ácidos graxos insaturados (4), Degradação de valina, leucina e isoleucina (5) e Metabolismo do Glioxilato e Dicarboxilato (6), seus graus de impacto e estatísticas (P-valor e FDR) estão ilustrados no Material Suplementar (Figura 03- Material Suplementar).

### 3.4. Experimento de campo – safra 2022

#### 3.4.1. Qualidade dos bulbos de alho e presença de anomalias

No experimento em campo da safra de 2022 utilizou-se o déficit hídrico de 21 dias como tratamento (controle negativo) e foi observado uma redução no peso médio dos bulbos em relação ao grupo controle (Figura 08-a), sendo que a aplicação de EOCr nas duas concentrações não impactou no peso dos bulbos, assim como no diâmetro médio, número de bulbilhos e presença de bulbos tortos, não apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos. O teor de superbrotação foi reduzido quando se aplicou a dose de 0,4% do óleo, efeito semelhante ao

déficit hídrico (Figura 08-d). Quanto ao teor de bulbos rachados, apenas o tratamento com 0.4 % do EOcr apresentou uma redução significativa (Figura 08-f).



**Figura 08-** Efeito da aplicação de óleo de cravo via pulverização em diferentes concentrações (0-control, 0,20 e 0,40 %) e 21 dias de déficit hídrico (DH) em plantas de alho no início da diferenciação na safra 2022. Médias de peso de bulbo (a), diâmetro médio (b), número de bulbilhos (c), superbrotamento (d), bulbo torto (e) e bulbo rachado (f). Os dados representam as médias (n=50 plantas), o erro padrão foi indicado por barras e letras iguais indicam que não há diferença estatística pelo test T a 5 % de probabilidade.

#### 4. Discussão

A análise GC-MS caracteriza efetivamente o óleo de cravo e confirma que o eugenol é seu composto majoritário. Diferentes concentrações dos constituintes desse óleo essencial têm sido relatadas na literatura. Eles podem estar diretamente relacionados ao método de extração utilizado na produção, bem como diferentes condições de destilação, armazenamento, áreas de cultivo, fatores bióticos e abióticos, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta e condições climáticas são fatores responsáveis pela alteração de sua composição (TELES et al., 2021).

A inibição do superbrotamento é um desafio para os produtores de alho de regiões tropicais, uma das alternativas buscada é a aplicação de substâncias inibidoras de crescimento ou de germinação no período de diferenciação da cultura, gerando condição de estresse e inibindo o desenvolvimento vegetativo. As substâncias cycocel (CCC), cloreto de chlormequate (CCC), Paclobutrazol (PBZ) e etil-trinexapac (ETP) já foram testadas para inibir o crescimento secundário na cultura do alho, com resultado promissor obtido com etil-trinexapac (ETP). Os resultados obtidos com óleo essencial de cravo, aplicado na dose de 0,4 %, no estágio de diferenciação, promoveu estresse na planta, sem causar danos visuais como clorose, necrose e murcha do tecido foliar, mas levando a planta a diminuir a taxa fotossintética e reduzir a atividade das enzimas hidrolíticas do amido. O estresse provocado pela aplicação de EO<sub>Cr</sub> foi capaz de reduzir o número de bulbos superbrotados ao final do ciclo, sem reduzir a produtividade da cultura. Tais resultados encontram suporte na literatura, pois o óleo essencial de cravo, um produto natural, de baixo custo, é rico em eugenol, uma substância com conhecida atividade inibidora de germinação e atividade herbicida (AHUJA et al., 2015; STOKŁOSA et al., 2012; TWORKOSKI, 2002) e que é capaz de inibir a germinação de trigo (DARABI et al., 2011), reduzir a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase em arroz, assim como sua germinação (HU et al., 2017) e de suprimir a brotação em tubérculos de batata (FINGER et al., 2018).

Dentre as vias metabólicas que foram impactadas devido à aplicação de óleo de cravo nas folhas de alho, é possível correlacionar um grupo de vias: Alongamento de ácidos graxos (1), biossíntese de cutina, suberina e cera (2), biossíntese de ácidos graxos e ácidos graxos insaturados (3 e 4), em função do metabolismo das ceras cuticulares, ou poliésteres lipídicos, como a cutina e a suberina.

Cutina e suberina são polímeros lipídicos insolúveis que fornecem funções de barreira à parede celular dos tecidos vegetais, incluindo a epiderme, endoderme e periderme; seus precursores lipídicos são principalmente ácido esteárico-C18, ácido palmítico-C18 e ácido oleico-C18:1. Várias suberinas possuem cadeias com mais de 20 carbonos, o que requer etapas de alongamento envolvendo cetoacil-CoA sintases. Em contraste com a cutina que cobre a parede epidérmica externa, a suberina é depositada principalmente na face interna das paredes celulares primárias, seja constitutivamente durante o desenvolvimento da planta ou em resposta ao estresse e lesões (BEISSON; LI-BEISSON; POLLARD, 2012). Ao avaliar os metabólitos das folhas tratadas, foi evidenciado aumento significativo dos ácidos palmítico e esteárico em resposta à aplicação de soluções de óleo de cravo, como visto, causa danos às células do tecido de revestimento e assim a planta precisa direcionar sua síntese metabólica para reparar esses tecidos e corrigir os danos causados.

Em algumas condições adversas, plantas iniciam rotas metabólicas alternativas a fotorrespiração para melhorar sua eficiência e crescimento, uma alternativa é a degradação de aminoácidos, que pode contribuir substancialmente para o estado de energia das células vegetais sob certas condições fisiológicas, por exemplo, falta de carbono (HILDEBRANDT et al., 2015). A via de degradação da leucina, isoleucina e valina (5) leva a produção de acetil-CoA e CO<sub>2</sub> tendo como um dos seus metabolitos intermediários o ácido metilmalônico (metilmalonato), que apresentou cerca de 5.8 vezes mais concentrado nas amostras tratadas com óleo de cravo, indicando que a via de degradação de aminoácidos foi ativada para suprir a demanda acetil-CoA e CO<sub>2</sub>, uma vez que as plantas tratadas com óleo de cravo apresentaram uma redução nas taxas fotossintéticas, assim como uma menor concentração de ácido cítrico e frutose (4.48 e 1.77 vezes menor), que são substratos ao Ciclo de Krebs e Ciclo do Glioxilato (Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato (6)) na produção de energia celular. A rede completa de metabolitos pode ser vista no mapa 00280-Degradação de valina, leucina e isoleucina (<https://www.kegg.jp/pathway/map00280+C02170>) e no mapa 00020-Ciclo de citrato (<https://www.genoma.jp/pathway/map00020+C00158>), onde demonstra que os produtos desta degradação de aminoácidos podem ser direcionados para a biossíntese de ácidos graxos, o que corrobora com as maiores concentrações de ácido palmítico e esteárico, que foram cerca de 5,26 e 3,12 vezes maiores, respectivamente, nos tratamentos com aplicação de 0,4% de óleo de cravo.

O ciclo do glioxilato, rota alternativa à fotorrespiração em plantas, tem como função primária a conversão de duas moléculas de acetil-CoA em succinato; no entanto, no ciclo do glioxilato, o substrato é o isocitrato, que em vez de ser descarboxilado como no ciclo do ácido cítrico, é decomposto pela isocitrato liase em succinato e glioxilato. Em seguida, outra molécula de acetil-CoA condensa com glioxilato para formar malato, catalisada pela malato sintase. Em seguida, o malato é oxidado a oxaloacetato, dando continuidade ao ciclo, e o succinato formado segue pelas vias de produção de energia (TAIZ et al., 2017). Plantas tratadas com solução de óleo de cravo apresentaram cerca de 3,03 vezes mais ácido málico (malato), fato que indica um impacto positivo nessa via anaplerótica, pois ela contorna as duas etapas de descarboxilação existentes no ciclo do ácido cítrico, gerando uma molécula extra de succinato (BEECKMANS; XIE, 2015).

O óleo de cravo gera impactos no metabolismo das plantas de alho. No entanto, sua gama de compostos orgânicos é metabolizada pelas plantas rapidamente sem causar danos significativos à cultura, pois a aplicação das doses 0,2 e 0,4% não impactou na produtividade e classificação dos bulbos. O estresse causado a planta interferiu efetivamente o aparecimento de

superbrotos, pois a aplicação de 0,4% do óleo reduziu a presença dessa anomalia. O manejo onde aplicou-se déficit hídrico, foi o que mais reduziu a presença dos superbrotos, mas em contrapartida reduziu o peso médio dos bulbos em cerca de 3 %, causando impacto negativo a produtividade.

## **5. Conclusões**

A aplicação exógena de EOcr como inibidor de superbrotamento se mostrou uma ferramenta agrônômica (agroquímica) com grande potencial para gerar um produto sustentável para no futuro, pois EOcr, rico em eugenol mostrou grande potencial para reduzir a presença de brotação secundária em plantas de alho. Estudos semelhantes são escassos na literatura, portanto o presente estudo preenche essa lacuna: identificar substâncias naturais com potencial para inibir a brotação secundária em alho.

A solubilidade do eugenol, um fenilpropanóide, pode ser um fator limitante em conferir toxicidade às plantas. Novas concentrações de óleo e combinações de surfactantes podem melhorar a ação desse inibidor, tornando-o um inibidor promissor da brotação secundária em alho.

## 6. Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. [s.l.] Allured publishing corporation Carol Stream, 2007. v. 456
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146–161, 2012.
- AHMED, H. G. et al. **Respon of garlic to irrigation interval and clove size in semi-arid, Nigeria** *Journal of Plant Sciences*, 2007.
- AHUJA, N. et al. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 209–218, 2015.
- ALVES, T. A. et al. Bioactivity and molecular properties of phenoxyacetic acids derived from eugenol and guaiacol compared to the herbicide 2,4-d. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–18, 2021.
- BARBOSA, I. R. Inibidores de giberelina e restrição hídrica na modulação do superbrotamento em alho (*Allium sativum* L.) cultivado no cerrado. 2021.
- BEECKMANS, S.; XIE, J. P. **Glyoxylate Cycle**☆. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.
- BEISSON, F.; LI-BEISSON, Y.; POLLARD, M. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 329–337, 2012.
- BENEDÉ, S. et al. *Allium porrum* extract decreases effector cell degranulation and modulates airway epithelial cell function. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2019.
- BERLATO, G. Cultivo do alho ainda é desafio , mas tem potencial de mercado no Ceará. p. 1–8, 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROWN, H. M.; PURVES, W. K. Isolation and characterization of indole 3 acetaldehyde reductases from *Cucumis sativus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 4, p. 907–913, 1976.
- BÜLL, L. T. et al. Produção de bulbos e incidência de pseudoperfilhamento na cultura do alho vernalizado em função de adubações potássicas e nitrogenadas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 247–255, 2002.
- BURBA, J. L.; GALMARINI, C. R. **First international symposium on edible Alliaceae**.

International Symposium on Edible Alliaceae 1994: Mendoza, Argentina). **Anais...International Society for Horticultural Science**, 1997.

BURBA, J. L.; MULLER, J. J. V; CASSALI, V. W. D. Relaciones entre el índice visual de superación de dormición (IVD) en ajo (*Allium sativum* L.) con el tamaño y posición de bulbillos. **AgriScientia**, v. 4, p. 99–102, 1983.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. **Quimica Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CASTRO, P. R. C. Mecanismo de ação auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 36, n. 0, p. 621–634, 1979.

CHAI, Q. et al. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 1, p. 1–21, 2016.

CHATTOPADHYAY, N.; LALRINPUII, F.; THAPA, U. Influence of plant growth regulators on growth and yield of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Crop and Weed**, v. 11, n. 2, p. 67–71, 2015.

CLELAND, R. E. Auxin and cell elongation. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development**. [s.l.] Springer, 1987. p. 132–148.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

CUNHA, M. L. P. et al. Modeling of nutrients demands in garlic crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1205–1213, 2015.

DARABI, H. R. et al. Clove bud oil: An efficient, economical and widely available oil for the inhibition of wheat seed germination. **Environmental Chemistry Letters**, v. 9, n. 4, p. 519–524, 2011.

DING, S. et al. Changes in pectin characteristics during the ripening of jujube fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4151–4159, 2017.

DO NASCIMENTO, A. L. V. et al. Physiological and agronomical responses of common bean subjected to tryptophol. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 195–202, 2016.

FABEIRO CORTÉS, C.; MARTÍN DE SANTA OLALLA, F.; LÓPEZ URREA, R. Production of garlic (*Allium sativum* L.) under controlled deficit irrigation in a semi-arid climate. **Agricultural Water Management**, v. 59, n. 2, p. 155–167, 2003.

FERRI; M G. **Fisiologia Vegetal I e II**São Paulo: EPV-Editora da Universidade de São Paulo, , 1985.

FINGER, F. L. et al. Action of essential oils on sprouting of non-dormant potato tubers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

GARCIA, A. **Influencia da irrigacao no crescimento, producao e superbrotamento do alho (Allium sativum, L.)**. [s.l.] Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1964.

GONÇALVES, F. A. R. et al. Non-destructive evaluation of the leaf area of garlic crop using mathematical models. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 5, p. 1600–1606, 2020.

HILDEBRANDT, T. M. et al. Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HU, Q. et al. Inhibitory effect of eugenol on seed germination and pre-harvest sprouting of hybrid rice (*Oryza sativa* L.). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

JOS, R.; SOUZA, D. E. Influência do Nitrogênio , Potássio , Cycocel e Paclobutrazol na Cultura do Alho. 1990.

KAPLAN, F. et al. Exploring the Temperature-Stress Metabolome. **Plant physiology**, v. 136, n. December, p. 4159–4168, 2004.

KRARUP, C. H.; TROBOK, S. V. Efectos de sistemas de plantación sobre rendimiento calidad del bulbo y aprovechamiento de la fertilization nitrogenada en ajo (*Allium sativum* L.). **Fitotecnia Latinoamericana**, v. 11, p. 39–42, 1975.

LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature Methods**, v. 15, n. 1, p. 53–56, 2018a.

LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature methods**, v. 15, n. 1, p. 53–56, 2018b.

LANDAU, E. C.; BARTOLOMEU, R. D. DE S.; DA SILVA, G. A. Evolução da produção de alho (*Allium sativum*, Amaryllidaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.

LEE, D.-K. et al. Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016a.

LEE, D. K. et al. Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016b.

LEITE, V. S. A.; REIS, M. R.; PINTO, F. G. Untargeted Metabolomics Reveals Metabolic Changes Linked to Bulb Purpling in Garlic (*Allium sativum* L.) . **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 242–248, 2021.

LONGHI, C. D. N.; WILPERT, L. S.; BOSCO, L. C. Filocrono de alho nobre cultivado sob influência da vernalização. **Agrometeoros**, v. 27, n. 1, p. 209–216, 2020.

MACÊDO, F. S. et al. Produtividade de alho vernalizado em função de doses de nitrogênio e molibdênio. **Bragantia**, v. 68, p. 657–663, 2009.

MACÊDO, F. S.; DE SOUZA, R. J.; PEREIRA, G. M. Controle de superbrotamento e produtividade de alho vernalizado sob estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 629–635, 2006.

MAGNUS, V. et al. Metabolism of Tryptophan, Indole-3-acetic Acid, and Related Compounds in Parasitic Plants from the Genus Orobanche. **Plant Physiology**, v. 69, n. 4, p. 853–858, 1982.

MOON, W.; LEE, B.-Y. Influence of short day treatment on the growth and levels of endogenous growth substances in garlic plants (*Allium sativum* L.). **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v. 21, n. 2, p. 109–118, 1980.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

NIKOLOVA, M. et al. GC/MS Based Metabolite Profiling and Antioxidant Activity of Balkan and Bulgarian Endemic Plants. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 84, n. 1, p. 59–65, 2019a.

NIKOLOVA, M. et al. GC/MS based metabolite profiling and antioxidant activity of balkan and bulgarian endemic plants. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 84, n. 1, p. 59–65, 2019b.

PALMIERI, A.; PETRINI, M. Tryptophol and derivatives: Natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 490–530, 2019.

PARK, Y. B.; LEE, B. Y. Study on the growth and bulb formation of garlic plants (*Allium sativum* L.). I. The effect of day-length on the bulb formation and secondary growth in 6 cloved garlic plants. **Han'guk Wonye Hakhoe chi.= Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 1979.

PEIXOTO, C. P. et al. Princípios de Fisiologia Vegetal: teoria e prática. **Rio de Janeiro: Pod Editora**, 2020.

PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 290–295, 2011.

PURVES, W. K.; BROWN, H. M. Indoleacetaldehyde in Cucumber Seedlings. **Plant Physiology**, v. 61, n. 1, p. 104–106, 1978.

QUITTENDEN, L. J. et al. Auxin biosynthesis in pea: Characterization of the tryptamine

pathway. **Plant Physiology**, v. 151, n. 3, p. 1130–1138, 2009.

RAYLE, D. L.; PURVES, W. K. Conversion of Indole-3-Ethanol to Indole-3-Acetic Acid in Cucumber Seedling Shoots. **Plant Physiology**, v. 42, n. 8, p. 1091–1093, 1967.

RESENDE, G. M. DE et al. Efeitos do paclobutrazol em diferentes concentrações e períodos de imersão na cultura do alho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 635–639, 1999.

RESENDE, J. T. V. DE et al. Garlic vernalization and planting dates in Guarapuava. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 193–198, 2011.

RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortaliças em Revista, ano**, v. 7, p. 16–17, 2018.

SANDBERG, G. Biosynthesis and metabolism of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by *Pinus sylvestris* L. needles. **Planta**, v. 161, n. 5, p. 398–403, 1984.

SANTIN, J. R. et al. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p. 149–158, 2011.

SANTORO, G. F. et al. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283–290, 2007.

SARWAR, M.; FRANKENBERGER, W. T. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. **Plant and soil**, v. 160, n. 1, p. 97–104, 1994.

SOUZA, R. J. DE; CASALI, V. W. D. Pseudoperfilhamento: uma anormalidade genético-fisiológica em alho. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 142, p. 36–41, 1986.

SOUZA, R. J. DE; MACÊDO, F. S. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 651–654, 2004.

SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Editora da Univates. Lajeado-RS**, 2014.

STOKŁOSA, A. et al. Phytotoxic Activity of Clove Oil, Its Constituents, and Its Modification by Light Intensity in Broccoli and Common Lambsquarters ( *Chenopodium album* ) . **Weed Science**, v. 60, n. 4, p. 607–611, 2012.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TELES, A. M. et al. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. **Evidence-**

based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

TRANI, P. E. et al. Produtividade e pseudoperfilhamento do alho influenciados pelo nitrogênio, potássio e cobertura morta. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 330–334, 2008.

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

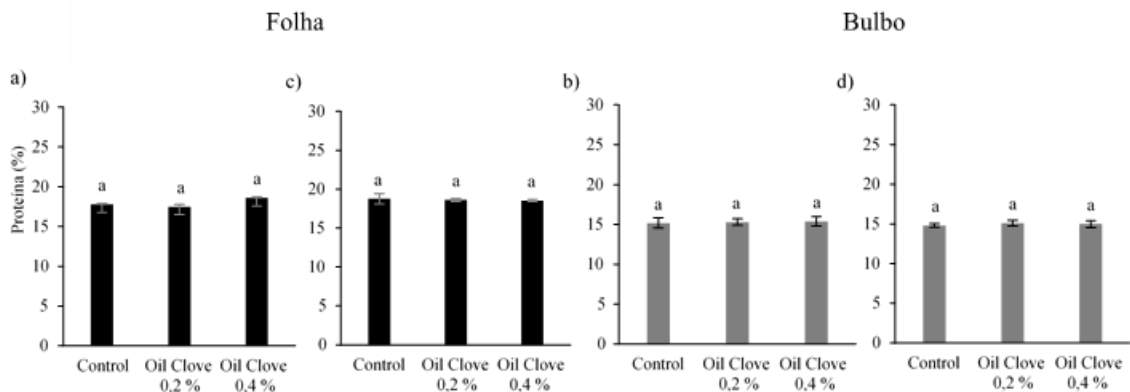
VICKERY, L. E.; PURVES, W. K. Isolation of Indole-3-ethanol Oxidase from Cucumber Seedlings. **Plant Physiology**, v. 49, n. 5, p. 716–721, 1972.

WU, C. et al. Response of garlic (*Allium sativum* L.) bolting and bulbing to temperature and photoperiod treatments. **Biology Open**, v. 5, n. 4, p. 507–518, 2016.

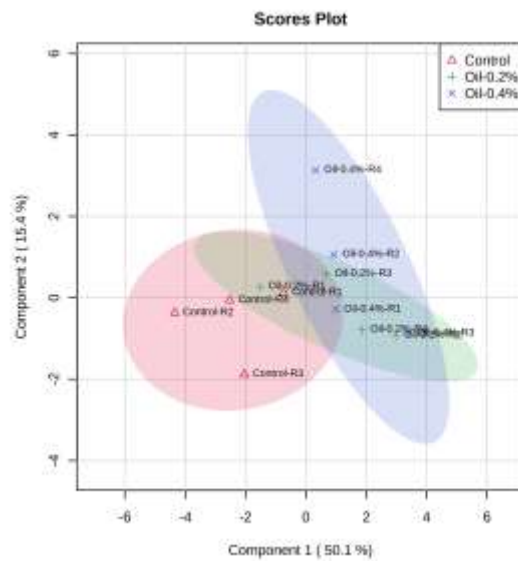
YOKOYAMA, C. et al. Novel tryptophan metabolic pathways in auxin biosynthesis in silkworm. **Journal of Insect Physiology**, v. 101, n. June, p. 91–96, 2017.

ZHU, J. S.; SCOTT, G. K. Purification, characterization and developmental expression of indole-3-ethanol oxidase from seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 2, p. 423–432, 1995.

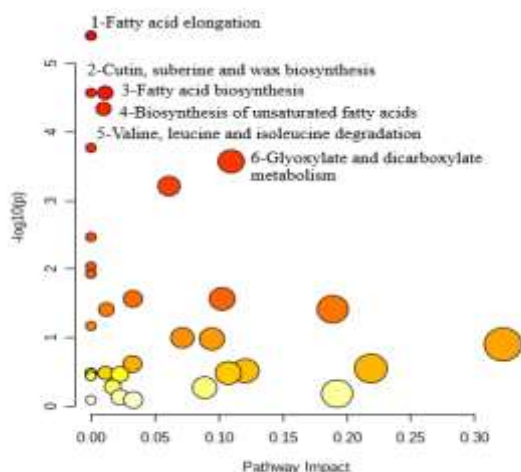
## 7. Material Suplementar



**Figura 01-** Teor de proteína solúvel em folhas e bulbos em desenvolvimento de plantas de alho pulverizadas com diferentes concentrações de solução de óleo de cravo (0-control, 0,20 e 0,40 %) após 3 (a e c) e 7 (b e d) dias à pulverização. Os dados são médias de cinco repetições, erro padrão indicado por barras, letras iguais indicam que não há diferença estatística pelo test T a 5 % de probabilidade.



**Figura 02-** PLS-DA referente aos 35 metabolitos dos bulbos em desenvolvimento de plantas de alho pulverizadas com solução de óleo de cravo. Grupo Controle (vermelho) e tratamento com 0,2 % (verde) e 0,4 % (azul). Os metabolitos analisados não possibilitam discriminar os tratamentos aplicados como diferentes ao grupo controle.



Rota metabólica	impacto	Valor p	FDR*
Alongamento de ácido graxo	1	$3,92 \times 10^{-6}$	$7,45 \times 10^{-5}$
Biossíntese de cutina, suberina e cera	2	$3,92 \times 10^{-6}$	$7,45 \times 10^{-5}$
Biossíntese de ácidos graxos	3	$2,66 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-4}$
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	4	$2,66 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-4}$
Degradação de valina, leucina e isoleucina	5	$4,57 \times 10^{-5}$	$3,47 \times 10^{-4}$
Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	6	$2,68 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-3}$

**Figura 03-** Impacto da via e significância estatística das vias metabólicas identificadas através da análise de enriquecimento das vias aplicado aos 41 metabólitos identificados nas folhas de alho. Observe que o eixo y mostra o logaritmo negativo dos valores p; portanto, os caminhos com maior significância estatística são plotados mais alto no gráfico.

\*Vias com correção de FDR (False Discovery Rate- ferramenta estatística para identificar erros tipo I, onde há falsos positivos) inferior a 0,05% de probabilidade foram consideradas perturbadas e estão listadas na tabela ao lado.

**Tabela 01-** Metabólitos identificados nos extratos de folhas de plantas de alho que são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Controle e tratamentos 0,2 e 0,4 % de óleo de cravo, após 3 dias a pulverização.

Metabólito	Valor F	Valor p	FDR	Teste de Tukey*
ácido metilmalônico	29,416	0,0001	0,0025	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control; Oil-0.4% - Oil-0.2%
ácido L-málico	28,978	0,0001	0,0024	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control
ácido palmítico	25,464	0,0001	0,0024	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control; Oil-0.4% - Oil-0.2%
L-Iditol	24,221	0,0002	0,0024	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control
ácido esteárico	18,492	0,0006	0,0053	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control; Oil-0.4% - Oil-0.2%
uridina	16,14	0,0010	0,0072	Control - Oil-0.2%; Control - Oil-0.4%; Oil-0.2% - Oil-0.4%
ácido Cítrico	13,477	0,0019	0,0115	Control - Oil-0.2%; Control - Oil-0.4%; Oil-0.2% - Oil-0.4%
D-frutose	12,469	0,0025	0,0130	Control - Oil-0.4%; Oil-0.2% - Oil-0.4%
D-ribose	92,329	0,0065	0,0278	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control
D-manose	91,501	0,0067	0,0278	Oil-0.2% - Control; Oil-0.4% - Control

## 5. CONCLUSÃO GERAL

O uso de triptofol e óleo de cravo na cultura do alho foram eficazes e apresentaram potencial para se tornarem bioinsumos aplicados em protocolos de manejo nessa cultura.

A aplicação de triptofol em bulbilhos de alho no pré-plantio proporcionou um melhor aproveitamento de suas reservas e maior desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, o que favoreceu o desenvolvimento das plantas e ao final do ciclo, uma maior produção de bulbos de qualidade comercial.

A aplicação de solução de óleo de cravo foi eficaz em reduzir a brotação secundária em plantas de alho, sem causar impactos negativos a sua produção.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massas como ferramenta para estudo de perfis metabólicos foi essencial para melhor elucidar o impacto no metabolismo das plantas de alho tratadas com bioinsumos.