

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO**

THAMMYRES DE ASSIS ALVES

**PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DE FENÓIS NATURAIS E DE SEUS
RESPECTIVOS DERIVADOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM BIOENSAIOS
VEGETAIS**

**ALEGRE
2017**

THAMMYRES DE ASSIS ALVES

**PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DE FENÓIS NATURAIS E DE SEUS
RESPECTIVOS DERIVADOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM BIOENSAIOS
VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento, na área de concentração de Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Taís Cristina Bastos Soares

**ALEGRE
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES,
Brasil)

A474p Alves, Thammyres de Assis, 1993-
Prospecção da toxicidade de fenóis naturais e de seus respectivos derivados
ácidos fenoxiacéticos em bioensaios vegetais / Thammyres de Assis Alves. –
2017.
77 f. : il.

Orientadora: Taís Cristina Bastos Soares.

Coorientadora: Milene Miranda Praça Fontes ; Patrícia Fontes Pinheiro.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Fitotoxicidade. 4. Produtos
químicos agrícolas. 5. Alface. 6. Sorgo. I. Soares, Tais Cristina Bastos. II.
Fontes, Milene Miranda Praça. III. Pinheiro, Patrícia Fontes. IV.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias. V. Título.

CDU: 575:631

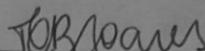
THAMMYRES DE ASSIS ALVES

**“PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE DE FENÓIS NATURAIS E DE SEUS
RESPECTIVOS DERIVADOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM BIOENSAIOS
VEGETAIS”**

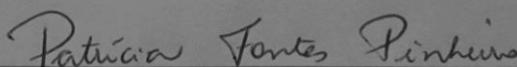
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Genética e Melhoramento na área de concentração Biotecnologia.

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2017.

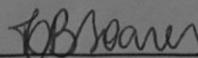
COMISSÃO EXAMINADORA



Profª Drª Taís Cristina Bastos Soares
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento - UFES
Orientadora



Profª Drª Patrícia Fontes Pinheiro
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica - UFES
Coorientadora



Profª Drª Larissa Fonseca Andrade-Vieira
Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada - UFLA
Membro Externo

Em especial, ao meu pai, Adeilton Alves,
À minha mãe Marcelina Victor de Assis Alves,
À minha irmã, Thaynnara de Assis Alves,
Ao meu irmão, Thayllon de Assis Alves,
Ao meu sobrinho, João Alves Monteiro,
Ao Maikon Keoma da Cunha Henrique,

DEDICO

*“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a
inteligência e o entendimento.” Provérbios 2.6*

*“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor,
teu Deus, é contigo por onde quer que andares.” Josué 1.9*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo sustento e pela sabedoria para lidar com as adversidades.

Aos meus pais Adeilton e Marcelina, meus irmãos Thaynnara e Thayllon, ao meu namorado Maikon e ao meu cunhado Davi por acreditarem em mim, me auxiliarem em meus trabalhos de diversas maneiras, me darem força e nos momentos em que nada poderiam fazer torciam sobre maneira.

Ao meu sobrinho João e ao meu pet Ted por fazerem meus dias mais felizes e mostrarem toda a alegria do mundo ao me verem chegar em casa. Por todas as doses de fofura, que fazem qualquer problema ser esquecido e o sorriso vir aos lábios.

Aos meus avós Lirso Augusto Alves (*in memoriam*), Abigail Furtunato Alves, Pedro Alves Victor de Assis Neto, Licy Ferreira de Assis (*in memoriam*) por se dedicarem, se preocuparem comigo, me darem conselhos, me ajudarem, brigarem nos momentos oportunos e se orgulharem com as minhas conquistas.

Aos meus tios e tias que viram meu desenvolvimento. Em especial ao Thyago e a Laiza, que sempre dão aquelas dicas providenciais e que fazem tudo possível para me ver alegre. Aos meus primos e primas que me aconselharam, sofreram e comemoram comigo.

À Doutora Taís Cristina Bastos Soares por ter aceitado me orientar, oportunizando novos aprendizados. Pela paciência, pelas dicas, pelos puxões de orelha sempre dados com carinho, pela confiança em mim depositada ao aceitar a pesquisa proposta, pelo esforço feito para me auxiliar mesmo de longe e principalmente pela ajuda nos últimos meses antes da defesa, quando tudo parecia dar errado.

Às Doutoradas Milene Miranda Praça Fontes e Patrícia Fontes Pinheiro por terem aceitado me coorientar, pela credibilidade a mim atribuída, pelo auxílio, pela compreensão, por irem ao laboratório para me ajudar, por me mandarem mensagens à noite e no final de semana perguntado como estava o experimento, por ficarem ansiosas para saber os resultados das pesquisas e principalmente pela amizade construída.

À Doutora Larissa Fonseca Andrade-Vieira por me introduzir na pesquisa científica, pela dedicação, paciência e dicas. E em especial, por ter aceito o convite para participar da minha banca.

Aos meus professores que colaboraram para o meu desenvolvimento científico e acadêmico, em especial ao Doutor Paulo Cezar Cavatte e ao Doutor Adésio Ferreira.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, por oportunizar a minha pesquisa. À CAPES pela concessão da minha bolsa de estudo. À Sabrina, secretária da pós, pelo auxílio para cumprimento dos prazos, através das informações concedidas durante esses 2 anos.

Ao professor Valdemar Lacerda Júnior do Departamento de Química da UFES (Vitória-ES) pela obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das moléculas semissintéticas utilizadas neste trabalho.

Aos amigos que me acompanharam, me deram força, sofreram e comemoraram comigo. Em especial aos frequentadores dos laboratórios de química, citogenética e BQMOL, principalmente a Alexia, o Rodri, a Alessandra, a Fran, o Guto, o Thayllon, o Maikon, o Edilson, o Ramon, o Cássio, a Denise, a Lucimara, a Lili, a Carla, o Rondi.

Enfim a TODOS que participaram dessa fase comigo, meu MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

THAMMYRES DE ASSIS ALVES, filha de Marcelina Victor de Assis Alves e Adeilton Alves, nasceu em 29 de janeiro de 1993, na cidade de Alegre, Estado do Espírito Santo. Concluiu o ensino médio na E.E.E.F.M. “Professor Pedro Simão” em Alegre. Em agosto de 2010, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, graduou-se em fevereiro de 2015, recebendo o título de Licenciada em Ciências Biológicas. Em março de 2015, ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, na área de Biotecnologia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. A Produção Agrícola no Brasil e a Importância dos Agroquímicos	3
1.2. Auxinas e origem dos herbicidas auxínicos.....	5
1.3. Problemas relacionados ao uso de herbicidas	10
1.4. Novos herbicidas a partir de compostos naturais	13
1.5. Bioensaios Vegetais	17
2. Referências.....	21
CAPÍTULO 1 –TOXICIDADE DO TIMOL, CARVACROL E SEUS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM <i>Lactuca sativa</i> E <i>Sorghum bicolor</i>	
27	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Material Vegetal	28
2.2 Procedimentos Experimentais Gerais.....	28
2.3 Obtenção de ácidos fenoxiacéticos a partir de fenóis naturais	28
2.4 Teste de Fitotoxicidade	30
2.5 Teste de Citotoxicidade.....	30
2.6 Teste de Genotoxicidade	30
2.7 Análises Estatísticas	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Síntese dos ácidos fenoxiacéticos.....	33
3.2 Fitotoxicidade.....	33
3.3 Citotoxicidade	39
3.4 Genotoxicidade.....	44
4. CONCLUSÃO	48
5. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 2 – EFEITO DO GUAIACOL E DO EUGENOL E DOS SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM SEMENTES, PLÂNTULAS E CÉLULAS DE <i>Lactuca sativa</i> e <i>Sorghum bicolor</i>	
51	51
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1 Material Vegetal.....	53
2.2 Procedimentos Experimentais Gerais.....	53
2.3 Teste de Fitotoxicidade	54
2.4 Teste de Citotoxicidade.....	55

2.5	Análises Estatísticas	55
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1	Síntese dos ácidos fenoxiacéticos.....	56
3.2	Fitotoxicidade.....	56
3.3	Citotoxicidade	61
4.	CONCLUSÃO	65
5.	REFERÊNCIAS	66

RESUMO

O uso dos agrotóxicos traz muitos benefícios econômicos para a agricultura, no entanto, sua nocividade ao meio ambiente e à saúde humana são debatidos. Os herbicidas têm se destacado entre os agroquímicos mais aplicados no campo, tendo como objetivo o controle de plantas daninhas. Porém, existem vários relatos de plantas resistentes à determinados herbicidas, se fazendo necessário, uma constante busca por novos herbicidas e por métodos de controle alternativo. Nesse sentido, os metabólitos secundários com efeito alelopático, têm grande potencial para serem usados como bioherbicidas, bem como, podem servir de estruturas modelo na obtenção de semissintéticos, com a introdução de grupos químicos que estão presentes nas estruturas de herbicidas comerciais já estabelecidos. Dentre os diferentes compostos alelopáticos de baixa massa molecular, que são de fácil obtenção, por serem comercializados na forma pura, estão o timol, carvacrol, guaiacol e eugenol. Para análise do potencial de moléculas para uso como herbicidas são realizados diversos testes de toxicidade, tais como: análises fitotóxicas, que avaliam o desenvolvimento inicial de plântulas; citotóxicas, que avaliavam o ciclo celular e os cromossomos; e genotóxicas que analisam o DNA dos indivíduos expostos ao componente teste. Assim, esse trabalho objetivou avaliar o efeito, em baixa concentração (0; 0,375; 0,750; 1,50 e 3 mmol.L⁻¹), das moléculas naturais eugenol, guaiacol, timol e carvacrol e dos seus respectivos ácidos fenoxiacéticos semissintéticos através de bioensaios vegetais. Para tanto realizou-se testes de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*, avaliação de alterações no ciclo mitótico de células meristemáticas de raízes de *L. sativa*, além dos efeitos do carvacrol e do ácido carvacroxiacético (3mmol.L⁻¹) no DNA de *L. sativa* e *S. bicolor*. Observou-se redução nos parâmetros de fitotoxicidade e no índice mitótico nas maiores concentrações testadas, além de aumento nas alterações nucleares e cromossômicas, quando comparados ao controle negativo. Os resultados moleculares demonstraram que o carvacrol e o ácido carvacroxiacético são tão tóxicos quanto o herbicida 2,4-D. Indicando dessa forma, a fito, cito e genotoxicidade das moléculas para sementes de *S. bicolor* e *L. sativa*.

Palavras-chave: citotoxicidade, fitotoxicidade, genotoxicidade, *L. sativa*, *S. bicolor*

ABSTRACT

The use of agrochemicals brings many economic benefits for agriculture; however, their harmfulness to the environment and to human health are debated. The herbicides have stood out among the most applied agrochemicals in the field, having weed control as an objective. Nevertheless, there are several reports of plants resistant to certain herbicides, making it necessary for a constant pursuit of new herbicides and alternative control methods. In this sense, secondary metabolites with allelopathic effect, have great potential to be used as bioherbicides, as well as, they can serve as model structures in obtaining the semi-synthetics, with the introduction of chemical groups that are present in the already established structures of commercial herbicides. Among the different allelopathic compounds of low molecular mass, which are easy to obtain, since they are marketed in their pure form, are thymol, carvacrol, guaiacol and eugenol. For the analysis of the molecules potential, to use as herbicides, several toxicity tests are performed, analysis such as: phytotoxic, which evaluate the initial development of seedlings; cytotoxic, that evaluates the cell cycle and the chromosomes; and genotoxic tests that analyzes the DNA of the individuals exposed to the test component. Therefore, this study aimed to evaluate the effect, in low concentrations (0; 0,375; 0,750; 1,50 e 3 mmol.L⁻¹), of the natural molecules eugenol, guaiacol, thymol and carvacrol and their respective phenoxyacetic semi-synthetic acids through plant bioassay. For this, germination tests and initial development tests of *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor* seedlings were carried out, evaluations of the changes in the mitotic cycle of meristematic cells of *L. sativa* roots, as well as the effects of carvacrol and carvacroxyacetic acid (3mmol.L⁻¹) on the DNA of *L. sativa* and *S. bicolor*. A reduction in the phytotoxicity parameters and in the mitotic index at the highest concentrations tested was observed, as well as an increase in nuclear and chromosomal alterations when compared to the negative control. Molecular results have shown that carvacrol and carvacroxyacetic acid are as toxic as the 2,4-D herbicide. Thus indicating the phyto, cyto and genotoxicity of the molecules for *S. bicolor* and *L. sativa* seeds.

Keywords: cytotoxicity, phytotoxicity, genotoxicity, *L. sativa*, *S. bicolor*

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Produção Agrícola no Brasil e a Importância dos Agroquímicos

O setor agrícola é um dos pilares da economia brasileira, sendo um dos principais responsáveis pela balança comercial do país. A agricultura no Brasil já passou por várias transformações ao longo da história, do período colonial na produção de cana-de-açúcar até as atuais mudanças e expansão na produção de soja e café (Zuanazzi e Borges, 2010). A partir do século XX esse setor vem sendo transformado e modernizado, concomitantemente ao processo de industrialização e urbanização no país (Yang e Zhu, 2013).

Nas últimas duas décadas, a agricultura no Brasil tem consolidado e expandido territorialmente. Apesar da maior parte da produção agrícola ser para o abastecimento interno, o crescimento nesse setor deve-se, principalmente, ao aumento das exportações de alguns produtos do agronegócio, entre eles a soja, celulose e carnes (Castillo et al., 2016). Além disso, o país tem se destacado como o maior fornecedor mundial de açúcar, suco de laranja e de café (OECD-FAO, 2015).

Juntamente com os Estados Unidos e a União Europeia, o Brasil é reconhecido mundialmente como uma das grandes potências agrícolas. Contudo, a agricultura brasileira tem grande perspectiva de crescimento para os próximos anos, o que diferencia o país dos outros territórios (OECD, 2011). Os principais fatores associados à expansão agrícola no Brasil são: a maior mecanização no campo e o aumento das fronteiras das regiões produtoras, pela interiorização das lavouras no país (Vieira Filho, 2016). Além disso, o uso de fertilizantes e de agroquímicos (defensivos agrícolas, agrotóxicos ou pesticidas) tem contribuído de forma fundamental para o sucesso na produtividade no campo (Ferreira, 2015).

Tendo em vista que o Brasil é destaque internacional como um dos maiores produtores de alimentos, desde 2009 o país é considerado o maior consumidor de agroquímicos no mundo (INCA, 2015). Os agrotóxicos são usados, frequentemente, no período pré e pós-colheita nos mais diversos setores da agricultura. O consumo de defensivos agrícolas no Brasil é distribuído da seguinte maneira: os herbicidas representam 45% do total, os fungicidas em torno de 14%, os inseticidas correspondem a 12% e as demais categorias de agrotóxicos a 29% (ANVISA, 2012).

Os agrotóxicos são de grande importância na manutenção da produtividade agrícola no país. O controle de pragas agrícolas existe desde que a agricultura se

consolidou, onde as plantas daninhas eram controladas de forma manual ou pelo uso de ferramentas rudimentares, como foices e enxadas. A partir do século XX, substâncias químicas passaram a ser usadas para o manejo das espécies daninhas, o que desencadeou uma maior produtividade e facilidade no controle dessas pragas nas lavouras (Yang e Zhu, 2013).

Em 1900, os sais inorgânicos de cobre foram descobertos para o controle de espécies daninhas dicotiledôneas (folhas largas) por Bonnet (França), Shultz (Alemanha) e Bolley (EUA). Posteriormente, em 1908, o sulfato ferroso foi avaliado na cultura do trigo para o controle desse mesmo tipo de praga por Bolley, nos Estados Unidos (Barbosa, 2004).

A descoberta dos herbicidas foi um marco durante a Segunda Guerra Mundial, no período de 1939-1945, onde foi desenvolvido o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) por britânicos, que tinham por meta aumentar a produção agrícola durante a guerra e, posteriormente, foi também usado na Guerra do Vietnã (1954-1975), juntamente com o herbicida 2,4,5-T (ácido triclorofenoxiacético), para a produção do agente laranja (Peterson et al., 2016).

Após a descoberta do 2,4-D foram desenvolvidos os herbicidas 2,4-DB (ácido 4-(2,4-diclorofenóxi)butírico) e o 2,4,5-T. Na década de 50 foram obtidos novos herbicidas da classe das amidas, carbamatos e triazinas simétricas (Barbosa, 2004). As principais classes químicas de herbicidas e o ano de descobrimento foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Classes Químicas de Herbicidas e o Ano de Descobrimento

Classes Químicas	Ano de descobrimento
Ácidos fenoxiacéticos	1945
Carbamatos	1954
Triazinas	1956
Dimitroanilinas	1965
Difeniléteres	1970
Sufonilureias	1980

Posteriormente a descoberta desses importantes herbicidas, nas décadas de 60 e 70, houve o início da evolução da agricultura no Brasil e no mundo. Nessa época, nos EUA iniciou-se a chamada “Revolução Verde” que foi difundida nos países menos desenvolvidos, por meio da inovação e disseminação de novas práticas agrícolas que proporcionaram um grande aumento na produção agrícola em países como Índia, México

e no Brasil. Com o objetivo de otimizar o setor agrícola diminuindo mão de obra e aumentando a produtividade, houve um crescimento acentuado da produção. Para isso, foram introduzidas técnicas inovadoras de cultivo, utilização de sementes de alto rendimento, mecanização, fertilizantes e pesticidas (Alves e Tedesco, 2016).

A partir dessa revolução no modo de produzir alimentos no Brasil, o uso de agrotóxicos foi difundido no país, sendo os herbicidas o de maior consumo interno (ANVISA, 2012). Atualmente, os ingredientes ativos mais usados na classe dos herbicidas no Brasil são: glifosato (63%), 2,4-D (11%), atrazina (10%) e outros herbicidas (16%) (de Oliveira, Favareto e Antunes, 2013).

A premissa para a descoberta do 2,4-D baseou-se no estudo das auxinas (hormônios vegetais), onde observou-se que quando essas substâncias eram aplicadas em concentrações mais elevadas apresentavam toxicidade para as plantas. Dessa forma, compostos sintéticos semelhantes às auxinas poderiam apresentar esse mesmo efeito (Cremlyn, 1991).

1.2. Auxinas e origem dos herbicidas auxínicos

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA) foram os primeiros herbicidas auxínicos a serem usados na agricultura. Devido à seletividade apresentada por essa classe de herbicidas, o uso dessas substâncias inovou e revolucionou a agricultura no mundo, no tocante a forma de controle de plantas daninhas de folha larga. Com a utilização dessas substâncias, foi possível diminuir a mão de obra e aumentar a produtividade de cereais (Kudsk e Streibig, 2003; Barbosa, 2004; Delaney *et al.*, 2006; Silva e Silva, 2007).

As auxinas são os principais fitormônios dos vegetais e foram os primeiros dessa classe a serem descobertos. Essas substâncias são essenciais para o crescimento do vegetal e apresentam também outras atividades fisiológicas. A auxina age na parede da célula do vegetal proporcionando a distensão e, por consequência, o crescimento do vegetal. A auxina mais comum dos vegetais é o ácido indolilacético (AIA) (Taiz e Zeiger, 2013).

Além do AIA existem outros hormônios vegetais, tais como: ácidos naftaleno-1-acético (ANA), indol-propiónico e indol-butírico (Figura 1). No entanto, não são produzidos espontaneamente pelos vegetais, sendo denominadas auxinas sintéticas (Miranda *et al.*, 2004; Loss *et al.*, 2008).

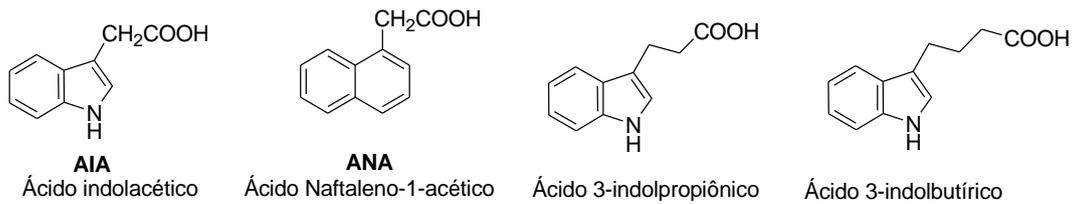


Figura 1. Estruturas da auxina natural (AIA) e de auxinas sintéticas.

O AIA é sintetizado nas pontas da raiz e caule (ápices das plantas) e flui na direção ápice-base. O AIA parece ser sensível à luz, por um processo ainda desconhecido, a luz determina uma distribuição desigual de auxinas. Elas fluem do lado iluminado ao sombreado, promovendo um maior crescimento desse último. As principais ações desse fitormônio são: crescimento, abscisão foliar e dominância apical (Taiz e Zeiger, 2013).

A palavra auxina foi denominada por Went, que vem do grego, *aux* significa crescer. As auxinas agem nas mais diversas partes dos vegetais. Na Tabela 2 estão descritas as ações dessas auxinas nas células e em outras partes das plantas (caule, raiz, folhas, frutos) (Taiz e Zeiger, 2013).

As auxinas são aplicadas artificialmente sobre superfícies cortadas de estacas para formação de raízes adventícias, assim as plantas reproduzidas por estacas têm o enraizamento com mais facilidade. Quando aplicadas em flores não fecundadas as auxinas proporcionam o desenvolvimento de frutos partenocárpicos e, em frutos, a aplicação de AIA não permite a formação da camada de excisão, possibilitando o alcance de uma maior produção (Taiz e Zeiger, 2013).

A descoberta dos herbicidas auxínicos resultou do trabalho de Kogl et al (1934) que demonstraram que o AIA promove o alongamento celular em plantas. AIA foi isolado, o que estimulou a busca de outros compostos de estrutura relacionada com atividade reguladora do crescimento, mas que, ao contrário de AIA, não eram rapidamente metabolizados em plantas. Verificou-se que o ácido 1-naftilacético era ativo, tal como o ácido 2-naftilacético. Isto despertou o interesse nos ácidos ariloxiacéticos como potenciais reguladores de crescimento de plantas.

Tabela 2. Modo de ação das auxinas nas células e em outras partes dos vegetais

Localização nas plantas	Ação das auxinas
Células	Aumento na plasticidade da parede celular, proporcionando a distensão celular. Exerce uma influência na multiplicação celular.
Caule	Pode tanto estimular, como impedir a distensão celular, depende da concentração do AIA.
Raiz	Dependendo da concentração, pode estimular ou impedir a distensão celular. Tem uma maior sensibilidade em relação ao AIA, do que o caule.
Gemas laterais	O AIA, quando é produzido nas gemas apicais, é transportado até às gemas laterais, causando sobre elas um fenômeno chamado de dominância apical, que tem uma ação entorpecente, que inibe o seu desenvolvimento.
Folhas	Há uma quantidade de AIA entre o caule e a folha, que regula a conservação da folha sobre o caule, bem como a sua queda. Quando a folha apresenta maior quantidade de auxina, em relação ao caule, ela é preservada sobre o caule. Se a folha apresentar menor quantidade de auxina, em relação ao caule, ocorre a excisão da folha. Quando isso acontece, se constitui sobre a base do pecíolo, uma camada de excisão que desuni a folha do caule.
Frutos	O AIA também controla a conservação do fruto sobre o caule, bem como a excisão do mesmo. A formação do fruto acontece sobre influência da fecundação e da polinização. No interior da semente há a presença de AIA, que são produzidos pelos embriões. Durante a fecundação, o ovário recebe estes hormônios, ocasionando o crescimento do mesmo, e conseqüentemente a formação do fruto. A polinização é essencial para o desenvolvimento do fruto, quando este processo não ocorre o ovário não cai, e não há a formação de frutos. Para comprovar este acontecimento, foram introduzidas auxinas em flores não fecundadas, e posteriormente houve o desenvolvimento de frutos partenocárpicos, ou seja, que não possuem sementes.
Câmbio	A ação das células do câmbio é estimulada através do AIA.

Em 1942 Zimmerman e Hitchcock mostraram que certos ácidos fenoxiacéticos clorados, tais como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), eram mais ativos do que o hormônio natural AIA e, além disso, não eram rapidamente degradados na planta. Conseqüentemente, 2,4-D foi aplicado externamente às plantas e, assim, não foi regulado internamente como o AIA, produzindo um crescimento marcadamente anormal resultando na morte da planta (Cremlyn, 1991).

A descoberta foi um marco inicial na indústria de herbicidas orgânicos, uma vez que o 2,4-D foi mais ativo contra ervas daninhas (dicotiledôneas) do que contra cereais e

gramíneas (monocotiledôneas). Dessa forma, era seletivo e passou a ser pulverizado em gramíneas (como trigo, milho, arroz e outras culturas de cereais) para eliminar ervas daninhas de folhas largas (Kudsk e Streibig, 2003; Barbosa, 2004; Delaney et al., 2006; Silva e Silva, 2007; Taiz e Zeiger, 2013).

A seletividade dos herbicidas auxínicos pode ser, em parte, pelo fato de aderirem muito melhor na superfície das daninhas de folhas largas do que as folhas estreitas e ainda, porque as duas classes de plantas transportam produtos químicos de forma diferente através de suas folhas. As ervas daninhas de folhas largas têm seu ponto crescente nas pontas das folhas. As gramíneas, por sua vez, crescem a partir de sua base (Taiz e Zeiger, 2013).

No período da descoberta, o 2,4-D e o MCPA foram produzidos pelo Processo Dow. Para a síntese do 2,4-D o material de partida usado foi o fenol e para o MCPA foi o o-cresol. O esquema para a síntese do herbicida 2,4-D está apresentado na Figura 2. Na primeira etapa foi realizada a cloração do fenol, levando à obtenção do 2,4-diclorofenol e, posteriormente foi adicionado o grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$, levando a obtenção do 2,4-D (Cremlyn, 1991).

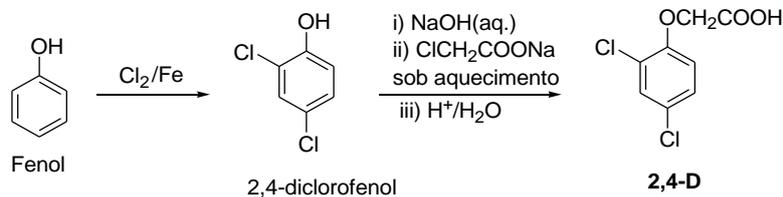


Figura 2. Etapas de síntese do herbicida 2,4-D.

Esses herbicidas reguladores de crescimento proporcionam mudanças no metabolismo de ácidos nucléicos e afetam seriamente os aspectos metabólicos da plasticidade da parede celular. A ação da enzima RNA-polimerase é alterada, tendo por consequência, alterações na síntese de ácidos nucléicos e de proteínas. Dessa forma, ocorre indução de intensa proliferação celular em tecidos, causa epinastia de folhas e caule, além de interrupção do floema, impedindo o movimento dos fotoassimilados das folhas para o sistema radicular. A diminuição do potencial osmótico das células, provocado pelo acúmulo de proteínas e, também, mais especificamente, pelo efeito desses produtos sobre o afrouxamento das paredes celulares pode levar ao alongamento celular. A perda da rigidez das paredes celulares é provocada pelo incremento na síntese da enzima celulase. Após aplicações dos herbicidas auxínicos, em espécies sensíveis,

observa-se rapidamente aumentos significativos da enzima celulase, especialmente da carboximetilcelulase (CMC), notadamente nas raízes. Esses efeitos proporcionam epinastia das folhas, retorcimento do caule, engrossamento das gemas terminais, destruição do sistema radicular e morte da planta, em poucos dias ou semanas (CASTRO, 1979).

As auxinas sintéticas são classificadas em quatro grupos químicos mostrados na Tabela 3: fenoxialcanoatos (2,4-D, 2,4-DB, MCPA e MCPB), benzoato (dicamba), piridinacarboxilatos (clopyralid, fluroxipyr, picloran e triclopyr) e quinolino carboxilatos (quinclorac e quinmerac) (Ferreira, Silva e Ferreira, 2005).

Diversas espécies de plantas daninhas dicotiledôneas que são de difícil controle usando outros herbicidas apresentam suscetibilidade ao 2,4D. Porém, o uso desse herbicida é restrito devido à falta de seletividade em algumas culturas. Em bactérias encontradas no solo foram descobertos genes que estão relacionados à tolerância ao 2,4-D e a transferência desses para certas culturas desencadearam o desenvolvimento de culturas resistentes a esse herbicida auxínico (Queiroz e Vidal, 2014).

O gene plasmidial *tfdA*, que codifica a enzima 2,4D oxoglutarato dioxigenase, encontrado na bactéria *Cupriavidus necator* foi o primeiro gene de tolerância ao 2,4-D descrito em literatura. No final da década de 1980, iniciaram-se os estudos de transgenia com este gene, utilizando a *Nicotiana tabacum* como planta modelo. Posteriormente a tolerância ao 2,4-D foi obtida em plantas transformadas de *Gossypium hirsutum*, *Brassica juncea* e *Vitis vinifera*. Novos estudos em bactérias do solo foram conduzidos e dois novos genes foram identificados: o gene *rdpA* de *Sphingobium herbicidi vorans* MH, que codifica a enzima ariloxialcanoato dioxigenase-1 (AAD-1); e o *sdpA* de *Delftia acidovorans* MC1, que codifica a enzima ariloxialcanoato dioxigenase-1(AAD-12). Estas duas enzimas degradam o 2,4-D e outros herbicidas. Atualmente, os genes que codificam essas enzimas estão sendo utilizados para o desenvolvimento de cultivares de soja, algodão e milho tolerantes ao 2,4-D e FOPs. A utilização de plantas cultivadas contendo genes de tolerância ao 2,4-D possibilita uma perspectiva de mudança no emprego deste herbicida. Entretanto, em algumas espécies, apenas o uso do 2,4-D pode não ser suficiente para controlar o crescimento de todos os indivíduos, necessitando da associação do 2,4-D com outro herbicida que apresente um diferente mecanismo de ação para a manutenção da eficiência do manejo de daninhas (Queiroz e Vidal, 2014).

Tabela 3. Grupos químicos e estruturas das auxinas sintéticas usadas como herbicidas

Grupos Químicos das Sintéticas	Estruturas Químicas
Fenoxialcanotos	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COc1ccc(Cl)c(Cl)c1</chem> 2,4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético </div> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COCCOC1=CC=C(Cl)C=C1</chem> 2,4-DB Ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COc1ccc(Cl)cc1C</chem> MCPA Ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético </div> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COCCOC1=CC=C(Cl)C=C1C</chem> MCPB Ácido 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butírico </div> </div>
Benzoato	<div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)c1cc(Cl)c(OC)c(Cl)c1</chem> Dicamba </div>
Piridinacarboxilatos	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)c1cc(Cl)nc(Cl)c1</chem> Clorpyralid </div> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)c1c(Cl)c(N)c(Cl)n1</chem> Picloram </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COc1cc(Cl)c(Cl)c(Cl)n1</chem> Triclopyr </div> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)COc1c(F)c(N)c(Cl)n1</chem> Fluroxypyr </div> </div>
Quinolinocarboxilatos	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)c1ccc2nc(Cl)ccc2c1</chem> Quinclorac </div> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C(O)c1ccc2nc(Cl)ccc2c1</chem> Queinmerac </div> </div>

1.3. Problemas relacionados ao uso de herbicidas

Desde a descoberta do 2,4-D, os herbicidas passaram a ser usados frequentemente e repetitivamente, devido ao controle eficaz de plantas invasoras e por serem essenciais para garantir um menor custo de produção e aumento da produtividade agrícola. Contudo,

o uso inadequado e indiscriminado dessas substâncias tem provocado uma crescente incidência de resistência das plantas daninhas aos herbicidas convencionais. A cada ano novas espécies adquirem resistência a um ou mais herbicidas, sendo esse fato considerado um grave problema para os produtores (HRAC-BR, 2016).

A resistência das plantas daninhas aos herbicidas, além de ter por consequência a inviabilização de importantes herbicidas, pode acarretar grandes prejuízos aos agricultores, pela diminuição do rendimento da colheita e obtenção de produtos com qualidade inferior ao exigido pelo mercado consumidor (HRAC-BR, 2016).

O uso intensivo de herbicidas impõe uma pressão de seleção nas plantas. Assim como no processo evolutivo, os biótipos, no caso das plantas daninhas, que apresentam diferenciação genética em termos de resistência, se desenvolvem normalmente na presença dessas substâncias (Leal, Silva, Karam, 2012).

A identificação da resistência das plantas daninhas aos herbicidas ocorre quando os vegetais sobrevivem após a aplicação de uma dose de herbicida que seria letal para controlar as espécies de uma população. Existem dois tipos de resistências das plantas aos herbicidas, a que ocorre por pressão de seleção, de forma natural ou pela indução da resistência por processos de biotecnologia (HRAC-BR, 2016).

No final da década de 50 foram relatados os primeiros casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, biótipos de *Commelina difusa* nos EUA e, posteriormente de *Daucus carota* no Canadá se apresentaram resistentes a herbicidas auxínicos (Vargas e Roman, 2006). Em 1964, no Estado do Kansas (EUA) foi observado que a espécie *Convolvulus arvensis* (planta trepadeira e perene, de folha larga) se mostrou resistente ao herbicida 2,4-D. A partir de 1970 casos de resistências de plantas daninhas aos herbicidas da classe das triazinas foram relatados. Nesse mesmo ano, no Estado de Washington (EUA), a espécie *Senecio vulgaris* se apresentou resistente a triazinas e a partir da década de 80 novos casos de resistência a triazinas foram relatados nos EUA e no mundo (HRAC-BR, 2016).

Em 2015 já existiam 478 casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas no mundo, sendo relatadas 252 espécies (147 dicotiledôneas e 105 monocotiledôneas). As plantas daninhas desenvolveram resistência a 23 dos 26 mecanismos de ação conhecidos de herbicidas e a 161 herbicidas diferentes. Foram notificadas plantas daninhas resistentes em 91 culturas distribuídas em 67 países. No gráfico apresentado na Figura 3 pode-se observar a evolução de casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas no mundo (Weed Science, 2017).

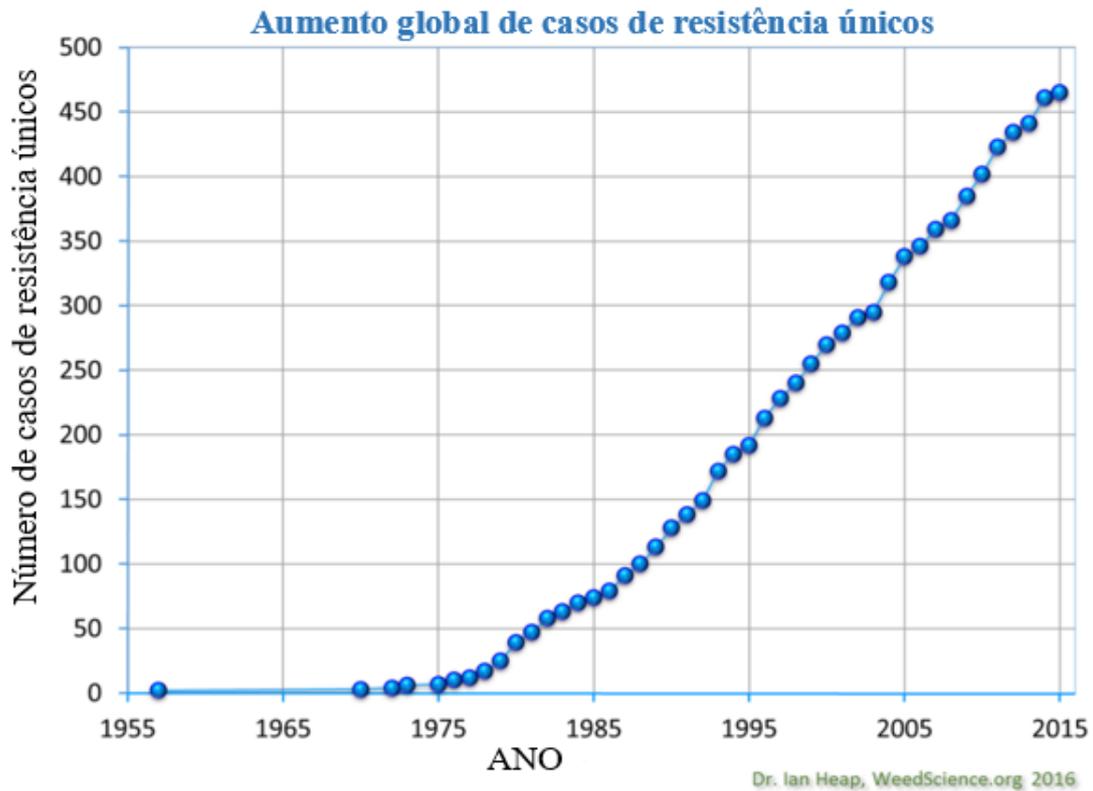


Figura 3. Aumento global de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Fonte: Weed Science, 2016.

A utilização dos herbicidas ao longo dos anos tem acarretado não só problemas de resistência por parte das plantas daninhas, mas também problemas relacionados à contaminação e danos ao meio ambiente. A utilização intensiva dos herbicidas e dos agrotóxicos em geral pode levar à contaminação de águas (superficiais e subterrâneas), solos, flora e da fauna, desencadeando desequilíbrios ecológicos e biológicos. Além de impedir a proliferação de pragas agrícolas, os agrotóxicos eliminam também outros animais e plantas benéficos ao meio ambiente, diminuindo assim a biodiversidade do local e aumentando a instabilidade de ecossistemas (Silva et al., 2012).

Além dos danos causados ao meio ambiente, o uso de agrotóxicos de forma inadequada e repetitiva pode acarretar a contaminação de alimentos e também dos homens. Por meio do contato direto ou indireto, os agrotóxicos podem causar intoxicações ao homem, podendo ocorrer o desenvolvimento de doenças neurológicas, hepáticas, respiratórias, renais, cânceres, etc. Ainda associado à toxicidade aos agroquímicos relatam-se: infertilidade, impotência, abortos, teratogênese (malformações fetais), desregulação hormonal, mutagênese e efeitos sobre o sistema imunológico

(Londres, 2011; INCA, 2015).

Uma das alternativas para diminuir o uso de agrotóxicos está na busca de produtos naturais que possam vir a substituir ou minimizar as doses de produtos de alta periculosidade nas lavouras. Apesar de 70% de todos os princípios ativos de agrotóxicos terem suas origens na pesquisa de produtos naturais, apenas 7% de compostos naturais são aprovados pela US EPA (Environmental Protection Agency) como bioherbicidas. Dessa forma, existe uma necessidade crescente de descoberta de novos herbicidas que apresentem novos mecanismos de ação (Dayan e Duke, 2014).

1.4. Novos herbicidas a partir de compostos naturais

O uso de herbicidas sintéticos e convencionais tem desencadeado problemas relacionados à resistência das plantas daninhas, contaminação ambiental e riscos à saúde do homem e de animais. Logo, há uma urgente e crescente necessidade em se encontrar métodos alternativos para o controle de pragas agrícolas (Souza Filho et al., 2006).

Nesse sentido, metabólitos secundários podem ser usados diretamente ou indiretamente como modelo na obtenção de novos herbicidas. Os metabólitos secundários são compostos produzidos pelos vegetais que não são considerados essenciais para sua sobrevivência, mas que têm papéis de grande importância na defesa da planta ao ataque de herbívoros, pragas e na competição com outras espécies, sendo produzidos, variavelmente, de acordo com as interações da planta com o meio ambiente (Simões et al., 2010).

Os compostos alelopáticos (aleloquímicos) são exemplos de metabólitos secundários liberados por determinadas plantas que interferem na germinação e no desenvolvimento de outras espécies no ambiente (Weir, Park e Vivanco, 2004). Desse modo, os aleloquímicos podem ser considerados fitotoxinas, as quais têm grande potencial para serem usadas como bioherbicidas, além de servirem como estruturas modelo na obtenção de semissintéticos, com a introdução de grupos químicos que estão presentes nas estruturas de herbicidas comerciais já estabelecidos (Dias e Dias, 2007).

Existem relatos de vários efeitos de toxicidade apresentados pelas substâncias alelopáticas, tais como: inibição completa da germinação de sementes, injúria no sistema radicular, interferência no crescimento da planta tornando-o paralisado, atraso ou clorose, murcha e morte das plantas (Teixeira et al., 2004). Esses efeitos são característicos de herbicidas e, por isso, os metabólitos secundários são atrativos na busca por bioherbicidas. Além disso, essas substâncias podem atuar em diferentes ou novos sítios de ação em

relação aos herbicidas convencionais (Duke et al., 2000).

A busca de herbicidas com novos sítios de ação é de suma importância, uma vez que existem atualmente herbicidas comerciais com 20 tipos de mecanismos de ação (MA), sendo o mais recente introduzido há quase 30 anos. Dos 20 MA conhecidos, apenas dois vieram de produtos naturais, os inibidores da glutamina sintetase (GS) e da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) (Duke e Dayan, 2015).

O glufosinato, também conhecido como fosfinotricina, é um herbicida sistêmico de amplo espectro de ocorrência natural produzido por várias espécies de *Streptomyces* (bactérias do solo). O bialafos, outro herbicida natural, também pode ser metabolizado pelas plantas ao glufosinato. Esse composto inibe irreversivelmente a GS, uma enzima necessária para a produção de glutamina e para a destoxificação da amônia, conferindo-lhe propriedades antibacterianas, antifúngicas e herbicidas. A aplicação de glufosinato nas plantas leva à redução da glutamina e a níveis elevados de amônia nos tecidos, interrompendo a fotossíntese, e resultando na morte da planta. O glufosinato e bialafos são os únicos herbicidas comercializados com este MA. A versão sintetizada do composto é uma mistura racêmica de L- e D-fosfinotricina, da qual apenas a forma L é ativa (Duke e Dayan, 2015).

Os grupos químicos de herbicidas inibidores de HPPD são: as tricetonas, os isoxazóis e as pirazoles, os nomes comerciais dos princípios ativos dessa classe de herbicidas existentes no mercado são: clomazona, mesotriona, opramezona, pirasulfotola, sulcotriona, tefuriltriona e tembotriona. Óleos naturais ricos em triquetonas inibidoras de HPPD têm atividade herbicida, causando branqueamento de plantas emergentes, pela inibição da biossíntese de clorofilas e de carotenoides (Lei et al., 2015).

Existem outros herbicidas que podem ter sido originados de compostos naturais, como por exemplo: a cinmetilina que é um herbicida análogo ao eucalitol (1,8-cineol) e ao 1,4-cineol, que são monoterpenos naturais. A cinmentilina foi obtida pela introdução de um grupo lateral benzil-éter que pela diminuição da volatilidade quando comparado com o composto 1,8-cineol torna-se mais adequado a ser usado como herbicida (Figura 4). Um relatório recente sugere que o alvo da cinmetilina é a tirosina aminotransferase, entretanto, o mecanismo de ação dessa substância ainda não foi totalmente elucidado (Duke e Dayan, 2015).

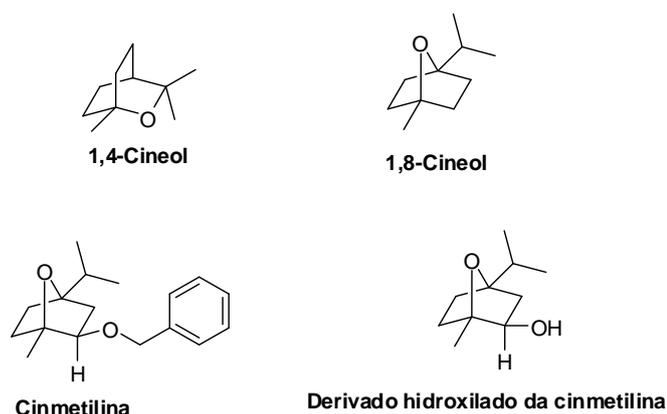


Figura 4. Estruturas químicas da cinmetilina e dos monoterpens 1,4-cineol, 1,8-cineol e derivado.

A partir do exemplo da Cinmetilina, pode-se vislumbrar em se utilizar compostos naturais que apresentem potencial atividade herbicida na obtenção de novas moléculas por meio do preparo de compostos semissintéticos, que podem apresentar atividade biológica e propriedades superiores ao composto de origem.

Dessa forma, existem compostos fenólicos naturais que apresentam potencial atividade herbicida e esses compostos podem servir como materiais de partida para a obtenção de compostos análogos ao 2,4-D, sendo esse herbicida sintetizado a partir de um composto fenólico.

Os fenóis são exemplos de uma classe de compostos que apresenta grande potencial fitotóxico. Essas substâncias estão presentes na natureza. Existem diversos compostos fenólicos de baixa massa molecular, que são constituintes voláteis de plantas e são de fácil obtenção, por serem comercializados na forma pura, como por exemplo o timol, carvacrol, guaiacol e eugenol (Figura 5).

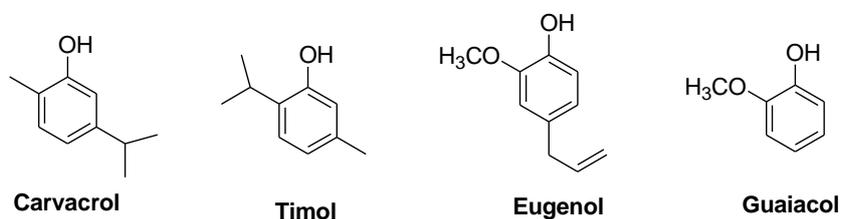


Figura 5. Estruturas de compostos fenólicos de baixa massa molecular de origem natural.

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) e carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) são isômeros constitucionais e são encontrados em óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), de orégano (*Origanum vulgare*) (Dal Pozzo et al., 2011), hortelã pimenta (*Plectractus amboinicus*) e de outras plantas (Pinheiro et al., 2015). Esses compostos

apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e fitotóxica. O guaiacol (2-metoxifenol) é um fenol de origem natural, que pode também estar presente na composição de óleos essenciais (Pelissari et al., 2010) e apresenta atividade antisséptica. O eugenol é o composto majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, está presente também em canela, sassafrás e mirra. As atividades alelopáticas do eugenol e seus decorrentes, se caracterizam pela inibição da germinação de sementes de várias plantas, assim como na diminuição do crescimento de algumas delas (Miranda et al., 2015).

Kordali et al. (2008) descreveram sobre a atividade fitotóxica do óleo essencial de *Origanum acutidens* constituído por: carvacrol (87,0%), p-cimeno (2,0%), acetato de linalol (1,7%), borneol (1,6%) e β -cariofileno (1,3%). Esse óleo essencial, o carvacrol e o timol inibiram completamente a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* e *Rumex crispus*, bem como teve efeito fitotóxico sobre essas plantas. Contudo, o p-cimeno não apresentou qualquer efeito fitotóxico. Os resultados desse estudo sugeriram que a propriedade herbicida do óleo poderia ser atribuídas ao seu principal componente, o carvacrol.

Recentemente, o potencial fitotóxico do eugenol foi averigado sobre quatro espécies gramíneas (*Echinochloa crus-galli*, *Phalaris minor*, *Sorghum halepense* *Leptochloa chinensis*) e quatro ervas daninhas (*Ageratum conyzoides*, *Commelina benghalensi*, *Cassia occidentalis* e *Bidens pilosa*). O efeito do eugenol (50-1000 μ M) no crescimento e desenvolvimento de plântulas após 7 dias de tratamento foi estudado em termos de porcentagem de germinação, comprimento da raiz e da parte aérea, teor de clorofila total e respiração celular. O Eugenol a 1.000 μ M causou diminuição de 55-70 e 42-90% na porcentagem de germinação em gramíneas e ervas daninhas, respectivamente. Da mesma forma, o comprimento da raiz diminuiu em 55-90 e 57-71%, enquanto o comprimento da parte aérea foi diminuído em 50-83 e 36-73% em gramíneas e ervas daninhas, respectivamente, em resposta a eugenol de 1000 μ M. A redução observada no crescimento da planta foi acompanhada por uma diminuição no teor total de clorofila (37-53%) e respiração celular (36-57%) nas plantas usadas no teste. No entanto, o efeito inibitório foi mais forte para gramíneas do que para as ervas daninhas (Ahuja et al., 2015).

Tendo em vista que os fenóis naturais supracitados apresentam grande potencial fitotóxico e que os herbicidas comerciais da classe dos ácidos fenoxiacéticos, como o 2,4-D e o MCPA, são obtidos a partir de compostos fenólicos, vislumbrou-se nesse trabalho obter análogos a esses herbicidas usando como material de partida os compostos

disponíveis comercialmente na forma pura: carvacrol, eugenol, timol e guaiacol para realização dos ensaios de toxicidade usando dois modelos de plantas: *Lactuca sativa* L. (alface) e *Sorghum bicolor* L. Moench (sorgo), a fim de averiguar se a adição do grupo ácido aos fenóis naturais poderia acarretar um aumento de suas atividades como herbicidas.

1.5. Bioensaios Vegetais

A toxicologia é a ciência que estuda a ação de compostos tóxicos em organismos vivos. Ela avalia a incidência, ocorrência, natureza, mecanismo e os fatores de risco que os agentes químicos podem causar nos organismos vivos (Zakrzewski, 1994; James et al, 2000; Hodgson, 2004). A toxicidade exhibe o potencial que um composto apresenta em promover danos a um organismo. Esse potencial varia de acordo com a concentração e as propriedades do agente mutagênico, bem como, com o tempo de exposição do organismo teste ao mesmo (Rand, 2000).

Vários testes são utilizados para realização de avaliação de riscos de toxicidade ambiental e para prospectar os efeitos de agentes tóxicos e mutagênicos presentes no ambiente. Os estudos iniciais de toxicologia, focavam principalmente nos efeitos desses resíduos em animais. Entretanto, os vegetais superiores têm se mostrado sensíveis a agentes tóxicos presentes no ambiente, se fazendo assim, um importante grupo de organismos à serem utilizados como organismos teste para avaliação de riscos toxicológicos de poluentes para organismos vivos. Esses organismos também são receptores biológicos diretos de agroquímicos utilizados para o controle de plantas daninhas nas culturas, favorecendo seu uso em bioensaios. Além disso, o estudo com vegetais permite a análise simultânea de diferentes mecanismos de ação do agente mutagênico, sendo as plantas superiores reconhecidas por serem excelentes indicadoras da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos (Grant, 1994; Fernandes et al., 2009; Leme e Marin-Morales, 2009; Aras et al., 2012; Lyubenova et al., 2012; Pereira et al., 2013). Por todas essas vantagens, várias agências ambientais têm indicado e validado a utilização de plantas superiores como organismo modelo em bioensaios, dentre essas agências está a United Nations Environmental Program (UNEP), World Health Organization (WHO) e US Environmental Protection Agency (USEPA) (Fernandes et al., 2007).

Os efeitos provocados por substâncias tóxicas, são analisadas em testes de fitotoxicidade e citotoxicidade, sendo os primeiros relacionados à germinação e ao

crescimento radicular e aéreo de sementes cultivadas em contato com agentes tóxicos (Benassi, 2004). Devido ao fato das raízes sofrerem o primeiro contato com poluentes ambientais presentes no solo, elas são as primeiras a demonstrarem os efeitos da substância teste, esse órgão do vegetal pode desenvolver mecanismos fisiológicos eficientes para evitar o estresse ambiental como medida de defesa (Sandálio et al., 2001).

Os efeitos provocados pelos mutagênicos ambientais não depende apenas de fatores como o tempo de exposição, o tipo e a dose do mutagênico e as interações desses fatores com outros fatores ambientais, mas também de fatores intrínsecos ao organismo exposto ao agente, como fatores genéticos e estágio de desenvolvimento da planta (Gichner et al., 2000).

Dessa maneira, esses ensaios necessitam ser conduzidos em condições controladas, para isso são desenvolvidos em laboratórios. Nos testes de toxicidade, os organismos modelos são expostos a diferentes concentrações da substância-teste e os efeitos tóxicos provocados são observados e quantificados, com o objetivo de averiguar a ação de agentes físicos, químicos e biológicos a diferentes organismos, avaliando o potencial de risco à saúde humana e ao ambiente, possibilitando melhor controle e qualidade dos ecossistemas (Dornfeld, 1997; Ribo, 1997; Arraes e Longhin, 2012).

Os testes de fitotoxicidade são simples, confiáveis, rápidos e baratos (Valerio et al., 2007), além de serem efetivos na averiguação de toxicidade de substâncias inorgânicas e orgânicas. A variável mais integrativa analisada nesse teste é o crescimento radicular, pois a redução desse parâmetro pode resultar de vários mecanismos isolados ou em conjunto, como inibição da absorção de nutrientes, inibição do alongamento celular, morte celular e inibição da divisão celular (Freitas et al., 2016).

Devido a essa resposta associativa entre os parâmetros, é importante uma análise prospectiva integrada. Dessa maneira, os testes de citotoxicidade quando realizados conjuntamente aos testes de fitotoxicidade, possibilitam ampla exploração e elucidação dos resultados observados, além da determinação do modo de ação da substância (Andrade et al., 2010; Young et al., 2012; Aragão et al., 2015).

A citotoxicidade também é usada para avaliar injurias provocadas por agentes tóxicos, em diferentes concentrações e tempo de exposição, permitindo a avaliação dos cromossomos, quanto aos seus tamanhos, formas, número, além do comportamento,

durante o ciclo mitótico e meiótico por meio de análises microscópicas (Thiriot-Quévieux, 2002; Fernandes et al., 2007). Nesse tipo de estudo é possível avaliar as alterações no ciclo celular, a partir da observação de anormalidades nas fases de divisão celular, nos cromossomos ou no núcleo das células (Andrade et al., 2010; Klacknick, 2011; Kumari et al., 2011).

O teste de alterações no ciclo celular, também conhecido como teste de aberrações cromossômicas, permite estimar o potencial genotóxico e avaliar a citotoxicidade das substâncias testes, revelando as consequências do efeito mutagênico dos compostos químicos que os organismos estão expostos. Além de elucidar os mecanismos de ação que resultam nas alterações no ciclo celular, esse mecanismo de ação pode ser aneugênico e/ou clastogênico (Leme et al., 2008).

O mecanismo de ação clastogênico pode provocar alterações na estrutura cromossômica gerando a perda das características normais de condensação ou alterar a sequência de DNA do indivíduo, sendo ambas passíveis de determinar a morte celular (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Andrade et al., 2008; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016). A ação aneugênica promove injúrias no fuso mitótico, sendo nociva às células, afetando a segregação simétrica dos cromossomos/cromátides na divisão celular, podendo resultar na segregação cromossômica anormal, determinando no desequilíbrio genômico das células filhas (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Andrade et al., 2008; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016).

Esses mecanismos de ação podem ser avaliados a partir das alterações cromossômicas observadas. De modo que, alterações cromossômicas como poliploidização, C-metáfase, cromossomos perdidos e anáfase multipolar podem estar relacionadas com problemas na polimerização e despolimerização das fibras do fuso mitótico, sendo dessa forma caracterizadas como alterações indicadoras de ação aneugênica. Esse tipo de dano pode acarretar em uma segregação assimétrica, conduzindo à anormalidades quando as células filhas são formadas (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015).

Outra alteração analisada são os micronúcleos, que são considerados como indicadores de citotoxicidade, eles podem surgir espontaneamente na célula, porém, sua indução é utilizada para identificar danos genéticos oriundos da exposição à uma substância tóxica. Desse modo, a presença de micronúcleos, tem sido interpretada como indicadora de ação clastogênica e aneugênica (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015).

A aderência cromossômica é um indicador da influência tóxica no material genético, sendo provavelmente irreversível. Essa alteração é um tipo de anormalidade nas proteínas histônicas da cromatina e não o próprio DNA, sendo irreversível e considerada um indicativo de ação aneugênica e/ou clastogênica, geralmente determina a morte celular (Fernandes et al., 2009; Freitas et al., 2016). A aderência cromossômica pode desencadear outras alterações como pontes e micronúcleos, já que os cromossomos tendem a permanecer juntos e, quando separados, sofrem rupturas cromossômicas (Fernandes et al., 2009; Bernardes et al., 2015; Freitas et al., 2016).

A ação clastogênica também pode ser indicada pela presença de fragmentos cromossômicos, decorrentes de quebras nos cromossomos, tal alteração pode favorecer a formação de pontes cromossômicas, devido à ausência da região telomérica (Fernandes et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Freitas et al., 2016).

Outra área de pesquisa, que se iniciou com o desenvolvimento de marcadores moleculares, é a análise da genotoxicidade das substâncias. Esse estudo se baseia na *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR) para avaliação dos fragmentos de DNA amplificados, por meio de alterações no padrão de eletroforese, já que mudanças no DNA afetam a ligação do *primer* ao DNA. Detectando assim, o potencial do componente teste em causar mutações, danos e distorções na estrutura do DNA. Apresentando-se como uma metodologia eficiente para avaliação de agentes genotóxicos (Atienzar et al., 2002; Atienzar, Jha, 2006; Noel, Rath, 2006).

Para a realização dos testes de toxicidade é importante que o modelo vegetal teste apresente ciclo de vida curto. Dentre os organismos teste vegetal, a alface (*Lactuca sativa*), uma eudicotiledônea, é recomendada para testes de toxicologia ambiental (Silveira et al., 2017). Esta espécie é bastante pesquisada inclusive em programas de melhoramento e são conhecidos seus sistemas hormonais e químicos, suas características moleculares e fisiológicas, e, suas respostas ambientais e nutritivas, além disso é a hortícola mais produzida no mundo (Iso, 1995; Ferreira, 2007; Monteiro et al., 2009; Fao, 2011; Pereira et al., 2013).

Várias pesquisas que comparam espécies vegetais, dentre elas a *L. sativa*, em teste de toxicidade, incluindo citotoxicidade, fitotoxicidade e genotoxicidade, concluíram que esta espécie é um modelo muito sensível, tornando-a eficaz neste tipo de estudo (Pinheiro et al., 2015; Silveira et al., 2017).

A alface é uma espécie diploide ($2n=2x=18$) que além das vantagens acima citadas, ainda possui cromossomos relativamente grandes, favorecendo as análises

microscópicas; é barata e facilmente encontrada em casas rurais; possui muitas sementes, sendo essas pequenas, o que facilita pesquisas em laboratório, por ocupar pouco espaço e se desenvolver rápido (Andrade et al. 2010; Andrade-Viera et al. 2014; Aragão et al. 2015; Pinheiro et al., 2015, Silveira et al., 2017).

Outra espécie vegetal modelo em teste de toxicidade é a *Sorghum bicolor* (sorgo). Trata-se de uma monocotiledônea, autógama, que apresenta crescimento rápido, sendo utilizada em pastagens para alimentação animal (Araucária Sementes, 2010).

2. Referências

- Ahuja, N., Batish, D. R., Singh, H. P., & Kohli, R. K., 2015. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. *Journal of pest science*, 88(1), 209-218.
- Alves, C. T., Tedesco, J. C., 2016. A revolução verde e a modernização agrícola na mesorregião noroeste do Rio Grande do Sul-1960/1970. *Revista Teoria e Evidência Econômica*, 21.45.
- Andrade, L. F., Campos, J. M. S., & Davide, L. C., 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(3), 706-710.
- Andrade, L. F., Davide, L. C., & Gedraite, L. S., 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25, 626-631.
- Andrade-Vieira, L. F.; Botelho, C.M.; Palmieri, M.J.; Laviola, B.G; Praça-Fontes, M.M., 2014. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)*, 86, 373-382.
- ANVISA. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Brasília: ANVISA.2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>. Acesso em: 11 out. 2015.
- Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F., 2015. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, 35(2), 259-272.
- Aras, S., Aydin, S.S., Körpe, D.A., Dönmez, C., 2012. Comparative Genotoxicity Analysis of Heavy Metal Contamination in Higher Plants. In: Dr. Ghousia Begum (Ed.), *Ecotoxicology*, ISBN: 978-953-51-0027-0, InTech, DOI: 10.5772/30073.
- Arraes, A. I. O. M.; Longhin, S. R., 2012. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. *Enciclopédia Biosfera*, v.8, n.14, 1958-1972.
- Araucária Sementes, 2010. Disponível em: <http://www.sementesaraucaria.com.br/sorgo_forrageiro.php>. (Acesso em 20/01/2017).
- Barbosa, L.C.A. 2004. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa, MG: Editora UFV, 215 p.
- Benassi, J. C., 2004. O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Bernardes, P. M., Andrade-Vieira, L. F., Aragão, F. B., Ferreira, A., & da Silva Ferreira, M. F., 2015. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(7), 207.
- Castillo, R., Elias, D., Peixinho, D., Bühler, E. A., Pequeno, R., Frederico, S., 2016. Regiões do agronegócio, novas relações campo-cidade e reestruturação urbana. *Revista da ANPEGE*, 12(18), 265-288.
- Castro, P. R. C., 1979. Mecanismo de ação auxínica. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 36: 621-634.
- Cremllyn, R. J., 1991. *Agrochemicals: preparation and mode of action*. Wiley, 2ed. 406p.
- Dal Pozzo, M., Viégas, J., Santurio, D. F., Rossatto, L., Soares, I. H., Alves, S. H., Costa, M. M. D., 2011. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, 11, 54-56.
- Dayan, F. E.; Duke, S. O., 2014. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant physiology*, 166.3: 1090-1105.
- Delaney, J., Clarke, E., Hughes, D., & Rice, M., 2006. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery?. *Drug discovery today*, 11(17), 839-845.
- de Oliveira, T. G., Favareto, A. P. A., Antunes, P. A., 2013. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 9(11).
- Dias, L.; Dias, A., 2007. Metabólitos Secundários Como Fontes de Bioherbicidas: Situação Actual e Perspectivas. *Revista de Ciências Agrárias*, p.510-517.
- Dornfeld, C. B., 2002. Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Romagnì, J. G.; Rimando, A. M., 2000. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. *Weed Research*, v. 40, p. 99-111.
- Duke, S. O., & Dayan, F. E., 2015. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. In *Am Chem Soc Symp Ser* (Vol. 1204, pp. 79-92).
- FAO, 2011. Food and Agriculture commodities production. Visitado em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> Visitado a: 17 de Janeiro de 2017.
- Fernandes, T. C., Mazzeo, D. E. C., & Marin-Morales, M. A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252-259.
- Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C., & Marin-Morales, M. A. (2009). Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(6), 1680-1686.
- Freitas, A. S., Cunha, I. M. F., Andrade-Vieira, L. F., & Techio, V. H. (2016). Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 124, 426-434.
- Ferreira, F. A.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R., 2005. Mecanismos de ação de herbicidas. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO*. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf
- Ferreira, M. L. P. C. A., 2015. Pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. *Revista de Direito Sanitário*, 15.3: 18-45.
- Ferreira, A. L. N., 2007. Exposição de Crômio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade. Dissertação de Mestrado Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. 68 pp.

- Fiskesjö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102, n. 1, p. 99-112.
- Gichner, T., Menke, M., Stavreva, D. A., & Schubert, I., 2000. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans. *Mutagenesis*, 15(5), 385-389.
- Grant, W. F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), 175-185.
- Grant, W.F., 1982. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: Fleck, R.A.; Hollaender, A. (Ed.). *Genetic toxicology: an agricultural perspective*. New York: Plenum Press, p. 353-378.
- Hodgson, E., 2004. In: *A Textbook of Modern Toxicology*; Hodgson, E. (Ed). 3^a ed., John Wiley & Sons: New Jersey, cap. 1.
- HRAC-BR - Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas. Christoffoleti, P. J., Nicolai, M., 2016. 4^a Edição - Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2016/09/LIVROHRAC4Ed.pdf>. Acesso em 09 de fevereiro de 2017.
- INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Acercados Agrotóxicos. 2015 Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acessado em: 26 de Jan. de 2017.
- ISO (International Organization for Standardization), 1995. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence of higher plants. Genève, ISO 11269.
- James, R. C.; Roberts, S. M.; Williams, P. L., 2000. In: *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*; Williams, P. L.; James, R. C.; Roberts, S. M., eds.; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, cap. 1.
- Klancnik, K.; Drobne, D.; Valant, J.; Dolenc Koce, J., 2011. Use of modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 85-92.
- Kögl, F., & Kostermans, D. G. F. R., 1934. Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. 13. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 228(3-6), 113-121.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., Mete, E., 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788-8795.
- Kudsk, P., & Streibig, J. C., 2003. Herbicides—a two-edged sword. *Weed Research*, 43(2), 90-102.
- Kumari, M.; Khan, S. S.; Pakrashi, S.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N., 2011. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 613-621.
- Leal, U. A. S., Silva, G. N., Karam, D., 2012. Otimização Dinâmica Multiobjetivo da Aplicação de Herbicida Considerando a Resistência de Plantas Daninhas. *Biomatemática*, v.22, p.1-16.
- Lei, K., Hua, X. W., Tao, Y. Y., Liu, Y., Liu, N., Ma, Y., ... & Kong, C. H., 2016. Discovery of (2-benzoylphenyl-1-yl)-containing 1, 2-benzothiazine derivatives as novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibiting-based herbicide lead compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(2), 92-103.
- Leme, D. M.; Angelis, D. F.; Marin-Morales, M. A., 2008. Action mechanisms of

- petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, v.88, n. 4, p. 214–219.
- Leme, D.M.; Marin-Morales, M., 2009. A *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 1, 71-81.
- Londres, F., 2011. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190.
- Loss, A., Teixeira, M. B., de Assunção, G. M., Haim, P. G., de Loureiro, D. C., & de Souza, J. R., 2008. Enraizamento de estacas de *Allamanda cathartica* L. tratadas com ácido indolbutírico (AIB). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária) Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, 3(4), 313-316.
- Lyubenova, M., Dineva, S., Georgieva, N., Miteva, T., Karadjova, I., Parvanova, P., 2012. Ecotoxicological assessment modelo f cultural plant-soil complex treated with waste water. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26 (2): 2883-2893.
- Marchi, G.; Marchi, E. C. S.; Guimarães, T. G., 2008. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. Embrapa Cerrados.
- Matsumoto, T. S.; Mantovani, M. S.; Malagutti, M. I. A.; Dias, A. L.; Fonseca, I. C.; Marin-Morales, M. A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root- tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n.1, p. 148-158.
- Miranda, C. S. D., Chalfun, N. N. J., Hoffmann, A., Dutra, L. F., & Coelho, G. V. D. A., 2004. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estacas lenhosas dos porta-enxertos de pessegueiro'Okinawa'e umezeiro.
- Miranda, C. A. S. F.; Cardoso, M. G.; Carvalho, M. L. M.; Machado, S. M. F.; Gomes, M. S.; Santiago, J. A.; Teixeira, M. L., 2015. Atividade Alelopática de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais na Germinação e Vigor de Aquênios de Alface. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.3, p.1783-1798.
- Monteiro, M. S.; Lopes, T.; Mann, R. M.; Paiva, C.; Soares, A. M. V. M.; Santos, C., 2009. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental*, v.672, n.2, p.90-94.
- OECD. 2011. Agricultural policies in OECD countries and emerging economies Paris: OECD Publishing.
- OECD-FAO - Agricultural Outlook 2015-2024. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.
- Pelissari, G. P., Pietro, R. C. L. R., Moreira, R. R. D., 2010. Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC, Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.1, p.70-74.
- Pereira, M.P., Pereira, F.J., Rodrigues, L.C.A., Barbosa, S., de Castro, E.M., 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@mbiente On-line* 1 (7): 36-43.
- Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., & Stahlman, P. W., 2016. 2, 4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30(2), 303-345.
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. D. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... & Fontes, M. M. P., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(41), 8981-8990.
- Queiroz, A. R. S. D., & Vidal, R. A., 2014. O desenvolvimento de culturas tolerantes ao herbicida diclorofenoxiacetato: revisão de literatura. *Planta daninha. Viçosa, MG*. Vol. 32, n. 3, p. 649-654.
- Rand, G. M., 2000. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and

- risk assessment. 2^aed., Washington: Taylor & Francis.
- Ribo, J. M., 1997. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environmental toxicology and water quality*, 12(4), 283-294.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., Del Rio, L. A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*, 52(364), 2115-2126.
- Silva, A. D., & Silva, J. D., 2007. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 189-248.
- Silva, L. O. C.; Silva, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Lima, C. F.; Rocha, P. R. R.; D'Antonino, L., 2012. Ação de *Eleusine Coracana* na Remediação de Solos Contaminados com Picloram. *Planta Daninha*, v.30, n.3, p.627-632.
- Silveira, G. L., Lima, M. G. F., dos Reis, G. B., Palmieri, M. J., & Andrade-Vieria, L. F. (2017). Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*, 178, 359-367.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., 2010. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ DaUniversidade Federal de Santa Catarina, 1102 p.
- Sbano, A.; Ferreira, J.V.R.; Peckle, B.A.; Macrae, A.; Direito, I.C.N., 2013. Otimização de Método Cromatográfico para Quantificação do Herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Acta Scientia & Technicae*, v.1, n.2, p.37-46.
- Souza Filho, A. P. S.; Santos, R. A.; Santos, L. S.; Guilhon, G. M. P.; Santos, A.S; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A.C., 2006. Potencial Alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*,v.24, n.4, p.649-656.
- Teixeira, C. M., Araújo, J. B. S., & Carvalho, G. J. D., 2004. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). *Ciênc. agrotec*, v.28, n.3.
- Thiriot-Quiévreux, C., 2002. Review of the literature on bivalves cytogenetics in the last ten years. *Cahiers de Biologie Marine*, v. 43, p. 17-26.
- Valerio, M. E., Garcia, J. F., Peinado, F. M., 2007. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Science Total Environment*, v.378, p.63-66.
- Vargas, L., Roman, E. S., 2006. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. Embrapa Trigo.
- Vieira Filho, J. E. R., 2016. Expansão da fronteira agrícola no Brasil: Desafios e perspectivas (No. 2223). Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA).
- Weed Science. International Survey of Herbicide Resistant Weeds, 2017. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2017.
- Weir, T. L.; Park, S. W.; Vivanco, J. M., 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472-479.
- Yang, D. T.; Zhu, X., 2013. Modernization of agriculture and long-term growth. *J. Monet. Econ.* 60, 3, 367-382.
- Young, B. J., Riera, N. I., Beily, M. E., Bres, P. A., Crespo, D. C., & Ronco, A. E., 2012. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 182-186.
- Zakrzewski, S. F., 1994. Principles of Environmental Toxicology, American Chemical Society: Washington.
- Zimmerman, P. W., & Hitchcock, A. E., 1942. Flowering habit and correlation of organs

modified by triiodobenzoic acid. *Contrib. Boyce Thompson Inst*, 12, 491-6.
Zuanazzi, J. A. S., Borges, P. E. M., 2010. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química nova*. São Paulo. v. 33, n. 6, p.1421-1428.

CAPÍTULO 1 –TOXICIDADE DO TIMOL, CARVACROL E SEUS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM *Lactuca sativa* E *Sorghum bicolor*

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional tem provocado o aumento da demanda por alimentos. Este fator foi determinante para a modernização da agricultura no século XX, através do emprego de máquinas agrícolas, uso de fertilizantes e de defensivos químicos. Essas inovações foram primordiais para o sucesso na produtividade agrícola ao longo dos anos (Vieira Filho et al., 2009; Yang & Zhu, 2013).

Após a segunda guerra mundial, quando foi descoberto o herbicida auxínico 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), os defensivos agrícolas começaram a ser aplicados em diferentes setores da agricultura. Devido aos ganhos na produção agrícola, como aumento da produtividade e diminuição dos custos de produção, a utilização de herbicidas passou a ter um grande destaque no cenário agrário mundial, principalmente no controle de plantas daninhas. Assim, no ano de 2015, eles representavam aproximadamente 50% de todo agroquímico aplicado no Brasil (Tavella et al., 2012; Fagundes et al., 2015).

Entretanto, pesquisas relacionadas à toxicologia dos agrotóxicos, têm demonstrado seus efeitos danosos em humanos e ao ambiente. Eles podem causar modificações no DNA, acarretando em cânceres e/ou teratogênese (Boccolini et al., 2013). Além disso, o uso de herbicidas em determinadas espécies, mostra-se menos eficiente uma vez que sua aplicação com o tempo vem selecionando variedades resistentes, podendo acarretar na inviabilização de determinados herbicidas (Ribeiro, 2011; Fagundes et al., 2015).

Visando minimizar os danos ambientais e os impactos negativos à saúde humana, uma alternativa ao uso dos herbicidas sintéticos é a aplicação de compostos naturais com atividades biológicas. São descritos na literatura vários produtos naturais que apresentam potencial para serem utilizados no controle de plantas daninhas, como timol e o carvacrol (Ultee et al., 1999; Gill e Holley, 2006; Zhou et al., 2007; Azirak e Karaman, 2008; Kordali et al., 2008; Undeger et al., 2009; Ait-Ouazzou et al., 2013; Pinheiro et al., 2015).

Uma outra alternativa é a obtenção e o emprego de compostos semissintéticos, derivados de compostos naturais com elevada atividade biológica. Para que tais objetivos sejam alcançados, os bioherbicidas e seus derivados devem ser eficientes e acessíveis (Souza Filho et al., 2006).

Diante do potencial para uso no controle de plantas daninhas das moléculas timol e carvacrol, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do carvacrol, do timol e dos seus

respectivos ácidos fenoxiacéticos semissintéticos (Figura 1), no desenvolvimento inicial de sementes e no DNA de *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*, além de avaliar a atuação destes compostos no ciclo mitótico de células meristemáticas de raízes de *L. sativa*.

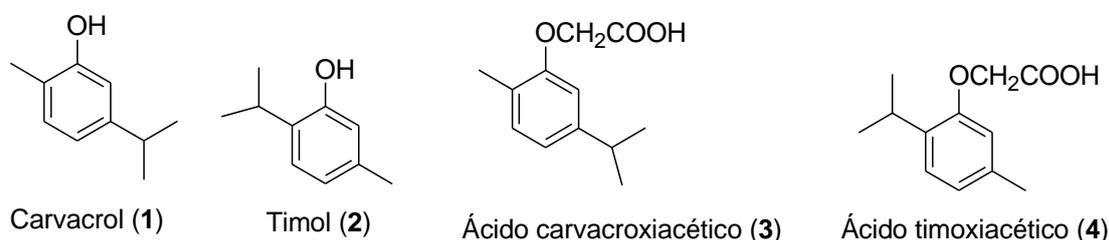


Figura 1. Estrutura química dos fenóis naturais carvacrol (1) e timol (2), e, de seus derivados semissintéticos ácido carvacroxiacético (3) e ácido timoxiacético (4).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes comerciais de *L. sativa* L. var. Mônica e marca Feltrin e sementes de *S. bicolor* L. Moench da marca BR seeds, adquiridas em casa rural.

2.2 Procedimentos Experimentais Gerais

Os ácidos fenoxiacéticos foram sintetizados no Laboratório de Química (LQ04) do CCENS da UFES (Alegre-ES). Os fenóis usados nos testes biológicos (timol e carvacrol) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, assim como a acetona (P.A.) usada nas reações e o éter dietílico (P.A.) usado na purificação dos compostos sintetizados. A água purificada por osmose reversa foi usada nas reações e nas soluções usadas nos experimentos.

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H foram realizadas no Laboratório LabPetro da UFES (Vitória-ES) no espectrômetro da marca Varian, modelo VNMRS 400, operando com um campo magnético de 9,4 T, utilizando uma sonda 5 mm BroadBand1H/19F/X realizadas à temperatura de 25 °C. O solvente usado nas análises foi o CDCl₃.

2.3 Obtenção de ácidos fenoxiacéticos a partir de fenóis naturais

Os ácidos timoxiacético (Figura 1-4) e ácido carvacroxiacético (Figura 1-3) foram preparados seguindo a mesma metodologia. Como exemplo, para o preparo do ácido timoxiacético, inicialmente, preparou-se uma solução de cloroacetato de sódio (8,37 mmol; 0,783 g), dissolvendo o ácido 2-cloroacético (8,37 mmol; 0,791 g) em água

destilada (8 mL) e acetona (2 mL), e seguidamente resfriou-se a solução em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) sob agitação, até o pH ser ajustado em 9-10. Em seguida, usando um balão bitubulado de fundo redondo acoplado a um condensador, preparou-se uma mistura de NaOH (7,37 mmol; 0,295 g), água destilada (40 mL) acetona (10 mL) e timol (6,70 mmol; 1,005 g). A referida mistura foi agitada por vinte minutos sob aquecimento a 100 °C. Após os vinte minutos de aquecimento, o cloroacetato de sódio preparado previamente foi adicionado gota a gota à mistura. A solução reagente foi mantida sob aquecimento e deixada sob refluxo por 24 h. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o valor de pH da mistura foi acidificado para 1-2 com ácido clorídrico diluído (HCl), sob banho de gelo, demonstrado na figura 2 (Yan et al., 2014 com adaptações).

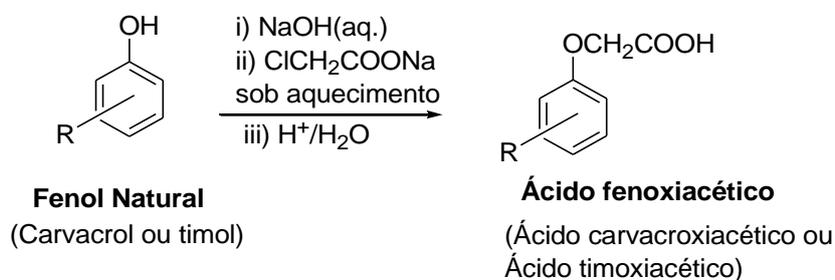


Figura 2. Reações usadas na obtenção de ácidos fenoxiacéticos a partir de fenóis naturais.

Após essa etapa, o material obtido foi purificado por extração líquido-líquido com solventes quimicamente ativos. O material foi dissolvido em 30 mL de éter etílico, em seguida, colocado em um béquer de 250 mL, resfriado em banho de gelo e então, adicionou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) até pH alcalino. Essa mistura foi transferida para um funil de separação, onde foram separadas as fases orgânica e aquosa. Foi realizada nova extração, usando 30 mL de éter dietílico e, novamente, foi coletada a fase aquosa. A fase orgânica foi devidamente descartada e as fases aquosas foram agrupadas em um erlenmeyer, que foi colocado sob banho de gelo e, em seguida acidificada com ácido clorídrico concentrado (HCl) até pH~1-2. O material obtido foi novamente levado para um funil de separação onde foi lavado com 2 x 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado.

Ácido timoxiacético (**3**) (líquido marrom). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 1,21 (d, 6H, J=8,5 Hz, 2xCH₃); 2,30 (s, 3H, CH₃); 3,34 (sept, 1H, J=8,5 Hz, CH);

4,64 (s, 2H, CH₂-COOH); 6,56 (s, 1H, Ar-H), 6,81 (1H, J=9,5 Hz, Ar-H), 7,13 (d, 1H, J=9,5 Hz, Ar-H).

Ácido carvacroxiaacético (**4**) (cristal marrom). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 1,20 (d, 6H, J=8,5 Hz, 2xCH₃); 2,20 (s, 3H, CH₃); 2,82 (sept, 1H, J=8,5 Hz, CH); 4,53 (s, 2H, CH₂-COOH); 6,59 (s, 1H, Ar-H); 6,79 (1H, J=9,5 Hz, Ar-H); 7,04 (1H, J=9,5 Hz, Ar-H).

2.4 Teste de Fitotoxicidade

Sementes de *L. sativa* e de *S. bicolor* foram utilizadas como modelos vegetais de eudicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. A germinação e avaliações foram realizadas de acordo com Pinheiro et al. (2015), sendo as soluções testes carvacrol (**1**), timol (**2**), ácido carvacroxiaacético (**3**) e ácido timoxiaacético (**4**), aplicadas em quatro concentrações (3mmol.L⁻¹; 1,5mmol.L⁻¹; 0,75mmol.L⁻¹; 0,375mmol.L⁻¹). Como controle negativo utilizou-se o solvente utilizado no preparo das soluções foi: água + acetona 2% + Tween 0,05% e, como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial glifosato.

2.5 Teste de Citotoxicidade

Para coleta, fixação e análise das raízes seguiu-se o protocolo descrito por Aragão et al. (2015). Foram avaliadas as variáveis índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC), alterações nucleares (AN) e a frequência de cada AC, sendo elas: c-metáfase (Figura 3.a), ponte (Figura 3.e e Figura 3.g), aderência, poliploidização (Figura 3.a), quebrado (Figura 3.g) e perdido (Figura 3.f), de acordo com Aragão et al. (2015).

2.6 Teste de Genotoxicidade

Utilizando-se o DIC (delineamento inteiramente casualizado) montou-se um experimento composto de 5 tratamentos (carvacrol 3mmol.L⁻¹; ácido carvacroxiaacético 3mmol.L⁻¹; 2,4-D 3mmol.L⁻¹; água destilada e solvente), com 5 repetições. Para tratamento e obtenção das raízes seguiu-se o protocolo proposto por Bernardes et al. (2015)

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações. O tampão de extração foi previamente preparado, contendo para cada amostra: 0,28mL de NaCl 5mol/L; 0,1mL de Tris-HCl pH 8,0 1mol/L; 0,03mL de EDTA pH 8,0 500mmol/L; 10mg de PVP; 0,4mL de CTAB 5%; 2μL de β-mercaptoetanol e 0,588mL de água ultra-pura.

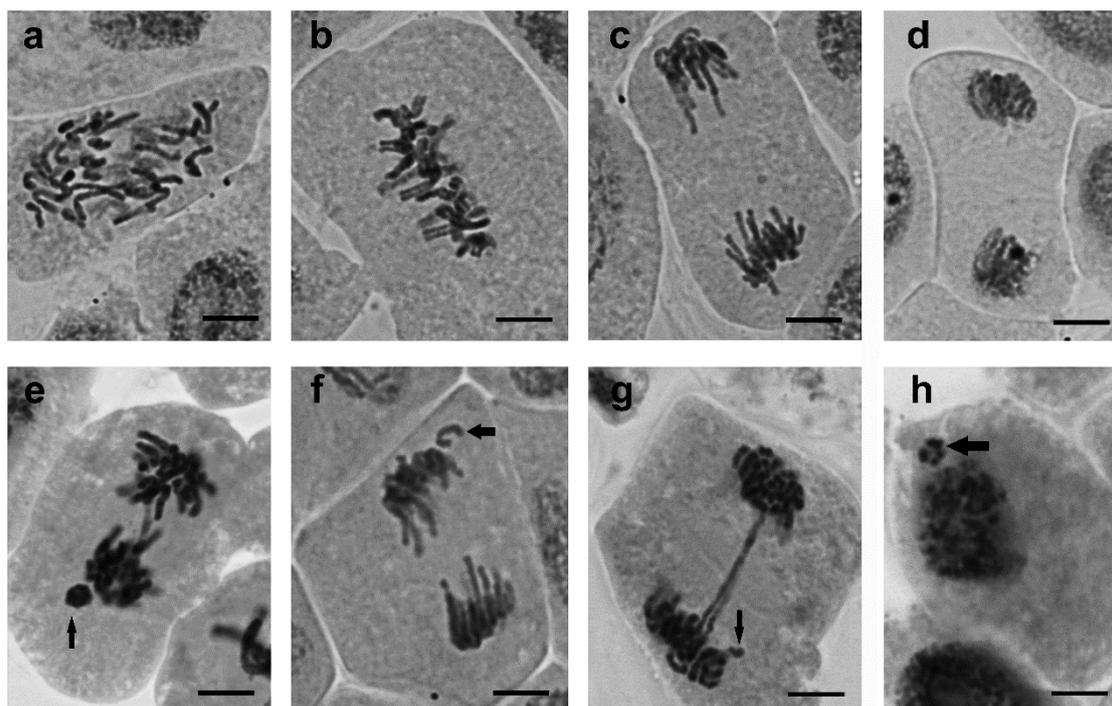


Figura 3. Células meristemáticas de *Lactuca sativa* tratada com carvacrol, timol, ácido carvacrol, ácido timol, dicamba, solvente e glifosato. (a) C-metáfase poliploide, (b) metáfase normal, (c) anáfase normal, (d) telófase normal, (e) ponte e micronúcleo (seta), (f) cromossomo perdido (seta), (g) ponte e fragmento (seta), (h) interfase com micronúcleo (seta).

Imediatamente após a maceração, adicionou-se 700 μ L de tampão nos microtubos iniciando-se o protocolo de extração. Seguidamente, as amostras foram colocadas por alguns segundos no vortex e em seguida em banho-maria a 65°C por 30 min, realizando a homogeneização das amostras a cada 10 min. Após esta etapa de aquecimento, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionou-se 650 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (CIA). Homogeneizou-se novamente as amostras e centrifugou-as a 9,6xG por 9 min. A fase aquosa foi transferida para um outro microtubo de 2mL, adicionando 200 μ L de tampão de extração juntamente com 650 μ L CIA. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 9,6xG por 9 min novamente. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo microtubo, adicionando-se 650 μ L CIA e centrifugando a 9,6xG por 9 min, repetiu-se essa última etapa mais uma vez. Para precipitar o DNA, coletou-se 600 μ L da fase aquosa, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol gelado e 230 μ L de acetato de amônio gelado. Centrifugou-se a 9,6xG por 9 min. Lavou-se o precipitado 3 vezes com 250 μ L de etanol 70%. Após a lavagem, os microtubos foram colocados abertos e virados para baixo em um papel filtro até secarem.

Para ressuspensão do DNA, adicionou-se 40 µL de TE + 40 µg/mL de RNase e acondicionou os microtubos em banho-maria 37°C por 30 min. Ao findar o período de ressuspensão, os DNAs foram armazenados a 4°C. A quantificação das concentrações dos DNAs obtidos foi efetuada no aparelho Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific).

Após quantificação e análise da qualidade do DNA, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 25ng/µL, o restante do material foi acondicionado a -20°C. As PCR foram realizadas utilizando 7 *primers* ISSR (807,808, 809, 810, 814, 834 e 836) previamente selecionados da “*UBC primer set 100/9*” (*University of British Columbia*). Estes *primers* foram empregados para se avaliar os danos induzidos pelas moléculas teste no DNA das plantas modelo.

As PCR foram feitas com um volume final de 20µL, contendo para cada amostra: 2µL de tampão 10X; 1µL de MgCl 50mM; 2µL de dNTP 10mM; 0,2µL de Taq 5U/µL; 6,8µL de água ultra-pura; 2µL de primer 2µM; 1µL de BSA e 5µL de DNA. As reações de amplificação dos *primers*ISSR foram feitas em termociclador BIO-RAD, seguindo as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C – 45 segundos, 52°C – 45 Segundos e 72°C – 1 min e 30 Segundos e; extensão final 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV, utilizando o fotodocumentador (Bio-Rad®, Molecular Imager® Gel Doc™ XR System)

Os efeitos provocados pela exposição às moléculas teste foram avaliados pela presença e/ou ausência de bandas nos géis, em comparação com os controles negativos, seguindo a codificação 1 para a presença de banda e 0 para a ausência de banda. Esses dados foram utilizados para calcular o parâmetro, referente a estabilidade genômica, *Genomic template stability % (GTS)*:

$$\text{GTS (\%)} = 1 - (a/n) \times 100$$

Onde: a - representa o número médio de bandas polimórficas encontradas em cada amostra exposta a molécula teste; n - representa o número total de bandas no controle.

O cálculo deste parâmetro foi realizado para cada molécula testada e para cada *primer*. Baseando nesses dados para cada *primer* por tratamento, posteriormente, calculou-se a média geral de todos os *primers* para cada molécula teste, de modo que cada *primer* foi calculado como repetição para a análise estatística.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos com as análises de fitotoxicidade e citotoxicidade foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Dunnett à 5% de significância. Esse teste foi escolhido por ser o mais indicado para comparar tratamentos com controles (Bernardes et al., 2015).

Os resultados dos polimorfismos encontrados com o teste de genotoxicidade foram submetidos à AMOVA e ao teste de similaridade de coincidência simples, sendo os agrupamentos efetuados por projeção 2D. Enquanto os dados obtidos a partir da avaliação de GTS, foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de Dunnett ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GENES (Cruz, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos ácidos fenoxiacéticos

Os ácidos fenoxiácidos (3) e (4) foram obtidos com rendimentos de 59 e 60%, respectivamente. A síntese de ácidos fenoxiacéticos já é bem estabelecida na literatura, desde a obtenção do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) que foi o primeiro herbicida dessa classe a ficar conhecido, relatada durante a Segunda Guerra Mundial (Cremlyn, 1991). Contudo, dados relacionados à síntese dessa classe de compostos usando como material de partida fenóis naturais são escassos.

Os compostos obtidos (3) e (4) foram caracterizados por RMN de ^1H , de acordo com os sinais apresentados nos espectros foi possível confirmar a formação dessas substâncias.

3.2 Fitotoxicidade

Nos ensaios macroscópicos foram avaliados a porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular (CR), crescimento aéreo (CA) e índice de vigor (IV). As sementes, das duas plantas modelo, tratadas com carvacrol (1) e ácido carvacroxiacético (3) sofreram inibição gradual, de acordo com o aumento das concentrações de aplicação em todas as características avaliadas (Tabelas 1 e 2, Figura 4). É interessante ressaltar que o carvacrol (1) na concentração de 3 mmol.L^{-1} , foi mais eficaz na inibição de parâmetros relacionados a germinação do sorgo do que os herbicidas comerciais testados (Tabela 1 e Figura 3), evidenciando seu potencial bioherbicida. Os resultados encontrados por Pinheiro et al. (2015), corroboram com os atuais, entretanto as concentrações testes foram diferentes.

Tabela 1 – Fitotoxicidade de diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis Carvacrol e Timol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, frente o desenvolvimento inicial de *Sorgo bicolor*.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	%Ger	CR	CA	IVG
Carvacrol (1)	3	58,40c	1,74b	5,15a	3,22c
	1,5	95,20ab	7,32a	4,28c	6,95ab
	0,75	98,40ab	8,76a	7,61a	7,35ab
	0,375	93,60ab	8,18a	6,59a	6,96ab
Ácido Carvacrox iacético (3)	3	94,40ab	3,81c	3,96c	6,87ab
	1,5	99,20ab	4,73c	5,18a	7,57ab
	0,75	96,80ab	6,28c	4,47c	7,08ab
	0,375	92,80ab	7,39a	6,32a	7,57ab
Timol (2)	3	88,00b	3,62b	7,40a	5,86ab
	1,5	93,60ab	7,06a	6,68a	7,39ab
	0,75	92,00ab	7,68a	5,43a	7,29ab
	0,375	95,20ab	8,02a	3,90b	7,66ab
Ácido Timoxiacé tico (4)	3	96,00ab	9,16a	5,24a	6,84ab
	1,5	92,80ab	8,22a	5,22a	7,09ab
	0,75	92,00ab	8,86a	3,81b	6,60ab
	0,375	91,20ab	8,58a	5,42a	6,58ab
2,4-D	3	90,40ab	1,11c	0,48b	6,26ab
	1,5	95,20ab	0,98c	0,37b	6,55ab
	0,75	96,80ab	1,08c	1,36b	6,51ab
	0,375	96,00ab	1,52b	1,86b	6,50ab
Dicamba	3	97,60ab	0,99c	0,00b	6,57ab
	1,5	85,60c	0,93c	0,35b	6,04c
	0,75	88,80b	1,18b	0,74b	6,71ab
	0,375	91,20ab	1,43b	1,22b	6,92ab
Solvente	-	97,60a	8,68a	7,04a	7,21a
Glifosato	-	96,00b	1,77b	0,92b	7,25b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %Ger representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Tabela 2 –Fitotoxicidade de diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis Carvacrol e Timol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	%Ger	CR	CA	IVG
Carvacrol (1)	3	16,80c	0,37c	0,00c	0,93c
	1,5	64,00b	4,47ab	1,99b	4,71b
	0,75	86,40ab	8,87a	9,30a	6,05ab
	0,375	92,00ab	9,91c	11,80a	7,68ab
Ácido Carvacrox iacético (3)	3	1,60c	0,01c	0,00c	0,07c
	1,5	4,80c	0,02c	0,00c	0,24c
	0,75	20,80c	0,11c	0,00c	0,97c
	0,375	51,20c	0,64c	1,34b	2,23c
Timol (2)	3	22,40c	0,46c	0,00c	1,11c
	1,5	79,20ab	5,77ab	0,34b	5,42b
	0,75	94,40a	8,08a	1,03b	7,35ab
	0,375	84,00ab	7,78a	4,08b	7,41ab
Ácido Timoxiacé tico (4)	3	80,00ab	5,52ab	2,58b	4,98b
	1,5	84,00ab	6,53a	4,65b	5,38b
	0,75	93,60a	10,29c	3,78b	6,30ab
	0,375	84,00ab	8,23a	4,16b	5,87ab
2,4-D	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	0,75	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	0,375	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
Dicamba	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	8,00c	0,03c	0,00c	0,40c
	0,75	39,20c	0,74c	0,10c	2,25c
	0,375	71,20b	0,75c	0,30c	5,13b
Solvente	-	90,40a	6,78a	10,94a	8,04a
Glifosato	-	77,60b	3,42b	3,53b	5,37b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %Ger representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

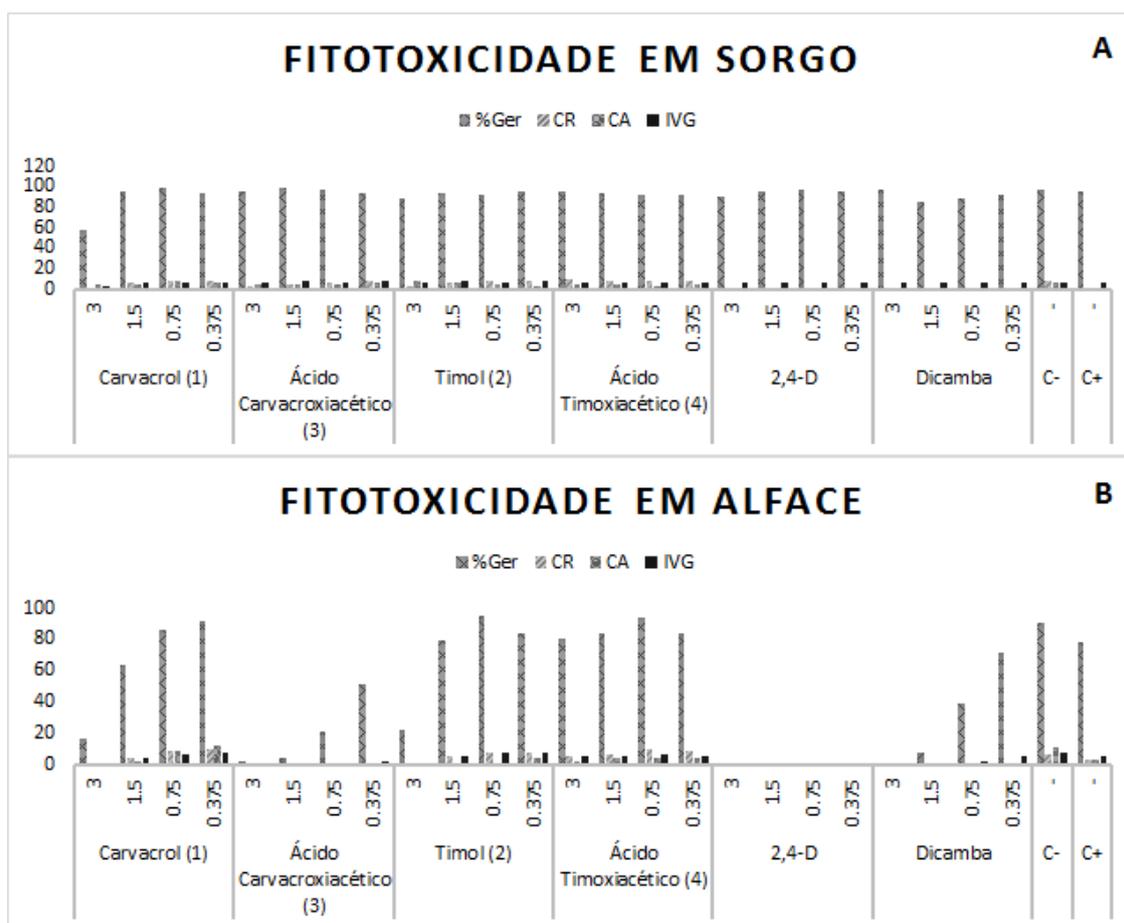


Figura 4. Fitotoxicidade das moléculas carvacrol (1), timol (2), ácido carvacroxiacético (3), ácido timoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em sementes e plântulas: (A) *Sorghum bicolor* e (B) *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L^{-1} , avaliadas das moléculas.

Ait-Ouazzou et al. (2013), avaliaram os efeitos do carvacrol nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e $200\mu\text{L.L}^{-1}$, concluindo seu efeito tóxico, a partir da concentração de $25\mu\text{L.L}^{-1}$, para células de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Nesse estudo, os autores também concluíram que doses subletais do carvacrol causam danos nas membranas celulares. Quando as células foram submetidas ao choque térmico antes do tratamento com carvacrol, os prejuízos celulares foram menores. Além disso, os autores observaram, a partir de um ensaio de requisitos biossintéticos, que as células danificadas pelo carvacrol necessitavam de energia, lipídios e proteínas para reparar os danos, promovendo a sua sobrevivência. Tal efeito na membrana pode ter ocorrido nas células vegetais, sendo responsável pela inibição do desenvolvimento das plântulas. Porém, os resultados demonstram que o carvacrol pode ser mais tóxico para algumas células vegetais em comparação com a toxicidade provocada por este composto em bactérias, já que a maior concentração teste utilizada neste estudo foi de 3mmol.L^{-1} , ou seja, muito inferior

à aplicada nas bactérias, e mesmo assim foram observados os efeitos tóxicos.

Gill e Holley (2006), observaram que o carvacrol na concentração de 5 ou 10mmol.L⁻¹ provocaram a inibição da enzima adenosina trifosfatase (ATPase), sendo esta enzima responsável por catalisar a quebra da molécula adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) mais fosfato inorgânico. O ATP é conhecido como a moeda energética da célula, pois a reação catalisada pela ATPase libera energia para a célula (Taiz e Zeiger, 2013). Tal efeito pode explicar os resultados encontrados no presente trabalho, onde foi observado inibição dos parâmetros relacionados à germinação, pois a produção de ATP a partir da respiração celular e a realocação de biomassa são de extrema importância para o desenvolvimento das plantas, já que todos os processos anabólicos dos seres vivos envolvem o gasto de ATP.

De acordo com Ultee et al. (1999), o carvacrol tem preferência pela fase hidrofóbica, exercendo efeito na integridade e no potencial da membrana citoplásmica, afetando conseqüentemente o gradiente iônico. Diminuindo dessa maneira, a produção de ATP pela ATPsintase, podendo acarretar a morte celular. O processo de fosforilação oxidativa, ou seja, a síntese de ATP via ATPsintase, requer a integridade das membranas citoplasmáticas e mitocondriais, em procariotos e eucariotos, respectivamente, uma vez que ele depende da força próton- motora gerada pela ejeção de prótons durante o transporte de elétrons.

O timol (**2**) e seu derivado semissintético (**4**) se mostraram fitotóxicos em diferentes concentrações, devido à inibição da germinação e do crescimento de sementes de monocotiledônea e dicotiledônea (Tabelas 1 e 2, Figura 4). Zunino e Zygadlo (2004), relataram que o timol também inibiu o crescimento de uma monocotiledônea (milho), e que esta inibição foi decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio, estimulada pelo timol, com a conseqüente modificação nos lipídios da membrana.

Apesar da inibição do crescimento dos dois modelos vegetais, observou-se que em alface foi mais expressivo (Tabelas 1 e 2, Figura 4). Amri et al. (2013), relataram que geralmente eudicotiledôneas são mais sensíveis à monoterpenos do que monocotiledôneas. Pinheiro et al. (2015), pesquisando o efeito do óleo essencial de *P. amboinicus* e de seus componentes majoritários carvacrol e timol, concluíram que os três componentes testados apresentaram efeito no desenvolvimento tanto da alface quanto do sorgo, porém os resultados na alface, assim como no presente trabalho, foram mais expressivos.

Da mesma forma que o 2,4-D, o ácido do timoxiacético (**4**), se mostrou com

caráter seletivo, pois apresentou efeito apenas na eudicotiledônea (Sbano et al., 2013). Tal efeito foi observado em todas as concentrações utilizadas neste estudo, e as variáveis mais afetadas foram o CA e o IVG (Tabela 2).

Esse efeito inibitório da germinação e do crescimento, provocado pelo monoterpeno timol, também já foi estudado e encontrado em espécies de plantas daninhas (Azirak e Karaman, 2008). De acordo com Kordali et al. (2008), a inibição da germinação de espécies de daninhas foi comparada com a supressão da germinação promovida pelo herbicida sintético 2,4-D, de maneira que a inibição promovida pelo timol foi tão grande quanto a do 2,4-D. Isso demonstra o seu potencial para aplicação como bioherbicida.

Um estudo relacionado ao efeito bactericida do timol mostrou que o mesmo inibe o desenvolvimento da bactéria *S. typhimurium*. Além disso, os autores também estudaram o efeito sinérgico do timol com seu isômero carvacrol. A partir desse experimento, foi possível concluir que essas duas moléculas, quando associadas, provocaram o mesmo efeito inibitório, porém em uma concentração muito menor do que a necessária com os mesmos componentes isolados (Zhou et al., 2007).

Portanto, os resultados encontrados nesse estudo podem estar relacionados, basicamente, com a capacidade que os monoterpenos apresentam de atuar na integridade da membrana celular, provocando uma mudança no estado de fluidez da membrana. De acordo com Zunino e Zygadlo (2004), os monoterpenos atuam nos fosfolipídios da membrana, aumentando a razão entre os ácidos graxos insaturados e os saturados, o que determina na alteração do arranjo físico da membrana. Eles ainda ressaltam que tal comportamento pode estar relacionado com uma tentativa de manter a integridade da membrana, pois as ligações insaturadas mantêm a fase cristalina líquida da membrana, impedindo a peroxidação lipídica, sendo uma resposta encontrada em plantas submetidas à estresse hídrico e oxidativo, causando vários distúrbios em processos fisiológicos e bioquímicos (Amri et al., 2013). Assim, o mecanismo de ação dos monoterpenos está relacionado ao estresse oxidativo na planta. Um dos resultados da perda da integridade da membrana é o vazamento de eletrólitos e perda da seletividade da membrana. De acordo com Anazetti e Melo (2007), o vazamento de eletrólitos e as trocas iônica indiscriminadas, determinam no desbalanceamento do pH celular e na concentração dos íons. Essa variação pode inibir a síntese de ATP e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode ocasionar a ruptura de membranas determinando

na necrose celular.

3.3. Citotoxicidade

Para as análises de citotoxicidade foram utilizados ensaios microscópicos para avaliar o índice mitótico (IM), as alterações cromossômicas (AC), as alterações nucleares (AN), a frequência de micronúcleos (MN) e as frequências de cada tipo de AC observada (cromossomos perdidos, cromossomos aderentes, fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas, c-metáfases e poliploidização cromossômica).

As variáveis IM e AN estão relacionadas com a morte celular, entretanto só foi observada diferença significativa do controle negativo na AN (Tabela 3 e Figura 5). Pinheiro et al. (2015), também encontraram aumento na quantidade de AN, proporcional ao aumento da concentração teste de carvacrol, entretanto esse resultado foi acompanhado de redução do IM. A manutenção do IM no presente estudo pode estar relacionada com a concentração teste de carvacrol que é bem menor do que a utilizada por Pinheiro et al. (2015).

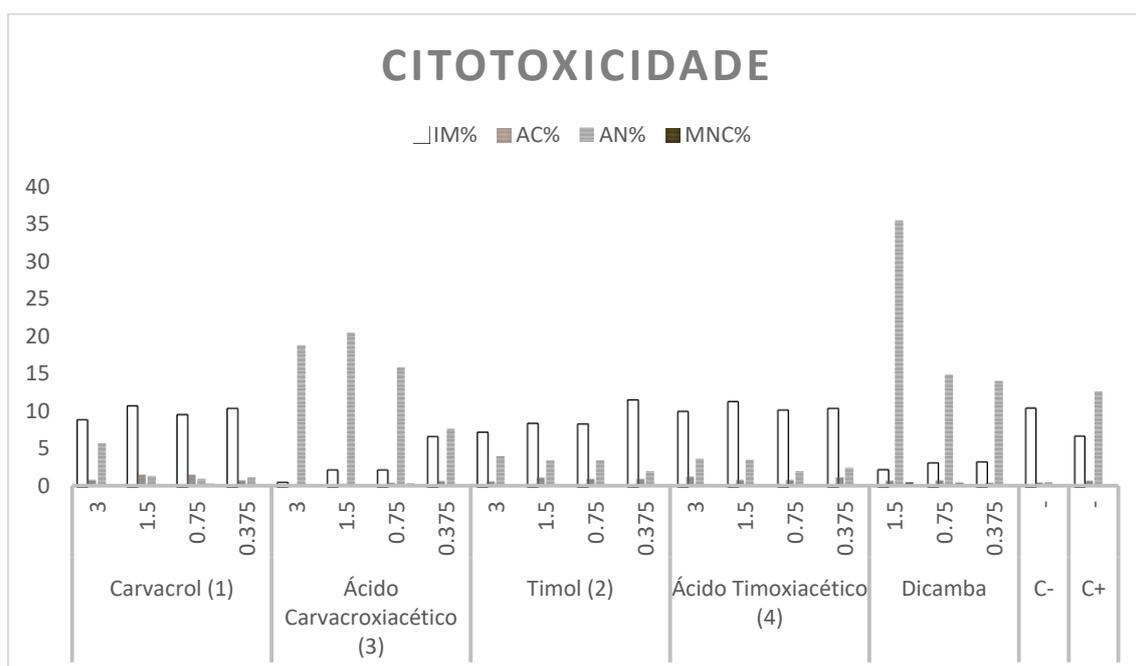


Figura 5. Citotoxicidade das moléculas carvacrol (1), timol (2), ácido carvacroxiacético (3), ácido timoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L⁻¹, avaliadas das moléculas.

As AN podem ser expressas tanto por MN quanto por núcleos condensados. Entretanto, apesar da presença de ambos, observou-se com maior frequência a presença de núcleos condensados. Os núcleos condensados são a representação citológica do

processo de morte celular (Andrade Vieira et al., 2011; Andrade-Vieira et al., 2012), que como descrito anteriormente pode ser decorrente dos efeitos do carvacrol na permeabilidade da membrana e na enzima ATPase.

Apesar de não ter sido observada diferenciação estatística na quantidade de AC (Tabela 3), quando comparado com os controles negativos, as frequências de fragmentos cromossômicos e cromossomos perdidos aumentaram (Tabela 3 e Figura 6). De acordo com Andrade et al. (2008), o aparecimento de MN pode estar relacionado com essas alterações, já que os MN se formam a partir de fragmentos acêntricos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que não são divididos corretamente para as células filhas. Essa má divisão pode resultar em apoptose devido à deleção de genes primários ou a perda cromossômica.

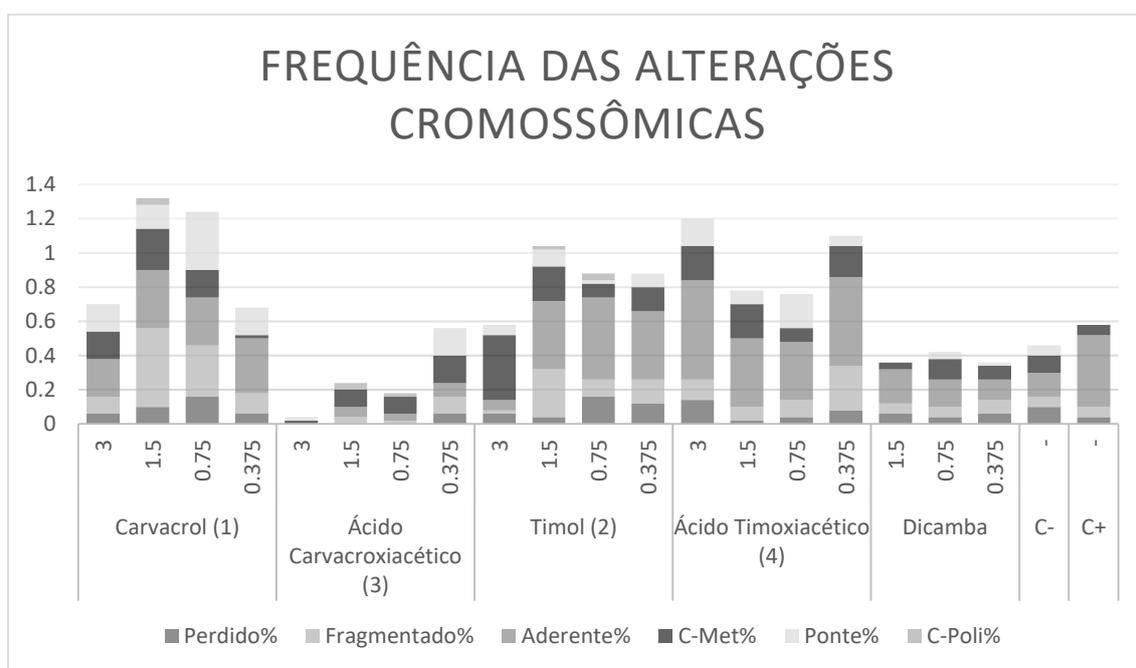


Figura 6. Frequência das alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* tratadas com carvacrol (1), timol (2), ácido carvacroxiacético (3), ácido timoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L⁻¹, avaliadas das moléculas.

A partir da frequência de AC é possível avaliar o mecanismo de ação da molécula no ciclo celular. Assim, o aumento de pontes e dos fragmentos cromossômicos (Figura 3.g), que são originários das quebras de cromossomos, demonstram o efeito clastogênico do carvacrol, ou seja, a ação da molécula diretamente no DNA do indivíduo.

Tabela 3. Parâmetros das divisões mitóticas de *Lactuca sativa* tratada com diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis carvacrol e timol e seus derivados ácido fenoxiacético semissintéticos. Onde: IM% porcentagem do índice mitótico, AC% representa a porcentagem de alterações cromossômicas por total de células, AN% porcentagem de alterações nucleares por total de células, MNC% porcentagem de micronúcleos por total de células, Perdido% porcentagem de cromossomos perdidos por células em divisão, Frag% porcentagem de fragmentos cromossômicos por células em divisão, Aderente% porcentagem de cromossomos aderentes por células em divisão, C-Met% porcentagem de c-metáfases por células em divisão, Ponte% porcentagem de pontes por células em divisão e C-Poli% porcentagem de poliploidização cromossômica por células em divisão.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	IM%	AC%	AN%	MNC%	Perdido%	Frag%	Aderente%	C-Met%	Ponte%	C-Poli%
Carvacrol (1)	3	8,54a	0,76ab	5,70c	0,00ab	0,06ab	0,10ab	0,22ab	0,16ab	0,16a	0,00ab
	1,5	10,38a	1,42c	1,38a	0,10ab	0,10ab	0,46c	0,34ab	0,24ab	0,14ab	0,04ab
	0,75	9,21a	1,40c	0,92a	0,16ab	0,16ab	0,30c	0,28ab	0,16ab	0,34	0,00ab
	0,375	10,03a	0,72ab	1,21a	0,04ab	0,06ab	0,12ab	0,32ab	0,02ab	0,16a	0,00ab
Ácido Carvacrox iacético (3)	3	0,32c	0,06ab	18,78c	0,02ab	0,00ab	0,00ab	0,00a	0,02ab	0,02ab	0,00ab
	1,5	1,96c	0,24ab	20,44	0,00ab	0,00ab	0,04ab	0,06a	0,10ab	0,00ab	0,04ab
	0,75	1,94c	0,40ab	15,85b	0,22ab	0,00ab	0,02ab	0,04a	0,10ab	0,00ab	0,02ab
	0,375	6,34b	0,62ab	7,64c	0,06ab	0,06ab	0,10ab	0,08 a	0,16ab	0,16a	0,00ab
Timol (2)	3	6,90b	0,58ab	4,00c	0,00ab	0,06ab	0,02ab	0,06a	0,38a	0,06ab	0,00ab
	1,5	8,06b	1,06ab	3,44c	0,02 ab	0,04ab	0,28c	0,40ab	0,20ab	0,10ab	0,02ab
	0,75	7,96b	0,88ab	3,44c	0,00ab	0,16ab	0,10ab	0,48b	0,08ab	0,02ab	0,04ab
	0,375	11,14a	0,88ab	1,96a	0,00ab	0,12ab	0,14ab	0,40ab	0,14ab	0,08ab	0,00ab
Ácido Timoxiacé tico (4)	3	9,62a	1,20b	3,65c	0,00ab	0,14ab	0,12ab	0,58b	0,20ab	0,16a	0,00ab
	1,5	10,92a	0,78ab	3,52c	0,00ab	0,02ab	0,08ab	0,40ab	0,20ab	0,08ab	0,00ab
	0,75	9,80a	0,76ab	1,94a	0,00ab	0,04ab	0,10ab	0,34ab	0,08ab	0,20a	0,00ab
	0,375	10,02a	1,10ab	2,48a	0,00ab	0,08ab	0,26ab	0,52b	0,18ab	0,06ab	0,00ab
Dicamba	1,5	2,00c	0,68ab	35,38c	0,32 ab	0,06ab	0,06ab	0,20ab	0,04ab	0,00ab	0,00ab
	0,75	2,90c	0,70ab	14,90b	0,28ab	0,04ab	0,06ab	0,16ab	0,12ab	0,04ab	0,00ab
	0,375	3,02c	0,44ab	13,98b	0,08ab	0,06 ab	0,08ab	0,12ab	0,08ab	0,02ab	0,00ab
Solvente	-	10,06a	0,47a	0,45 a	0,00a	0,10a	0,06a	0,14a	0,10a	0,06a	0,00a
Glifosato	-	6,41b	0,68b	12,62b	0,10 b	0,04 b	0,06b	0,42b	0,06b	0,00b	0,00b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste.

A partir da frequência de AC é possível avaliar o mecanismo de ação da molécula no ciclo celular. Assim, o aumento de pontes e dos fragmentos cromossômicos (Figura 3.g), que são originários das quebras de cromossomos, demonstram o efeito clastogênico do carvacrol, ou seja, a ação da molécula diretamente no DNA do indivíduo.

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), o aumento da frequência de AC representa o efeito genotóxico do agente teste, enquanto que uma elevada ocorrência de AN representa o efeito citotóxico. Já o acréscimo no aparecimento de MN (Figura 3.e e 3.h) se relaciona com o efeito mutagênico. Dessa forma, o carvacrol demonstrou efeito citotóxico e genotóxico, já que apresentou aumento nas AN e AC, enquanto o ácido carvacroxiacético (**3**) apresentou efeito citotóxico, pois promoveu aumento das AN.

O efeito citotóxico do timol (**2**) também foi testado neste estudo, sendo encontrada uma redução no IM, de modo que este se igualou estatisticamente ao das células tratadas com o herbicida comercial glifosato (Tabela 3). Essa redução pode ser devido ao número de células em processos de morte celular. Já que o mecanismo de ação do timol favorece esse processo.

A presença de núcleos condensados é expressa na variável AN. Tal variável pode ter aumentado em virtude da elevação nos danos e inibição da síntese do DNA (Kordali et al., 2008). Além disso, as ERO podem reagir com proteínas, lipídeos e com o DNA, promovendo danos estruturais nessas biomoléculas. Esses danos ocorridos na estrutura do DNA podem ser mais simples, de forma que possam ser corrigidos pela célula, ou podem não ser reparados determinando na formação de mutações. Quando esses erros irreparáveis e mutações são reconhecidos pelas células, essas sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas que sinalizam para que a célula entre em apoptose. Este mecanismo é importante para a manutenção da saúde do tecido, já que se trata de um processo para evitar tumores (Anazetti e Melo, 2007).

Neste estudo foi observado redução do IM e aumento nas AN, para as células tratadas com timol (Tabela 3). Porém, Pinheiro et al. (2015), estudando esse mesmo produto natural, observaram, além dos efeitos citados, o acréscimo na quantidade de AC. Essa divergência no resultado provavelmente é reflexo da concentração teste aplicada, pois a concentração utilizada no presente trabalho é inferior a testada pelos autores supracitados.

As células meristemáticas tratadas com o ácido timoxiacético (4), apresentaram diferenciação na variável AN. Isso mostra que apesar delas estarem se dividindo, o ácido possui efeito citotóxico (Anazetti e Melo, 2007; Leme e Marin-Morales, 2009).

Apesar das AC não terem aumentado nos meristemas tratados com timol, a frequência da AC cromossomos fragmentados, apresentou diferenciação quando comparado com o controle (Figura 3.g e Tabela 3). Isso demonstra que o timol apresenta mecanismo de ação clastogênico. Undeger et al. (2009), também encontraram esse mecanismo de ação para o timol.

Já o ácido timoxiacético (4) apresentou aumento significativo nas AC, quando comparado com o controle negativo e igualdade estatística quando comparado com o controle positivo (Tabela 3 e Figura 6). Mostrando dessa forma, ser genotóxico (Leme e Marin-Morales, 2009). Além disso, as células meristemáticas expostas a essa molécula semissintética, apresentaram aumento na frequência de cromossomos aderentes. Tal alteração pode estar relacionada ao mecanismo de ação do tipo aneugênico, quando tal alteração é decorrente da interferência do composto nas fibras do fuso mitótico, impedindo que os cromossomos se organizem durante a metáfase e se dividam corretamente durante a anáfase, resultando na formação de células filhas diferentes da célula mãe (Andrade et al. 2008; Andrade et al. 2010; Andrade-Viera et al. 2014; Aragão et al. 2015). Porém, as células com cromossomos aderentes pode se relacionar com efeitos epigenéticos do composto, quando a substância teste atua nas proteínas do tipo histona alterando a morfologia dos cromossomos promovem a coesão entre eles, sendo tal efeito é considerando como clastogênico (Freitas et al., 2016).

Suzuki et al. (1985), testaram a produção de radicais livres e o efeito citotóxico de compostos fenólicos, sendo o timol o mais efetivo para ambas as variáveis. Em um teste realizado com vários compostos fenólicos, Kasugai et al. (1991), também observaram que a molécula que apresentou maior efeito citotóxico, entre as moléculas testadas por eles, foi o timol, isso porque, o mesmo apresentou o efeito tóxico esperado, mesmo em baixas concentrações. Dessa maneira, tal molécula apresenta potencial para ser aplicada como bioherbicida.

3.4. Genotoxicidade

Para avaliar os danos no DNA, provocados pelo carvacrol (1) e pelo ácido carvacroxiacético (3), foram realizadas análises moleculares com marcadores ISSR. Apesar do ácido carvacrol ter sido mais danoso à germinação, ao crescimento e ao ciclo celular nos testes de fito e citotoxicidade, no teste molecular ele se mostrou tão tóxico quanto o carvacrol e o 2,4-D. Já que permaneceu em um agrupamento juntamente com os indivíduos tratados com tais moléculas, se diferenciando do agrupamento integrado pelos indivíduos tratados com os controles negativos (Figuras 7 e 8), reforçando os efeitos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade anteriormente descritos.

Undeger et al. (2009), estudando os danos provocados ao DNA de células V79 pelo produto natural carvacrol, não encontraram diferença significativa entre os tratamentos e os controles negativos, diferindo dos resultados para células meristemáticas vegetal desta pesquisa. Entretanto, além das diferenças dos tipos celulares, o teste realizado por Undeger et al. (2009), foi através do teste de cometa, enquanto o desse estudo se deu por marcadores moleculares do tipo ISSR, diferindo dessa forma, as metodologias de pesquisa e células teste.

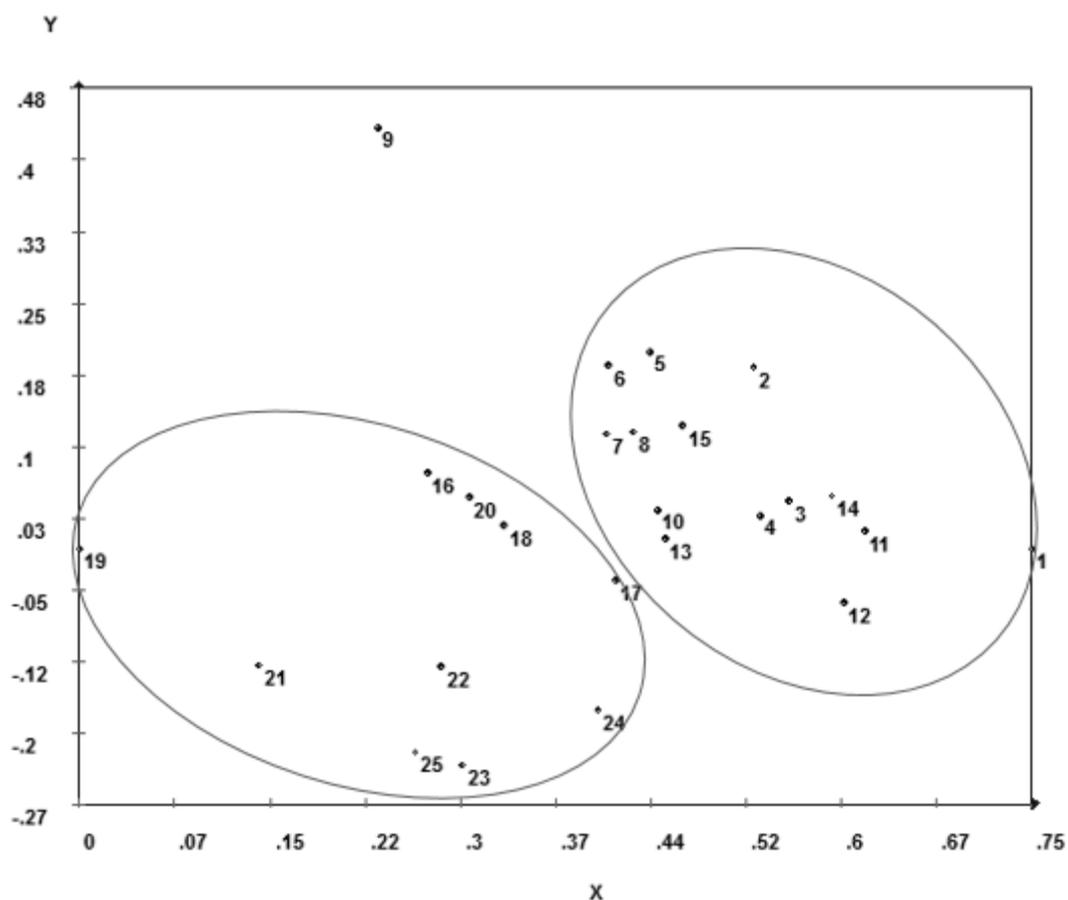


Figura 7. Projeção 2D das amostras de sorgo tratadas com carvacrol 3mmol.L^{-1} , ácido carvacroxiacético 3mmol.L^{-1} , 2,4-D 3mmol.L^{-1} , solvente e água (os dois últimos são os controles negativos). *formação de dois grupos, sendo um grupo com os dois controles negativos (16-25) e o outro com os tratamentos (carvacrol números 1 a 5 e ácido carvacroxiacético 6 a 10) e o controle positivo (11-15). A amostra 9 se diferenciou dos dois grupos. Esses dados são sustentados pela análise da AMOVA que demonstrou diferença entre esses dois grupos.

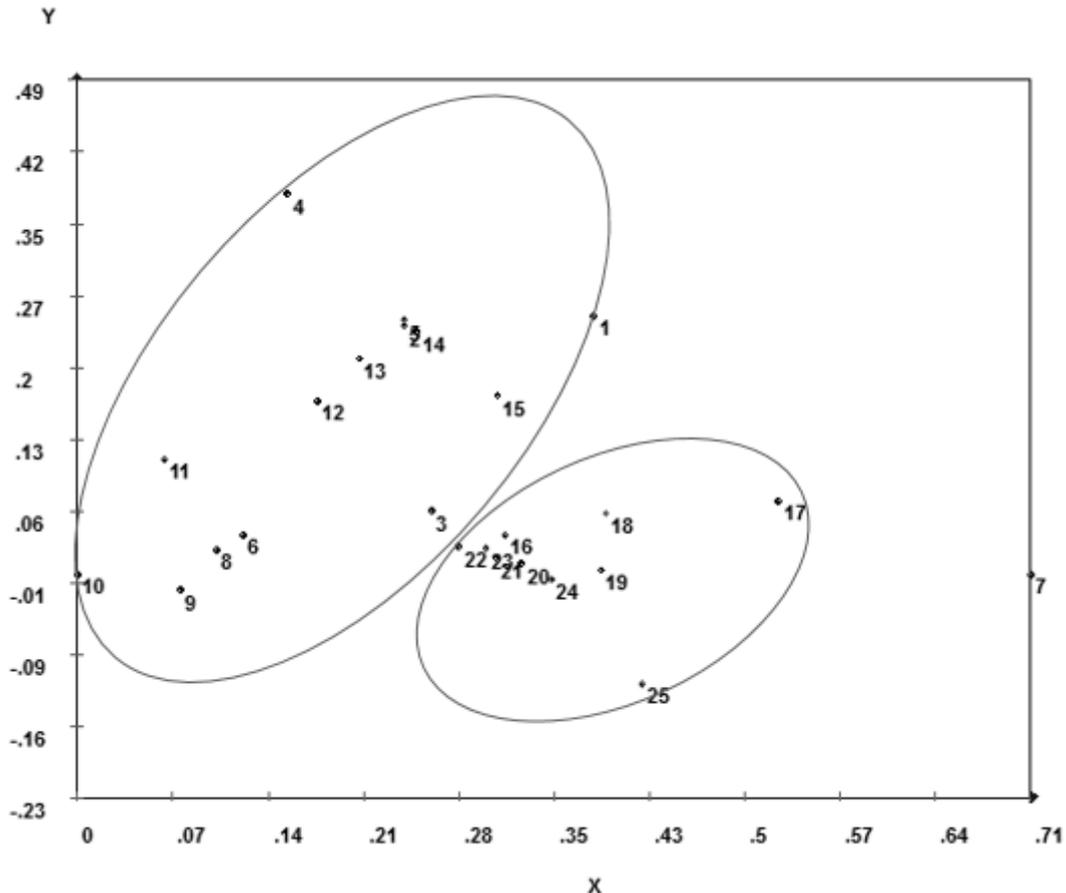


Figura 8. Projeção 2D das amostras de alfaca tratadas com carvacrol 3mmol.L^{-1} , ácido carvacroxiacético 3mmol.L^{-1} , 2,4-D 3mmol.L^{-1} , solvente e água (os dois últimos são os controles negativos). *formação de dois grupos, sendo um grupo com os dois controles negativos (16-25) e o outro com os tratamentos (carvacrol, números 1 a 5 e ácido carvacroxiacético, 6 a 10) e o controle positivo (11-15), sendo que a amostra 9 se diferenciou dos dois grupos. Esses dados são sustentados pela análise da AMOVA que demonstrou diferença entre esses dois grupos.

As avaliações dos géis provenientes das análises dos sete *primers* ISSR, tanto em *S. bicolor* quanto em *L. sativa*, demonstraram que o carvacrol provocou perdas e ganhos de bandas, ou seja, ressaltam que o carvacrol determinou em alterações nos padrões do DNA dos modelos vegetais, sendo tais alterações semelhantes às provocadas pelo herbicida sintético 2,4-D (Figuras 1 e 2). Segundo Enan (2007), a presença de adutos de DNA podem estar relacionados com essa perda e ganho de bandas, pois esses adutos

podem impedir o anelamento do primer, sendo a guanina a base nitrogenada que compõe o DNA com maior propensão de sofrer esse tipo de alteração (Dipple, 1995).

Além disso, outro fator que pode contribuir com essa alteração no padrão de bandas é a fragmentação cromossômica no sítio de anelamento do *primer* (Enan, 2007), sendo os fragmentos cromossômicos uma característica encontrada neste estudo e descrita anteriormente. A perda e ganho de bandas são alterações comumente encontradas em pesquisas que visam avaliar a instabilidade do genoma dos indivíduos frente a agentes tóxicos (Bernardes et al., 2015).

Para avaliação da estabilidade genômica, calculou-se a porcentagem de polimorfismo e os valores da *Genomic Template Stability* (GTS), que referem à estabilidade do genoma a partir do ganho e perda de bandas (Tabelas 4 e 5), sendo que os tratamentos se igualaram com o herbicida sintético 2,4-D, tanto em sorgo quanto em alface (Tabela 6).

Segundo Cenkci et al. (2010), o valor de GTS sofre redução sempre que o nível de toxicidade da molécula teste aumenta, o que pudemos observar neste estudo. Apesar desse parâmetro ser muito utilizado para testes de toxicidade, o mesmo não havia sido realizado com o carvacrol.

Tabela 6. GTS de sorgo e alface tratados com carvacrol 3mmol.L⁻¹, ácido fenoxiacético derivado do carvacrol 3mmol.L⁻¹, 2,4-D 3mmol.L⁻¹ e solvente (controle negativo).

Moléculas	Alface	Sorgo
Carvacrol (1)	94.13ab	95.11a
Ácido carvacroxiacético (3)	93.53a	97.22ab
2,4-D	93.90a	95.81a
Solvente	100b	100b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste.

Tabela 4. Número de bandas que apareceram e desapareceram comparadas com o controle, baseadas nos 7 *primers* utilizados para as raízes de alface tratadas com carvacrol 3mmol.L⁻¹, ácido carvacrol 3mmol.L⁻¹, 2,4-D 3mmol.L⁻¹ e solvente e respectivas percentagens de GTS.

<i>Primers</i>	Solvente		2.4D				Ac Carvacrol				Carvacrol			
	n	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)
UBC807	30	100	7	0	1.4	95.33333	7	2	1.8	94	6	1	1.4	95.33333
UBC808	34	100	5	0	1	97.05882	4	3	1.4	95.88235	3	2	1	97.05882
UBC809	32	100	10	1	2.2	93.125	9	3	2.4	92.5	1	1	0.4	98.75
UBC810	35	100	8	1	1.8	94.85714	1	5	1.2	96.57143	1	1	0.4	98.85714
UBC814	30	100	2	0	0.4	98.66667	3	0	0.6	98	2	4	1.2	96
UBC834	23	100	13	8	4.2	81.73913	17	3	4	82.6087	13	11	4.8	79.13043
UBC836	29	100	5	0	1	96.55172	6	1	1.4	95.17241	8	1	1.8	93.7931
Total	213	100	50	10	12	94.3662	47	17	12.8	93.99061	34	21	11	94.83568

*Onde: n = número de bandas observadas nas amostras do grupo controle; a = média do número de bandas que apareceram ou desapareceram nas 5 amostras expostas à mesma concentração.

Tabela 5. Número de bandas que apareceram e desapareceram comparadas com o controle, baseadas nos 7 *primers* utilizados para as raízes de sorgo tratadas com carvacrol 3mmol.L⁻¹, ácido carvacrol 3mmol.L⁻¹, 2,4-D 3mmol.L⁻¹ e solvente e respectivas percentagens de GTS.

<i>Primer</i>	Solvente		2.4D				Ac Carvacrol				Carvacrol			
	n	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)	+	-	a	GTS(%)
UBC807	34	100	0	3	0.6	98.23529	0	3	0.6	98.23529	0	8	1.6	95.29412
UBC808	35	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	1	0.2	99.42857
UBC809	48	100	4	2	1.2	97.5	1	10	2.2	95.41667	3	6	1.8	96.25
UBC810	38	100	10	1	2.2	94.21053	5	3	1.6	95.78947	10	1	2.2	94.21053
UBC814	7	100	4	0	0.8	88.57143	1	0	0.2	97.14286	3	1	0.8	88.57143
UBC834	32	100	0	7	1.4	95.625	0	3	0.6	98.125	0	5	1	96.875
UBC836	29	100	5	0	1	96.55172	5	1	1.2	95.86207	7	0	1.4	95.17241
Total	223	100	23	13	7.2	96.7713	12	20	6.4	97.13004	23	22	9	95.96413

*Onde: n = número de bandas observadas nas amostras do grupo controle; a = média do número de bandas que apareceram ou desapareceram nas 5 amostras expostas à mesma concentração.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o carvacrol, o timol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, possuem atividades fitotóxica, citotóxica e genotóxica. Entretanto, o efeito tóxico do ácido timoxiacético foi seletivo, semelhantemente ao do herbicida comercial 2,4-D, tornando-o um composto de escolha como bioherbicida seletivo, para controle de plantas daninhas de folhas larga.

O timol apresenta mecanismo de ação clastogênico e aneugênico, ou seja, promove danos no DNA e no fuso mitótico do indivíduo. Enquanto, carvacrol demonstrou mecanismo de ação clastogênico, promovendo danos no DNA do organismo, mas não atuando na formação do fuso mitótico.

As análises moleculares demonstraram igualdade entre a estabilidade genômica das plantas tratadas com o herbicida 2,4-D e as moléculas teste carvacrol e ácido carvacroxiacético, evidenciando o efeito bioherbicida dessas moléculas.

5. REFERÊNCIAS

- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Gelaw, T. K., Lamo-Castellví, S., Pagán, R., & García-Gonzalo, D., 2013. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 114(1), 173-185.
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., & Jamoussi, B., 2013. Reviews on phytotoxic effects of essential oils and their individual components: News approach for weeds management, 4, 96-114.
- Anazetti, M. C., & Melo, P. S., 2007. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa*, 1(1), 37-58.
- Andrade, L. F., Campos, J. M. S., & Davide, L. C., 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(3), 706-710.
- Andrade, L. F., Davide, L. C., & Gedraite, L. S., 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25, 626–631.
- Andrade-Vieira, L. F.; Botelho, C.M.; Palmieri, M.J.; Laviola, B.G; Praça-Fontes, M.M., 2014. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)*, 86, 373-382.
- Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F., 2015. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, 35(2), 259-272.
- Azirak, S., & Karaman, S., 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B- Soil and Plant Science*, 58(1), 88-92.
- Bernardes, P. M., Andrade-Vieira, L. F., Aragão, F. B., Ferreira, A., & da Silva Ferreira, M. F., 2015. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(7), 207.
- Boccolini, de M.M., P., Boccolini, C. S., de Rezende Chrisman, J., Markowitz, S. B.,

- Koifman, S., Koifman, R. J., & Meyer, A., 2013. Pesticide use and non-Hodgkin's lymphoma mortality in Brazil. *International journal of hygiene and environmental health*, 216(4), 461-466.
- Çenkci S., Çiğerci I.H., Yıldız M., Özyay C., Bozdağ A, Terzi H., 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany* 67: 467-473.
- Cruz, C. D., 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy (Online)*, 35, 271-276.
- Dipple, A., 1995. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 16, (3) 437.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Enan, M. R., 2007. Assessment of genotoxic activity of paranitrophenol in higher plant using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3, 103-109.
- Fagundes, M. Z., Gonçalves, M. A., Soares, M. P., Martins, M. L., Zanella, R., Riet-Correa, F., & Anjos, B. L., 2015. Clinicopathological and toxicological aspects of poisoning by the clomazone herbicide in sheep. *Small Ruminant Research*, 124, 120-126.
- Freitas, A. S., Cunha, I. M. F., Andrade-Vieira, L. F., & Techio, V. H. (2016). Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 124, 426-434.
- Gill, A. O., & Holley, R. A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 111(2), 170-174.
- Kasugai, S., Hasegawa, N., & Ogura, H., 1991. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. *Journal of dental research*, 70(2), 127-130.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E., 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18), 8788-8795.
- Leme, D.M.; Marin-Morales, M., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 1, 71-81.
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. D. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... & Fontes, M. M. P., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(41), 8981-8990.
- Ribeiro, J. P. N., & Lima, M. I. S. (2011). Potencial alelopático de *Crinum americanum* L. sob diferentes condições de extração. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 32(2), 465-472.
- Sbano, A.; Ferreira, J.V.R.; Peckle, B.A.; Macrae, A.; Direito, I.C.N., 2013. Otimização de Método Cromatográfico para Quantificação do Herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Acta Scientia & Technicae*, v.1, n.2, p.37-46.
- Souza Filho, A. P. S., Santos, R. A., Santos, L. S., Guilhon, G. M. P., Santos, A. S., Arruda, M. S. P., ... & Arruda, A. C., 2006. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. *Planta daninha*, 24(4), 649-656.
- Suzuki, Y., Sugiyama, K., & Furuta, H., 1985. Eugenol-Mediated Superoxide?? Generation and Cytotoxicity in Guinea Pig Neutrophils. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 39(3), 381-386.
- Taiz, L., & Zeiger, E., 2013. *Fisiologia vegetal* 5ªed. Porto Alegre: Editora Artmed.

- Tavella, L. B., Silva, Í. N., de Oliveira Fontes, L., Dias, J. R. M., & de Lima Silva, M. I., 2012. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 7(2), 06-12.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606-4610.
- Ündeğer, Ü., Başaran, A., Degen, G. H., & Başaran, N., 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2037-2043.
- Vieira Filho, J. E. R., Campos, A. C., & de Carvalho Ferreira, C. M., 2009. Abordagem alternativa do crescimento agrícola: um modelo de dinâmica evolucionária. *Revista Brasileira de Inovação*, 4(2 jul/dez), 425-476.
- Yan, D., Xiang, Y., Li, K., Chen, Y., Yang, Z., & Guo, D., 2014. Synthesis, characterization and properties of 1, 2, 4-triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazole derivatives and their europium complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1074, 487-495.
- Yang, D. T., & Zhu, X., 2013. Modernization of agriculture and long-term growth. *Journal of Monetary Economics*, 60(3), 367-382.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H. U. I., Yang, Z., Li, J., ... & Yan, W., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety*, 27(2), 124-133.
- Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A., 2004. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, 219(2), 303-309.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO GUAIACOL E DO EUGENOL E DOS SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS FENOXIACÉTICOS EM SEMENTES, PLÂNTULAS E CÉLULAS DE *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*

1. INTRODUÇÃO

O 2,4 dicloro fenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA) foram os primeiros herbicidas auxínicos a serem usados na agricultura. Devido à seletividade apresentada por essa classe de herbicidas, o uso dessas substâncias inovou e revolucionou a agricultura no mundo, no tocante a forma de controle de plantas daninhas de folha larga. Dessa forma, foi possível diminuir a mão de obra e aumentar a produtividade de cereais (Kudsk e Streibig, 2003; Barbosa, 2004; Delaney *et al.*, 2006; Silva e Silva, 2007).

Entretanto, a partir de 1979, após ser descoberta nematicidas em aquíferos norte-americanos, iniciou-se a preocupação dos pesquisadores em relação aos impactos provocados pelos agroquímicos (RIBEIRO *et al.*, 2007). Outro problema encontrado em relação aos herbicidas é a resistência que as pragas podem adquirir devido à seleção natural, tornando-se necessário uma introdução constante de novos herbicidas no mercado (EDDLESTON *et al.*, 2002).

Dessa forma, existem vários constituintes químicos, produzidos naturalmente pelo metabolismo secundário de plantas, que apresentam potencial para serem aplicados no controle de plantas daninhas. Esses compostos estão presentes em óleos essenciais e afetam o desenvolvimento de outras espécies, devido ao seu efeito alelopático (Li *et al.*, 2011; Rowshan *et al.*, 2014). Dessa forma, a utilização de produtos naturais com potencial alelopático como o eugenol (Kasugai *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1994; Bainard *et al.*, 2006; Gill e Holley, 2006; Vaid *et al.*, 2010; Stoklosa *et al.*, 2012), pode ser uma alternativa para controle de plantas daninhas.

O eugenol é o composto majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, está presente também em canela, sassafrás e mirra. O eugenol e seus decorrentes atuam inibindo a germinação de sementes de várias plantas, bem como, na diminuição do crescimento de algumas delas (Pelissari *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2015). O guaiacol é um fenol volátil derivado da pirólise da lignina durante o processamento/degradação desta última nas indústrias de papel e celulose (Mazumder *et al.*, 2005; Ozagac *et al.*, 2016). Além disso, o guaiacol (2-metoxifenol) é um fenol de origem natural, presente na composição de óleos essenciais e apresenta atividade antisséptica (Pelissari *et al.*, 2010), porém, estudos relacionados à toxicidade do guaiacol em plantas não são encontrados.

Outra forma sustentável de controlar as plantas daninhas é por meio da produção e emprego de moléculas semissintéticas derivadas de compostos naturais com atividade bioherbicida. Já que, esses compostos são derivados de moléculas naturais, podem causar menor prejuízo ao ambiente, sendo sua aplicação mais sustentável quando comparada à herbicidas sintéticos (Souza Filho et al., 2006).

Os efeitos desses compostos são avaliados por meio de teste de toxicidade dos mesmos. Vários testes são utilizados para avaliação dos riscos ambientais dos níveis de poluição ambiental e para prospectar os efeitos de agentes tóxicos e mutagênicos presentes no ambiente. Os estudos iniciais de toxicologia focavam principalmente nos efeitos desses resíduos em animais. Entretanto, os vegetais superiores têm se mostrado sensíveis a agentes tóxicos presentes no ambiente, podendo assim, serem utilizados como organismos teste no monitoramento ambiental. Além disso, o estudo com vegetais permite a análise simultânea de diferentes mecanismos de ação do agente mutagênico (Grant, 1994; Leme e Marin-Morales, 2009; Aras et al., 2012; Lyubenova et al., 2012; Pereira et al., 2013).

Com a utilização de espécies-modelos vegetais em testes de toxicidade obtêm-se informações macro e microscópicas. As observações macroscópicas possibilitam a análise de parâmetros relacionados ao desenvolvimento inicial da plântula. Enquanto, as avaliações microscópicas, permitem o estudo de parâmetros relacionados a divisão celular, como análise do índice mitótico, das aberrações cromossômicas e das alterações nucleares (Andrade et al. 2008; Andrade et al. 2010; Andrade- Viera et al. 2014; Aragão et al. 2015; Bernardes et al. 2015; Pinheiro et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi averiguar o efeito do eugenol, guaiacol e dos seus respectivos ácidos fenoxiacéticos semissintéticos (Figura 1), em relação à germinação e ao desenvolvimento inicial de sementes de *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*, bem como analisar a ação no ciclo mitótico de células meristemáticas radiculares de *L. sativa*.

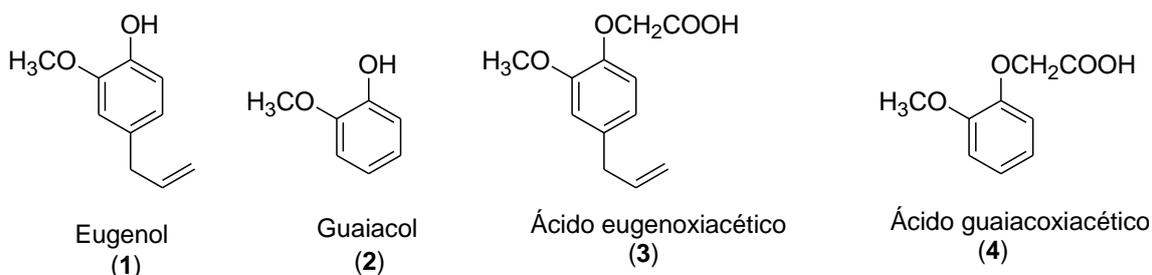


Figura 1. Estrutura química dos fenóis naturais eugenol (1) e guaiacol (2), e, de seus derivados semissintéticos ácido eugenoxiacético (3) e ácido guaiacoxiacético (4).

A obtenção dos semissintético contendo o grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$ foi realizada devido esse grupo estar presente nas estruturas dos herbicidas auxínicos 2,4-D e MCPA. Vislumbrando assim, obter compostos ativos, com alto potencial herbicida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes comerciais da eudicotiledônea *L. sativa* L. var. Mônica da marca Feltrin (alface) e sementes da monocotiledônea *S. bicolor* L. Moench da marca BR seeds (sorgo), adquiridas em casa rural.

2.2 Procedimentos Experimentais Gerais

Os ácidos fenoxiacéticos foram sintetizados no Laboratório de Química (LQ04) do CCENS da UFES (Alegre-ES). Os fenóis usados nas reações (eugenol e guaiacol) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, assim como a acetona P.A. usada nas reações e o éter dietílico P.A. usado na purificação dos compostos sintetizados. A água purificada por osmose reversa foi usada nas reações e nas soluções usadas nos experimentos.

Os ácidos eugenoxiacético (**3**) e guaiacoxiacético (**4**) e foram preparados de forma similar. Como exemplo, para o preparo do ácido (**3**), inicialmente, preparou-se uma solução de cloroacetato de sódio (8,37 mmol; 0,783 g), dissolvendo o ácido 2-cloroacético (8,37 mmol; 0,791 g) em água destilada (8 mL) e acetona (2 mL), e seguidamente resfriou-se a solução em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) sob agitação, até o pH ser ajustado em 9-10. Em seguida, usando um balão bitubulado de fundo redondo, preparou-se uma mistura de NaOH (7,37 mmol; 0,295 g), água destilada (40 mL) acetona (10 mL) e eugenol (6,70 mmol; 1,100 g). A referida mistura foi agitada por vinte minutos sob aquecimento a 100 °C. Após os vinte minutos de aquecimento, o cloroacetato de sódio preparado previamente foi adicionado gota a gota à mistura. A solução reagente foi mantida sob aquecimento e deixada sob refluxo por 24 h. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o valor de pH da mistura foi acidificado para 1-2 com ácido clorídrico diluído (HCl), sob banho de gelo, demonstrado na figura 2 (Yan et al.,2014 com adaptações).

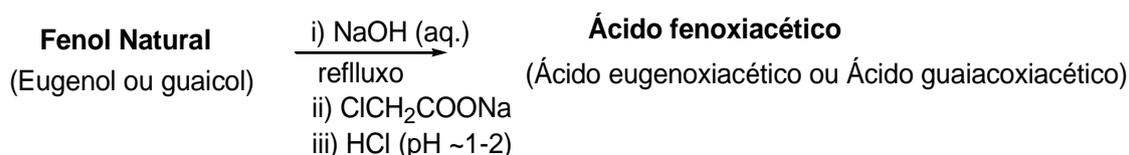


Figura 2. Reações usadas na obtenção de ácidos fenoxiacéticos a partir de fenóis naturais.

Após essa etapa, o material obtido foi purificado por extração líquido-líquido com solventes quimicamente ativos. O material foi dissolvido em 30 mL de éter etílico, em seguida, colocado em um béquer de 250 mL, resfriado em banho de gelo e então, adicionou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) até pH alcalino. Essa mistura foi transferida para um funil de separação, onde foram separadas as fases orgânica e aquosa. Foi realizada nova extração, usando 30 mL de éter dietílico e, novamente, foi coletada a fase aquosa. A fase orgânica foi devidamente descartada e as fases aquosas foram agrupadas em um erlenmeyer, que foi colocado sob banho de gelo e, em seguida acidificada com ácido clorídrico concentrado (HCl) até pH~1-2. O material obtido foi novamente levado para um funil de separação onde foi lavado com 2 x 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado.

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H foram realizadas no Laboratório LabPetro da UFES (Vitória-ES) no espectrômetro da marca Varian, modelo VNMRS 400, operando com um campo magnético de 9,4 T, utilizando uma sonda 5 mm BroadBand $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$ realizadas à temperatura de 25 °C. O solvente usado nas análises foi o CDCl_3 .

Ácido eugenoxiacético (**3**) (cristal marrom claro). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 3,31 (d, 2H, $J=6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH=}$); 3,85 (s, 3H, OCH_3); 4,63 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$); 5,08 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,93 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH=}$); 6,65-6,81 (m, 3H, Ar-H)

Ácido guaiacoxiacético (**4**) (cristal marrom claro) RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 4,69 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$); 6,89-7,04 (m, 4H, Ar-H).

2.3 Teste de Fitotoxicidade

A germinação e avaliações das sementes utilizadas foram efetuadas de acordo com Pinheiro et al. (2015), sendo as soluções testes eugenol (**1**), guaiacol (**2**), ácido eugenoxiacético (**3**) e ácido guaiacoxiacético (**4**), aplicadas em quatro concentrações (3mmol.L^{-1} ; $1,5\text{mmol.L}^{-1}$; $0,75\text{mmol.L}^{-1}$; $0,375\text{mmol.L}^{-1}$). Como controle negativo

utilizou-se o solvente utilizado no preparo das soluções foi: água + acetona 2% + Tween 0,05% e, como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial.

2.4 Teste de Citotoxicidade

A obtenção, fixação e análise das células meristemáticas das raízes tratadas seguiu-se o protocolo descrito por Aragão et al. (2015). Avaliou-se as variáveis índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC), alterações nucleares (AN) e a frequência de cada AC, sendo c-metáfase, ponte (Figura 3.j), pegajoso (Figura 3.h), poliploidização, quebrado (Figura 3.c) e perdido (Figura 3.h e Figura 3.i), segundo Aragão et al. (2015).

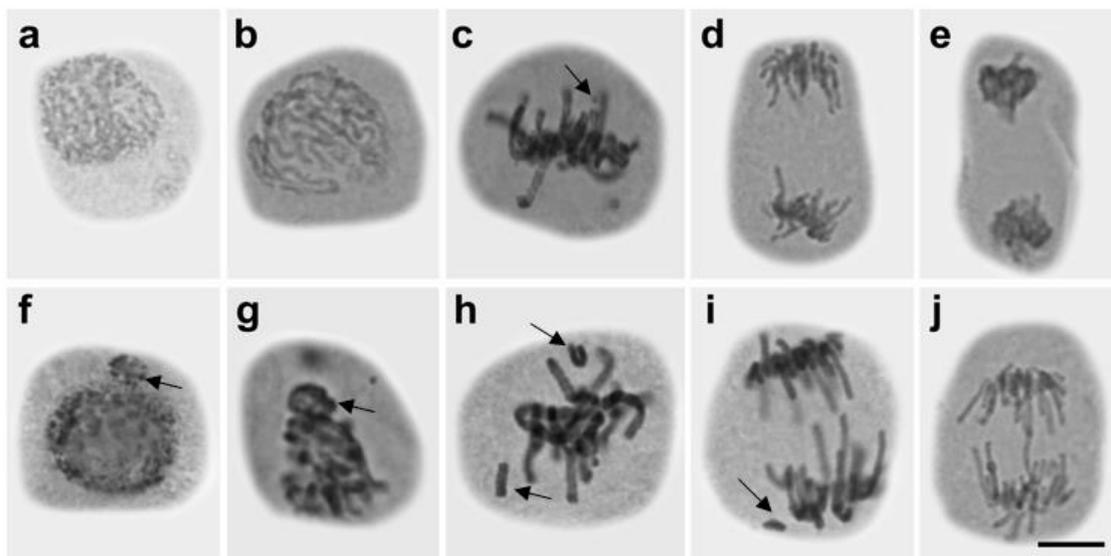


Figura 3. Células meristemáticas de *Lactuca sativa* tratadas com eugenol, ácido eugenoxiacético, guaiacol, ácido guaiacoxiacético, dicamba, solvente e glifosato. (a) interfase, (b) prófase, (c) metáfase com cromossomo fragmentado (seta), (d) anáfase, (e) telófase, (f) interfase com micronúcleo (seta), (g) broto (seta), (h) aderente com cromossomos perdidos (setas), (i) anáfase com cromossomo perdido (seta), (j) ponte.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos com as análises de fitotoxicidade e citotoxicidade foram submetidos à análise de variância e as médias foram avaliadas pelo teste de Dunnett com 5% de significância. Esse teste foi escolhido por ser o mais indicado para comparar tratamentos com controles (Bernardes et al., 2015). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GENES (Cruz, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos ácidos fenoxiacéticos

Os ácidos fenoxiacéticos obtidos (**3**) e (**4**) foram devidamente caracterizados por RMN de ^1H , os rendimentos obtidos para esses compostos foram de 53 e 63%, respectivamente. Segundo Hoan et. al. (2007), a síntese de (**3**) apresentou rendimento de 57%, sendo bem próxima da encontrada no presente estudo. Em outro trabalho, foram obtidos rendimentos reacionais variados de 52 à 85%, utilizando-se como reagentes outros tipos de fenóis e reagindo-os por 5 horas (Yan et. al., 2014). O composto (**3**) foi patenteado como um composto que pode ser usado como aditivo para conservação de alimentos, sendo considerado não tóxico e sem odor (Dinh et al., 2010).

Embora o ácido guaiacoxiacético (**4**) seja comercializado, existem na literatura mais estudos relacionados à sua degradação do que de sua obtenção, esse composto pode ser degradado por bactérias ruminantes. Chen et al. (1985), sugeriram que, bactérias anaeróbias do rúmen, podem clivar completamente a ligação do beta-ariléter, que é uma importante ligação entre os monômeros da lignina.

3.2 Fitotoxicidade

O eugenol (**1**) apresentou-se fitotóxico para ambos os modelos vegetais testados, porém o ácido eugenoxiacético (**3**) se mostrou fitotóxico apenas para alfaca. (Tabelas 1 e 2 e Figura 4). Vaid et al. (2010), observaram que 5 μL de eugenol inibiu completamente a germinação da planta daninha *Bidens pilosa*, demonstrando que esse composto também apresenta ação tóxica para planta daninha.

O guaiacol (**2**) e seu derivado semissintético (**4**) se mostraram fitotóxicos tanto para a monocotiledônea, quanto para a eudicotiledônea utilizadas neste estudo, como demonstrado nas tabelas 1 e 2. Kobayashi et al. (1994) observaram a ação antifúngica e antibactericida do produto natural guaiacol e de derivados dessa molécula. Entretanto, os testes de fitotoxicidade demonstraram baixa inibição. Diferindo assim do presente estudo, em que, mesmo em baixa concentração o guaiacol e seu derivado ácido fenoxiacético se mostraram fitotóxicos tanto para o modelo vegetal alfaca, quanto para o sorgo.

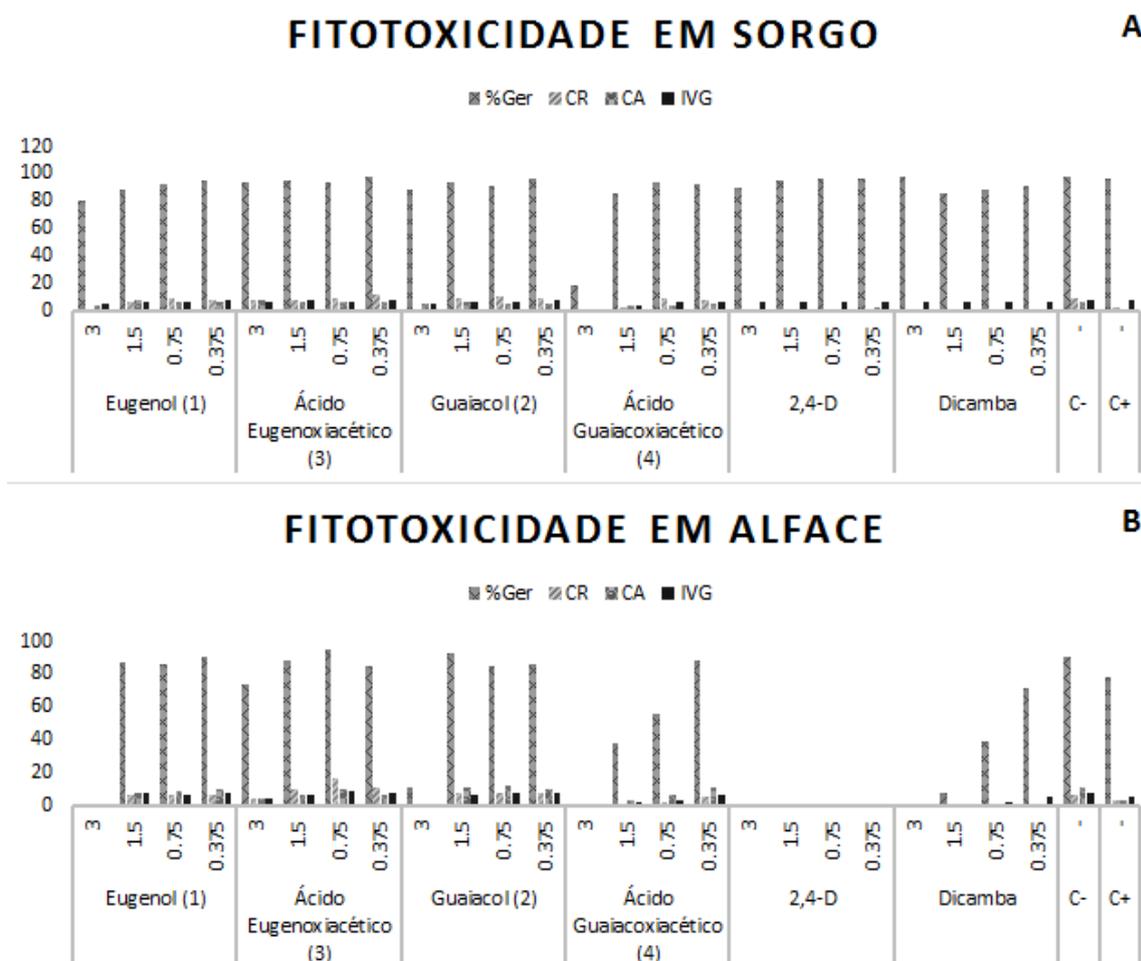


Figura 4. Fitotoxicidade das moléculas eugenol (1), guaiacol (2), ácido eugenoxiacético (3), ácido guaiacoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em sementes e plântulas: (A) *Sorghum bicolor* e (B) *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L^{-1} , avaliadas das moléculas.

A diferenciação na resposta entre os modelos vegetais usados, referente ao tratamento com o ácido eugenoxiacético (3), pode ser explicada pela proximidade química da molécula semissintética, ácido eugenoxiacético, com a molécula sintética 2,4-D. De acordo com Sbano et al. (2013) o herbicida 2,4-D é seletivo, inibindo o desenvolvimento apenas de plantas de folhas largas, desse modo, como as moléculas são quimicamente parecidas, já era esperado este mesmo padrão de seleção para o ácido eugenoxiacético.

Tabela 1. Fitotoxicidade de diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis Eugenol e Guaiacol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, frente o desenvolvimento inicial de *Sorgo bicolor*.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	%Ger	CR	CA	IVG
Eugenol (1)	3	80,80c	1,68b	4,20c	5,16c
	1,5	88,00ab	6,71a	7,35a	6,07ab
	0,75	92,00ab	8,57a	6,16a	7,13ab
	0,375	95,20ab	7,57a	6,87a	7,44ab
Ácido Eugenoxia cético (3)	3	94,40ab	7,84a	7,90a	7,00ab
	1,5	95,20ab	8,31a	6,47a	7,41ab
	0,75	93,60ab	8,86a	6,28a	7,00ab
	0,375	97,60ab	12,11c	6,42a	7,51ab
Guaiacol (2)	3	88,80ab	1,52b	5,20a	5,28c
	1,5	94,40ab	9,35a	6,71a	7,03ab
	0,75	91,20ab	10,23a	5,53a	6,79ab
	0,375	96,00ab	9,56a	5,76a	7,71ab
Ácido Guaiacoxi acético (4)	3	19,20c	0,18b	0,00c	0,00c
	1,5	85,60ab	1,98b	3,34b	4,01c
	0,75	94,40ab	8,87a	4,18c	6,72ab
	0,375	92,80ab	8,40a	4,95a	6,56ab
2,4-D	3	90,40ab	1,11c	0,48b	6,26ab
	1,5	95,20ab	0,98c	0,37b	6,55ab
	0,75	96,80ab	1,08c	1,36b	6,51ab
	0,375	96,00ab	1,52b	1,86b	6,50ab
Dicamba	3	97,60ab	0,99c	0,00b	6,57ab
	1,5	85,60c	0,93c	0,35b	6,04c
	0,75	88,80b	1,18b	0,74b	6,71ab
	0,375	91,20ab	1,43b	1,22b	6,92ab
Solvente	-	97,60a	8,68a	7,04a	7,21a
Glifosato	-	96,00b	1,77b	0,92b	7,25b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam igualdade e as seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05). Onde: %Ger representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Outro fator importante em relação ao ácido eugenoxiacético é que na concentração de 0,375mmol.L⁻¹, o mesmo promoveu o aumento do crescimento radicular no sorgo, quando comparado com o controle, além disso tal resposta também foi encontrada na alface, porém nas raízes regadas na concentração de 0,75mmol.L⁻¹ (Tabelas 1 e 2, Figura 4). Essa resposta é explicada por ser característica para substâncias auxínicas, se

assemelhando com a observada com o 2,4-D, podendo compostos dessa natureza química serem aplicados em baixas concentrações para estimular o alongamento radicular (Swarup et al., 2001).

Tabela 2. Fitotoxicidade de diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis Eugenol e Guaiacol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	%Ger	CR	CA	IVG
Eugenol (1)	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	87,20ab	6,89ab	8,06ab	7,18ab
	0,75	85,60ab	6,07ab	9,04a	6,99ab
	0,375	90,40a	6,53ab	9,70a	8,10a
Ácido Eugenoxia cético (3)	3	73,60b	4,31ab	4,06b	4,81b
	1,5	88,00ab	9,50a	6,03b	6,73ab
	0,75	94,40a	16,80c	9,48a	8,51a
	0,375	84,80ab	11,49a	6,21b	7,58ab
Guaiacol (2)	3	11,20c	0,12c	0,99b	0,48c
	1,5	92,80ab	8,13a	11,01a	6,86ab
	0,75	84,80ab	7,26a	11,66a	7,40ab
	0,375	86,40ab	8,03a	9,90a	7,86a
Ácido Guaiacoxi acético (4)	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	37,60c	0,91c	3,61b	1,67c
	0,75	56,00c	1,90b	6,92ab	2,66ab
	0,375	88,00ab	5,90a	11,23a	5,95ab
2,4-D	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	0,75	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	0,375	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
Dicamba	3	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	1,5	8,00c	0,03c	0,00c	0,40c
	0,75	39,20c	0,74c	0,10c	2,25c
	0,375	71,20b	0,75c	0,30c	5,13b
Solvente	-	90,40a	6,78a	10,94a	8,04a
Glifosato	-	77,60b	3,42b	3,53b	5,37b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam igualdade e as seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05). Onde: %Ger representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Há relatos que o eugenol apresenta ação negativa na integridade da membrana. Segundo Bainard et al. (2006), pesquisando o efeito do eugenol 1,5% v v⁻¹ em brócolis, observaram que a cera epicuticular foliar auxilia na defesa da planta contra a retenção do agente tóxico. Entretanto, tanto plantas com cera epicuticular quanto plantas sem cera epicuticular sofreram perda de peso fresco e vazamento de eletrólitos, porém em diferentes proporções.

De acordo com Stoklosa et al. (2012), o componente do óleo essencial do cravo que apresenta efeito tóxico é o eugenol, tendo ação nas membranas, promovendo o vazamento de eletrólitos, que pode ser agravado progressivamente, à medida que a planta modelo for submetida a maiores intensidades luminosas. Isso se deve pelo fato que, as baixas luminosidades auxiliam no acréscimo dos ácidos graxos da cera epicuticular e na redução do conteúdo de álcoois e ésteres primários, diminuindo a retenção do eugenol no indivíduo.

Two Koski (2002), estudando o efeito bioherbicida de vários óleos essenciais em dente de leão, observou o efeito fitotóxico do óleo essencial do cravo, cujo componente majoritário é o eugenol. Após o teste com dente de leão os autores também desenvolveram experimentos com plantas daninhas, que apresentaram injúrias, dentre elas o vazamento de íons, acarretando na morte dos indivíduos tratados com o óleo essencial nas concentrações de 5 e 10% após sete dias de exposição ao óleo.

Há relatos que o eugenol promove inibição da respiração celular, atuando na enzima ATPase. Vaid et al. (2010), estudaram o efeito do eugenol em plantas daninhas. Eles observaram que as plantas tratadas com eugenol apresentaram redução nas taxas de crescimento inicial, peso seco das plântulas, concentração de clorofilas e respiração celular. Gill e Holley (2006), concluíram que o eugenol nas concentrações de 5 ou 10mM determinou a inibição da enzima ATPase. Os autores ainda ressaltaram que essa inibição da enzima, em condições subletais, pode estar ligada à diminuição do crescimento das bactérias. Esses resultados ajudam a sustentar e explicar os resultados encontrados no presente estudo, evidenciando o efeito tóxico do eugenol frente a enzima ATPase e a respiração celular, causando diminuição da oferta de energia à célula; e as membranas celulares, provocando o vazamento de eletrólitos, o que acarreta em uma desestabilidade do potencial iônico da célula.

Além do eugenol causar declínio na germinação e crescimento inicial de plântulas, perdas na eficiência seletiva das membranas, vazamento de eletrólitos, diminuição na concentração de clorofilas e inibição da enzima ATPase, provoca o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). Segundo Ahuja et al. (2015), a exposição de raízes a diferentes concentrações de eugenol promoveu o aumento de peróxido de oxigênio, radical superóxido e do radical hidroxila. Em função desse aumento de ERO, ocorreu um aumento na quantidade de peroxidação dos bioprodutos da membrana. Entretanto, os resultados encontrados pelos autores demonstraram que a maquinaria enzimática antioxidante não foi danificada, pelo contrário, a quantidade dessa classe de enzimas aumentaram, o que mostra a plasticidade da planta ativando sua defesa metabólica, contra as injúrias sofridas.

3.3 Citotoxicidade

As células meristemáticas das raízes tratadas com eugenol $1,5\text{mmol.L}^{-1}$, com guaiacol (**2**) 3mmol.L^{-1} e ácido guaiacoxiacético (**4**) $1,5\text{mmol.L}^{-1}$, apresentaram diminuição do IM e aumento das AN; as células tratadas com eugenol na concentração de $0,75\text{mmol.L}^{-1}$ também apresentaram aumento nas AN (Tabela 3 e Figura 5). Trabalhos realizados com ovos de ouriços, mostraram a atividade anti-inflamatória e citotóxica do guaiacol (Kobayashi et al., 1994). O IM é uma variável muito utilizada em teste de citotoxicidade, por se tratar de uma variável bastante plástica, podendo aumentar ou diminuir (Pinheiro et al., 2015). O IM pode aumentar, acompanhado da elevação no número de AC, ou seja, ocorre a presença de mais células em processo de divisão mitótica. Porém, tais células não estão saudáveis, o que promove a geração de células filhas mutantes e defeituosas. O processo de morte celular, desencadeado pelo reconhecimento, da célula, aos danos celulares provocados pelo ambiente, pode provocar a diminuição do IM (Pinheiro et al. 2015).

O processo de morte celular pode ser observado, a partir da presença de núcleos condensados, classificados como um tipo de AN (Andrade et al. 2008; Bernardes et al 2015; Pinheiro et al. 2015). Essas AN reduziram o crescimento em meristemas de raízes tratadas com guaiacol, ácido guaiacoxiacético, eugenol, ácido eugenoxiacético e com os herbicidas sintéticos glifosato e dicamba. É importante ressaltar que no tratamento com guaiacol, 3mmol.L^{-1} , a quantidade de AN se igualou com a do controle positivo glifosato, demonstrando a toxicidade das moléculas teste.

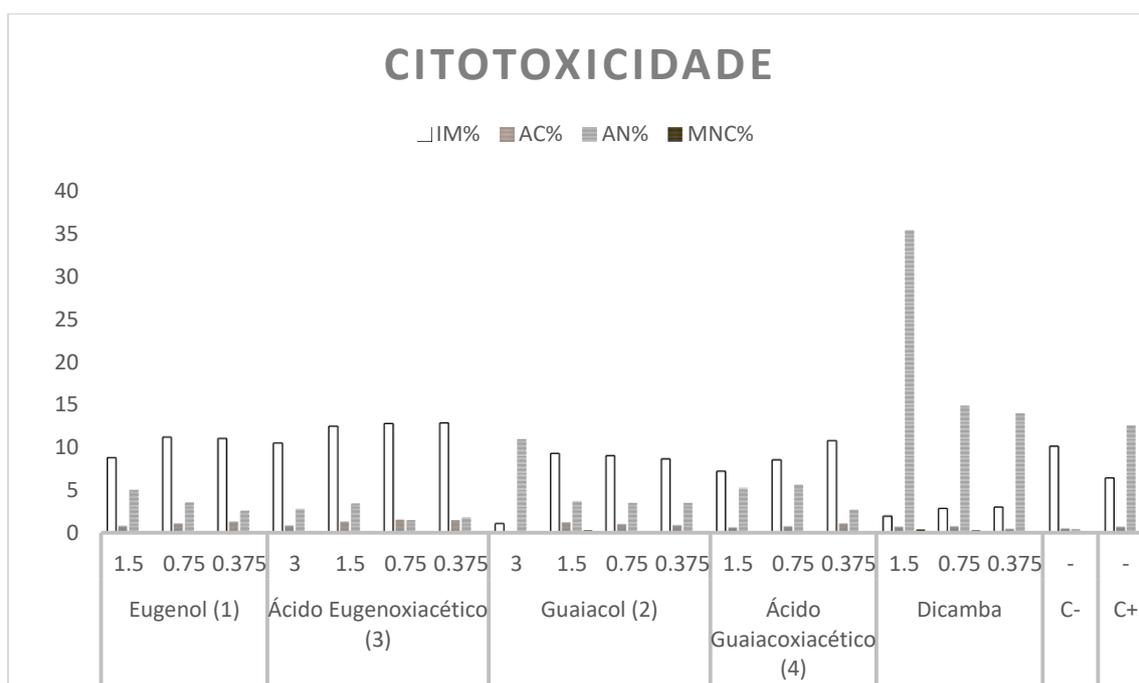


Figura 5. Efeito citotóxico das moléculas eugenol (1), Guaiacol (2), Ácido Eugenol (3), Ácido Guaiacoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L⁻¹, avaliadas das moléculas.

Apesar da observação de MN, a AN mais frequente nos tratamentos foi na forma de núcleos condensados. Babich et al. (1993), relataram que o eugenol causou peroxidação nas células humanas e de ratos. Tais mecanismos de ação determinaram na morte das células do estudo, já que a peroxidação de membranas induz a célula à apoptose (Anazetti e Melo, 2007). Dessa forma, danos a membrana podem ter contribuído para a apoptose.

O guaiacol (2) também apresenta capacidade de romper a parede celular de bactérias, causando vazamento de metabólitos, além de inibir a biossíntese de prostaglandinas, conferindo ao guaiacol um efeito anti-inflamatório (Kasugai et al., 1991). Assim, a atividade citotóxica do guaiacol pode estar relacionada com sua ação sobre as paredes celulares que culmina na perda de moléculas essenciais.

Kasugai et al. (1991), estudando os efeitos citotóxicos de diferentes compostos fenólicos, testou o guaiacol em células da linhagem RPC-C2A (linhagem de células obtidas da polpa dentária de ratos, com alta atividade de crescimento). Os autores observaram que conforme ocorria o aumento na concentração de guaiacol aplicada nas

células, os efeitos de toxicidade também aumentavam. A razão para a não ocorrência de diferença significativa nas AN no presente estudo, pode ser, por esse efeito não ser tão forte em baixas concentrações. Dessa forma, apenas as células meristemáticas tratadas com guaiacol, 3mmol.L^{-1} , apresentaram aumento nas AN.

Markowitz et al. (1992), relataram o efeito citotóxico de eugenol (**1**) para células de mamíferos, onde células com curto período de exposição a esse composto na concentração de 10^{-2}mol.L^{-1} e células expostas por um longo período a concentração 10^{-3}mol.L^{-1} morreram. Esse resultado corrobora com os valores do IM observado nesta pesquisa, onde foi encontrada uma redução no número de células em divisão.

Soloneski et al. (2016), avaliando o efeito genotóxico, em *Rhinella arenarum*, dos mesmos herbicidas estudados no presente estudo, relataram um significativo aumento no índice de danos genéticos. Corroborando com o efeito tóxico das moléculas avaliadas no presente estudo, já que houve semelhança nos resultados.

Também observou-se a presença de AC (Figura 3) nas células meristemáticas das raízes tratadas com eugenol e principalmente pelo ácido eugenoxiacético (**3**). Esse tipo de alteração pode ser provocada por agentes genotóxicos que entram em contato com as células, causando danos na divisão mitótica (Leme e Marin-Morales, 2009). Tal efeito já foi relatado por Jeng et al. (1994), que pesquisando o efeito do eugenol em fibroblastos humanos, relataram a genotoxicidade do eugenol nesse tipo de célula.

No presente estudo as AC mais frequentes foram cromossomos aderentes (Figura 3.h) e fragmentação cromossômica (Figura 3.c), como demonstrado na figura 6. Os cromossomos aderentes foram observados tanto em células tratadas com guaiacol (**2**) e eugenol (**1**) quanto em células tratadas com seus derivados ácidos fenoxiacéticos (**3** e **4**). A presença de cromossomos aderentes pode se relacionar com a atividade aneugênica das moléculas teste, quando esses compostos atuam na célula, de maneira, a inibir a polimerização e despolimerização das fibras do fuso mitótico (Fernandes et al. 2009). Entretanto, tal alteração também pode indicar ação clastogênica do agente, pois interfere na matriz proteica desencadeando quebras cromossômicas (Fernandes et al. 2009).

Tabela 3. Parâmetros das divisões mitóticas de *Lactuca sativa* tratada com diferentes concentrações (mmol.L⁻¹) dos fenóis Eugenol e Guaiacol e seus derivados ácido fenoxiacético semissintéticos. Onde: IM% porcentagem do índice mitótico, AC% representa a porcentagem de alterações cromossômicas por total de células, AN% porcentagem de alterações nucleares por total de células, MNC% porcentagem de micronúcleos por total de células, Perdido% porcentagem de cromossomos perdidos por células em divisão, Frag% porcentagem de fragmentos cromossômicos por células em divisão, Aderente% porcentagem de cromossomos aderentes por células em divisão, C-Met% porcentagem de c-metáfases por células em divisão, Ponte% porcentagem de pontes por células em divisão e C-Poli% porcentagem de poliploidização cromossômica por células em divisão.

Moléculas	mmol.L ⁻¹	IM%	AC%	AN%	MNC%	Perdido%	Frag%	Aderente %	C-Met%	Ponte%	C-Poli%
Eugenol (1)	1,5	8,74a	0,75ab	5,09c	0,02ab	0,10ab	0,14ab	0,38ab	0,00ab	0,10ab	0,02ab
	0,75	11,13a	1,02ab	3,60c	0,08ab	0,08ab	0,02ab	0,50ab	0,12ab	0,22a	0,00ab
	0,375	10,95a	1,18b	2,62a	0,08ab	0,02ab	0,12ab	0,70b	0,14ab	0,12ab	0,00ab
Ácido Eugenoxia cético (3)	3	10,43a	0,78ab	2,83a	0,04ab	0,02ab	0,06ab	0,42ab	0,10ab	0,16ab	0,00ab
	1,5	12,38c	1,18b	3,43c	0,06ab	0,12ab	0,09ab	0,70b	0,09ab	0,12ab	0,00ab
	0,75	12,67c	1,38c	1,51a	0,18ab	0,08ab	0,08ab	0,69b	0,13ab	0,22a	0,00ab
	0,375	12,76c	1,36c	1,82a	0,12ab	0,10ab	0,30c	0,48ab	0,24ab	0,12ab	0,00ab
Guaiacol (2)	3	1,14c	0,02a	11,00b	0,02ab	0,00ab	0,00ab	0,00a	0,00ab	0,00ab	0,00ab
	1,5	9,23a	1,11b	3,75a	0,27ab	0,13ab	0,06ab	0,53b	0,08ab	0,04ab	0,00ab
	0,75	8,98a	0,94ab	3,50a	0,10ab	0,14ab	0,02ab	0,44b	0,10ab	0,14a	0,00ab
Ácido Guaiacoxi acético (4)	0,375	8,59a	0,84ab	3,53a	0,00ab	0,10ab	0,04ab	0,60b	0,02ab	0,06ab	0,02ab
	1,5	7,19b	0,60ab	5,28c	0,00ab	0,10ab	0,12ab	0,28ab	0,02ab	0,06ab	0,02ab
	0,75	8,48a	0,73ab	5,70c	0,15ab	0,00ab	0,06ab	0,36ab	0,12ab	0,04ab	0,00ab
Dicamba	0,375	10,71a	1,02ab	2,78a	0,04ab	0,08ab	0,22ab	0,50b	0,10ab	0,08ab	0,00ab
	1,5	2,00c	0,68ab	35,38c	0,32ab	0,06ab	0,06ab	0,20ab	0,04ab	0,00ab	0,00ab
	0,75	2,90c	0,70ab	14,90b	0,28ab	0,04ab	0,06ab	0,16ab	0,12ab	0,04ab	0,00ab
Solvente	0,375	3,02c	0,44ab	13,98b	0,08ab	0,06ab	0,08ab	0,12ab	0,08ab	0,02ab	0,00ab
	-	10,06a	0,47a	0,45 a	0,00a	0,10a	0,06a	0,14a	0,10a	0,06a	0,00a
Glifosato	-	6,41b	0,68b	12,62b	0,10 b	0,04 b	0,06b	0,42b	0,06b	0,00b	0,00b

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste.

Esse efeito é irreversível, assim, uma vez que ocorre a quebra de cromossomos ou que é impedida a atuação do fuso mitótico, os cromossomos não poderão se dividir de forma correta para a formação de duas células filhas idênticas à célula mãe (Fernandes et al. 2007; Andrade et al. 2008; Fernandes et al. 2009; Andrade et al. 2010; Andrade-Viera et al. 2014; Aragão et al. 2015; Bernardes et al. 2015).

A fragmentação cromossômica (Figura 3.c) foi observada apenas nas células tratadas com eugenol e ácido eugenoxiacético, permitindo considerar tal mutação como evidência de quebras cromossômica, associadas à cromossomos aderentes (Figura 3.h), decorrente do efeito clastogênico dessas moléculas (Andrade et al. 2008; Bernardes et al. 2015).

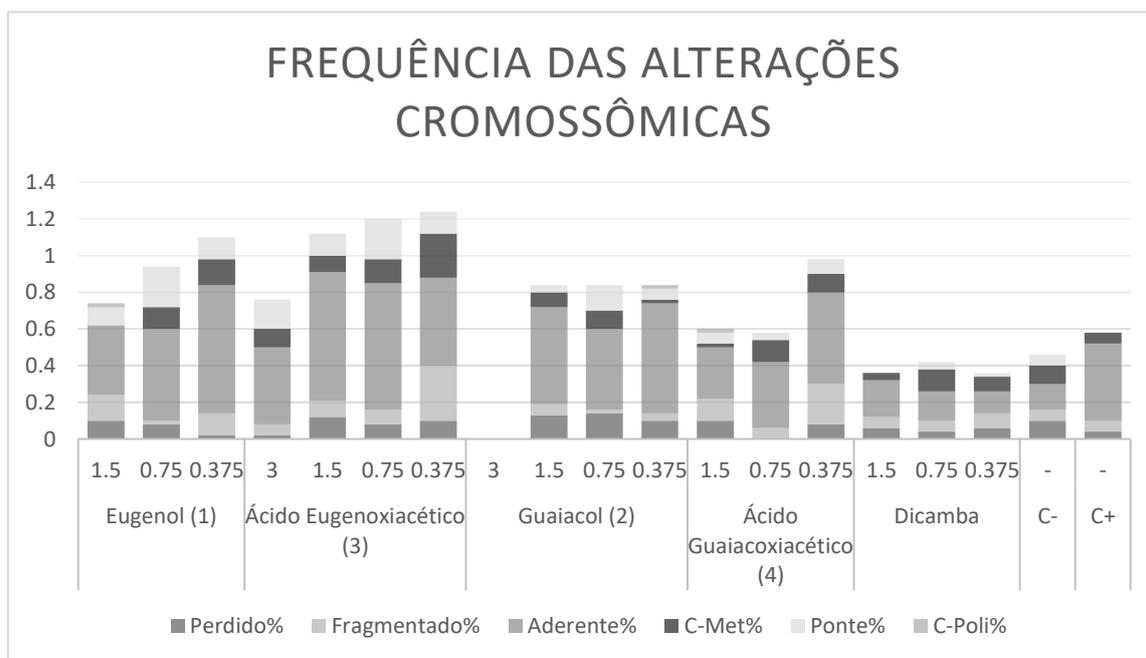


Figura 6. Frequência das alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* tratadas com eugenol (1), Guaiacol (2), Ácido Eugenol (3), Ácido Guaiacoxiacético (4), dicamba, solvente (C-) e glifosato (C+), testados em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Os números na legenda da figura representam as concentrações, em mmol.L^{-1} , avaliadas das moléculas.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o eugenol, o guaiacol e seus respectivos ácidos fenoxiacéticos, apresentam atividades fitotóxica e citotóxica. Entretanto, o ácido eugenoxiacético foi seletivo na inibição da alface que possui folha larga, semelhantemente ao herbicida

comercial 2,4-D, tornando-o um composto de escolha como bioherbicida seletivo.

Tanto o eugenol quanto o guaiacol possuem efeito aneugênico, demonstrando sua atuação no fuso mitótico. Entretanto, o eugenol e o ácido eugenoxiacético também apresentaram efeito clastogênico, promovendo danos diretamente no DNA do organismo.

5. REFERÊNCIAS

- Ahuja, N., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K., 2015. Eugenol-inhibited root growth in *Avena fatua* involves ROS-mediated oxidative damage. *Pesticide biochemistry and physiology*, 118, 64-70.
- Anazetti, M. C., & Melo, P. S., 2007. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa*, 1(1), 37-58.
- Andrade, L. F., Campos, J. M. S., & Davide, L. C., 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(3), 706-710.
- Andrade, L. F., Davide, L. C., & Gedraite, L. S., 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25, 626-631.
- Andrade-Vieira, L. F.; Botelho, C.M.; Palmieri, M.J.; Laviola, B.G; Praça-Fontes, M.M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays, 2014. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)*, 86, 373-382.
- Aragão, F. B., Palmieri, M. J., Ferreira, A., Costa, A. V., Queiroz, V. T., Pinheiro, P. F., & Andrade-Vieira, L. F., 2015. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, 35(2), 259-272.
- Aras, S., Aydin, S.S., Körpe, D.A., Dönmez, C., 2012. Comparative Genotoxicity Analysis of Heavy Metal Contamination in Higher Plants. In: Dr. Ghousia Begum (Ed.), *Ecotoxicology*, ISBN: 978-953-51-0027-0, InTech, DOI: 10.5772/30073.
- Babich, H., Stern, A., & Borenfreund, E., 1993. Eugenol cytotoxicity evaluated with continuous cell lines. *Toxicology in vitro*, 7(2), 105-109.
- Bainard, L. D., Isman, M. B., & Upadhyaya, M. K., 2006. Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol and the role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to these essential oils. *Weed science*, 54(5), 833-837.
- Barbosa, L. D. A., 2004. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV, 215.
- Bernardes, P. M., Andrade-Vieira, L. F., Aragão, F. B., Ferreira, A., & da Silva Ferreira, M. F., 2015. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(7), 207.
- Chen, W., Supanwong, K. A. M. N. I. R. D., Ohmiya, K., Shimizu, S., & Kawakami, H., 1985. Anaerobic degradation of veratrylglycerol-beta-guaiacyl ether and guaiacoxycetic acid by mixed rumen bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 50(6), 1451-1456.
- Cruz, C.D., 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy (Online)*, 35, 271-276.
- Delaney, J., Clarke, E., Hughes, D., & Rice, M., 2006. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery?. *Drug discovery today*, 11(17), 839-845.
- Dinh, N. H., Huan, T. T., Toan, D. N., Kimpende, P. M., & Van Meervelt, L., 2010. Isolation, structure, and properties of quinone-acid tautomer of a phenol-nitro compound related to eugenoxycetic acid. *Journal of Molecular Structure*, 980(1), 137-142.
- Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G.,

- ... & Sheriff, R. (2002). Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticides list. *The Lancet*, 360(9340), 1163-1167.
- Fernandes, T. C., Mazzeo, D. E. C., & Marin-Morales, M. A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252-259.
- Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C., & Marin-Morales, M. A. (2009). Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(6), 1680-1686.
- Gill, A. O., & Holley, R. A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 111(2), 170-174.
- Grant, W. F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), 175-185.
- Hoan, P. V.; Trung, V. Q.; Que, L. X., 2007. Synthesis and study on the corrosion inhibition of some eugenol derivatives. *Journal of Chemistry*, v.45, p.145-149.
- Jeng, J. H., Hahn, L. J., Lu, E. J., Wang, Y. J., & Kuo, M. Y. P., 1994. Eugenol Triggers Different Pathobiological Effects on Human Oral Mucosal Fibroblasts 1. *Journal of dental research*, 73(5), 1050-1055.
- Kasugai, S., Hasegawa, N., & Ogura, H., 1991. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. *Journal of dental research*, 70(2), 127-130.
- Kobayashi, A., Koguchi, Y., Kanzaki, H., Kajiyama, S. I., & Kawazu, K., 1994. Production of a new type of bioactive phenolic compound. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(1), 133-134.
- Kudsk, P., & Streibig, J. C., 2003. Herbicides—a two-edged sword. *Weed Research*, 43(2), 90-102.
- Li, J., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Li, Y., Shan, W., & Zheng, Y., 2011. Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on wheat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 56-63.
- Lyubenova, M., Dineva, S., Georgieva, N., Miteva, T., Karadjova, I., Parvanova, P., 2012. Ecotoxicological assessment modelo f cultural plant-soil complex treated with waste water. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26 (2): 2883-2893.
- Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., & Kim, S., 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: a clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 73(6), 729-737.
- Mazumder, B. B., Nakgawa-izumi, A., Kuroda, K. I., Ohtani, Y., & Sameshima, K. (2005). Evaluation of harvesting time effects on kenaf bast lignin by pyrolysis-gas chromatography. *Industrial Crops and Products*, 21(1), 17-24.
- Miranda, C. A. S. F.; Cardoso, M. G.; Carvalho, M. L. M.; Machado, S. M. F.; Gomes, M. S.; Santiago, J. A.; Teixeira, M. L., 2015. Atividade Alelopática de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais na Germinação e Vigor de Aquênios de Alface. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.3, p.1783-1798.
- Ozagac, M., Bertino-Ghera, C., Uzio, D., Rivallan, M., Laurenti, D., & Geantet, C. (2016). Impact of guaiacol on the formation of undesired macromolecules during catalytic hydroconversion of bio-oil: A model compounds study. *Biomass and Bioenergy*, 95, 194-205.
- Pelissari, G. P., Pietro, R. C. L. R., Moreira, R. R. D., 2010. Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC, Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.1, p.70-74.

- Pereira, M.P., Pereira, F.J., Rodrigues, L.C.A., Barbosa, S., de Castro, E.M., 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@mbiente On-line* 1 (7): 36-43.
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. D. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... & Fontes, M. M. P., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(41), 8981-8990.
- Ribeiro, M. L., Lourencetti, C., Pereira, S. Y., & de Marchi, M. R. R., 2007. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Química Nova*, 30(3), 688.
- Rowshan, V., Farhadi, F., & Najafian, S., 2014. The essential oil of *Dodonaea viscosa* leaves is allelopathic to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, 56, 241-245.
- Sbano, A.; Ferreira, J.V.R.; Peckle, B.A.; Macrae, A.; Direito, I.C.N., 2013. Otimização de Método Cromatográfico para Quantificação do Herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *Acta Scientia & Technicae*, v.1, n.2, p.37-46.
- Silva, A. D., Silva, J. D., 2007. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 189-248.
- Soloneski, S., de Arcaute, C. R., & Larramendy, M. L., 2016. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867)(Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17811-17821.
- Souza Filho, A. P. S., Santos, R. A., Santos, L. S., Guilhon, G. M. P., Santos, A. S., Arruda, M. S. P., ... & Arruda, A. C., 2006. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. *Planta daninha*, 24(4), 649-656.
- Stokłosa, A., Matraszek, R., Isman, M. B., & Upadhyaya, M. K., 2012. Phytotoxic activity of clove oil, its constituents, and its modification by light intensity in broccoli and common lambsquarters (*Chenopodium album*). *Weed science*, 60(4), 607-611.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., & Bennett, M., 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & development*, 15(20), 2648-2653.
- Tworkoski, T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed science*, 50(4), 425-431.
- Vaid, S., Batish, D. R., Singh, H. P., & Kohli, R. K., 2010. Phytotoxic effect of eugenol towards two weedy species. *The Bioscan*, 5(3), 339-341.
- Yan, D., Xiang, Y., Li, K., Chen, Y., Yang, Z., & Guo, D., 2014. Synthesis, characterization and properties of 1, 2, 4-triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazole derivatives and their europium complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1074, 487-495.