

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA ROBERTO

**POTENCIAL FITOGENOTÓXICO DO TIMOL E ÁCIDO TIMOXIACÉTICO EM
MONOCOTILEDÔNEAS E EUDICOTILEDÔNEAS**

ALEGRE

2018

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA ROBERTO

**POTENCIAL FITOGENOTÓXICO DO TIMOL E ÁCIDO TIMOXIACÉTICO EM
MONOCOTILEDÔNEAS E EUDICOTILEDÔNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

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

ALEGRE

2018

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

R642p Roberto, Carlos Eduardo de Oliveira, 1992-
Potencial fitogenotóxico do timol e ácido timoxiacético em monocotiledôneas e eudicotiledôneas / Carlos Eduardo de Oliveira Roberto. - 2018.
58 f. : il.

Orientador: Taís Cristina Bastos Soares.

Coorientador: Patrícia Fontes Pinheiro.

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

1. Herbicidas - Toxicologia. 2. Plantas daninhas. 3. Testes de toxicidade. 4. Marcadores genéticos. I. Soares, Taís Cristina Bastos. II. Pinheiro, Patrícia Fontes. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

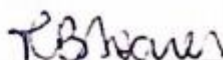
Elaborado por Claudia Regina da Rocha Oliveira – CRB-6 ES-576/O

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA ROBERTO

**POTENCIAL FITOGENOTÓXICO DO TIMOL E ÁCIDO TIMOXIACÉTICO EM
MONOCOTILEDÔNEAS E EUDICOTILEDÔNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Aprovada em 13 de Julho de 2018.



Profª Drª Taís Cristina Bastos Soares

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - UFES

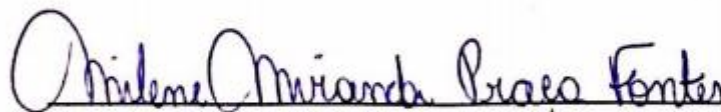
Orientadora



Prof. Dr. José Carlos Lopes

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - UFES

Membro do Programa



Profª Drª Milene Miranda Praça Fontes

Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento - UFES

Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por minha vida, pela saúde, por conceder todas as oportunidades e a convivência com pessoas mais que especiais durante essa trajetória;

Aos meus pais, Heverton e Rosângela, por serem os maiores patrocinadores e incentivadores dos meus sonhos;

A UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal por possibilitar a realização do curso de mestrado;

A CAPES, pelo apoio financeiro, pela concessão da bolsa de pesquisa:

À professora Taís Cristina Bastos Soares, pelo acolhimento e honra da orientação, por todo o apoio, estímulo e auxílio durante as etapas desse trabalho;

À minha irmã Jéssica, por todo amor e cumplicidade dedicados na nossa “republica”;

Aos meus familiares, em especial aos meus avós Evilasio e Rosa, por todo apoio, confiança e ensinamentos de vida;

Ao professor José Carlos Lopes, pela prontidão de sempre, por compor a banca e acrescentar imensamente minha trajetória na universidade, com suas experiências e ensinamentos profissionais e pessoais;

Em especial, aos colegas Josimar, Rodrigo Lorenzoni e Thammyres, pela proatividade, pelas dicas, conselhos, paciência e amizade no decorrer de todas as etapas deste trabalho;

À professora Patrícia, por me coorientar, por compartilhar suas ideias e por estimular a realização desse trabalho;

À Professora Milene, pela oportunidade com trabalhos paralelos, por toda ajuda na execução do experimento, por ceder a casa de vegetação para execução e por compor a banca agregando com seus conhecimentos;

Aos meus amigos Carla e Pedro, por todo apoio, cumplicidade e paciência nessa fase final e pelos inúmeros momentos de família em Alegre;

Aos amigos Francisco Davi, Lorena de Paula e Patrícia Valente, irmãos que ganhei no mestrado e que vou levar para vida, obrigado pela amizade e parceria!

A toda equipe do Bqmol: Yumi Adelson, Lucimara, Rodrigo's, Liliana, Conceição, Ramon, Davi, Edilson, Cássio, Carla e Fran, pelo apoio e companheirismo, vocês são os melhores!

Ao Trio fantástico, meus amigos de alma: Davi, Paola e Polyana França por todo apoio e pelo amor incondicional;

Aos demais amigos especiais: Amanda Ceccon, Gabriel, Gilmar Ferreira e Rodrigo Zoco por todas as experiências vividas e por tornarem meus dias mais felizes;

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela dedicação e contribuição para minha formação acadêmica;

A todos os amigos que fiz nessa trajetória em Alegre, por tornarem esses anos inesquecíveis;

Gratidão eterna a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse alcançar esse objetivo!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Setor Agrícola no Brasil e uso dos Agrotóxicos.....	1
1.2. Agrotóxicos e Impasses ambientais.....	2
1.3. Herbicidas Convencionais e Resistência de plantas.....	5
1.4. Obtenção de Bio-herbicidas a partir de compostos naturais.....	8
1.5. Timol e Ácido Timoxiacético.....	9
1.6. Características das plantas usadas nos bioensaios.....	11
1.6.1. <i>Amaranthus viridis</i> L. ou caruru.....	11
1.6.2. <i>Cucumis sativus</i> ou pepino.....	12
1.6.3. <i>Eleusine indica</i> ou capim pé-de-galinha.....	12
1.6.4. <i>Lactuca sativa</i> ou Alface.....	13
1.6.5. <i>Sorghum bicolor</i> ou sorgo forrageiro.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Local do experimento.....	15
3.2. Material Vegetal.....	15
3.3. Procedimentos Experimentais Gerais.....	15
3.4. Avaliação da fitotoxicidade.....	16
3.4.1. Condutividade Elétrica e Lixiviação de Potássio.....	17
3.5. Avaliação da genotoxicidade.....	17
3.6. Análises Estatísticas.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Fitotoxicidade.....	19
4.2. Genotoxicidade.....	31
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Uso de agrotóxicos por tipo no Brasil.....	3
Figura2. Estrutura química do composto glifosato.	4
Figura 3. Aumento global de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas	8
Figura 4. Estrutura química do fenól natural timol e de seu derivado semissintético ácido timoxiacético.....	10
Figura 5. Plântula de alface sadia e normal no controle com água e plântula anormal com indícios de morte provocada pelo ácido timoxiacético após 2 dias de exposição.....	20
Figura 6. Plântula de pepino sadia e normal e plântula anormal com redução na raiz, queima na folha, necrose da radícula, ausência de pelos absorventes e parte aérea pouco desenvolvida, provocada pelo ácido timoxiacético após 21 dias de exposição.....	24
Figura 7. Plântulas de sorgo sob efeitos semelhantes provocados pelo herbicida comercial glifosato e ácido timoxiacético com 4 dias de exposição.....	27
Figura 8. Redução do IVG das 5 espécies estudadas e sua relação com o aumento da condutividade elétrica e lixiviação de potássio dessas sementes.....	30
Figura 9. Agrupamento UPGMA das espécies eudicotiledôneas utilizando primers ISSR.....	34
Figura 10. Agrupamento UPGMA das espécies monocotiledôneas utilizando primers ISSR.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico dos relatos da ocorrência de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil, segundo critérios da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas.....	7
Tabela 2. Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético no desenvolvimento inicial de plântulas de alface em pré e pós- emergência.....	19
Tabela 3. Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético no desenvolvimento inicial de plântulas de caruru em pré e pós- emergência.....	21
Tabela 4. Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético no desenvolvimento inicial de plântulas de pepino em pré e pós- emergência.....	22
Tabela 5. Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético no desenvolvimento inicial de plântulas capim-pé-de-galinha em pré e pós- emergência.....	25
Tabela 6. Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético no desenvolvimento inicial de plântulas de sorgo em pré e pós- emergência.....	26
Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre o índice de velocidade de germinação (IVG), Condutividade elétrica (CE) e lixiviação de potássio (LK) das sementes.	29

RESUMO

Dentre os diferentes compostos alelopáticos, de fácil obtenção, destaca-se o timol (fenol natural), que pode originar o seu respectivo derivado semissintético, o ácido timoxiacético. Essas moléculas têm sido estudadas, e ambas apresentam fitotoxicidade e genotoxicidade, inibem o desenvolvimento inicial de plântulas mono e eudicotiledôneas, e causam alterações no DNA dos indivíduos expostos a esses componentes testes. Assim, neste trabalho, objetivou-se dar continuidade aos estudos das moléculas timol e ácido timoxiacético como possíveis bio-herbicidas, avaliando o efeito desses dois compostos, na concentração de 3 mmol L⁻¹ no período de pré e pós-emergência de cinco espécies, sendo três eudicotiledôneas (*Amaranthus viridis* L., *Cucumis sativus* L. e *Lactuca sativa* L. e duas monocotiledôneas (*Eleusine indica* L. e *Sorghum bicolor* L.), no desenvolvimento inicial de plântulas e nas alterações no DNA. O timol e o ácido timoxiacético promovem atividades fitotóxica e genotóxica. No entanto, o efeito tóxico do ácido timoxiacético é efetivo em pré-emergência e do timol em pós-emergência. Observou-se redução nos parâmetros de fitotoxicidade – índice de velocidade de germinação e crescimento radicular com grande relação do aumento da lixiviação de potássio. Essas moléculas promovem também danos na raiz e parte aérea observados nas alterações em nível de DNA das monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Há similaridade de fitotoxidez entre as alterações provocadas nas plantas tratadas com o herbicida glifosato e as moléculas teste timol e ácido timoxiacético. O efeito bio-herbicida das moléculas do timol e do ácido timoxiacético exacerba a redução de custos da produção agrícola, bem como a redução do impacto ambiental causado pelo uso desordenado e crescente de agrotóxicos.

Palavras-chave: Bio-herbicidas, plantas daninhas, fitotoxicidade, ISSR.

ABSTRACT

Among the different allelopathic compounds, easy to obtain, there is the thymol (natural phenol), which may originate its respective semisynthetic derivative, thyminoxyacetic acid. Both molecules studied, present phytotoxicity and genotoxicity, inhibiting the initial development of monocotyledons and eudicotyledonous seedlings, and causing changes in the DNA of individuals exposed to these test components. The aim of this work was to continue the studies of the thymol and thimoxyacetic acid molecules as possible herbicides, evaluating the effect of these two compounds, in the concentration of 3 mmol L⁻¹ in the pre and post-emergence period of five species: three eudicots (*Amaranthus viridis* L., *Cucumis sativus* and *Lactuca sativa* L.) and two monocotyledons (*Eleusine indica* and *Sorghum bicolor*), on initial seedling development and on DNA changes. Thymol and thyminoxyacetic acid promote phytotoxic and genotoxic activities. However, the toxic effect of thimoxyacetic acid is effective in pre-emergence and post-emergence thymol. It was observed a reduction in the phytotoxicity parameters - rate of germination speed and root growth with a great relation of the increase of potassium leaching. These molecules also promote root and shoot damage observed in the DNA-level changes of monocotyledons and eudicotyledonous. There is similarity of phytotoxicity between the alterations provoked in the plants treated with the herbicide glyphosate and the molecules test thymol and thimoxyacetic acid. The bioherbicidal effect of thymol and thimoxyacetic acid molecules exacerbates the reduction of costs of agricultural production as well as the reduction of environmental impact caused by the disorderly and growing use of agrochemicals.

Keywords: Bioherbicides, weeds, phytotoxicity, ISSR.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Setor Agrícola no Brasil e uso dos Agrotóxicos

Desde 2008, o Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking* mundial de consumo de agrotóxicos. Enquanto, nos últimos dez anos o mercado mundial desse setor cresceu 93%, no Brasil, esse crescimento foi de 190%, tendo a venda de agrotóxicos no mercado interno um salto de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões entre os anos de 2001 e 2008, alcançando valores recordes de US\$ 10 bilhões em 2013, ficando o Brasil na frente dos Estados Unidos (US\$ 7,3 bilhões) e China (US\$ 4,8 bilhões) (BOMBARDI, 2017).

Ao longo dos anos, vem ocorrendo um aumento da demanda por alimentos e intenso crescimento das exportações de alguns produtos do agronegócio como a soja, elucidando o progresso no setor agrícola do Brasil (CASTILLO et al., 2016). Tal fato está diretamente relacionado com o aumento no consumo de agrotóxicos, e é devido principalmente, à transformação de produtos da agricultura como a cana, o milho e a soja em energia (BOMBARDI, 2012). Segundo BOMBARDI (2017), a maior parte da venda de agrotóxico está relacionada ao cultivo de soja (52%), cana (10%), milho (10%) e outros cultivos (28%). Existe ainda uma grande perspectiva do crescimento, tanto na produtividade quanto em áreas agrícolas cultivadas no Brasil, para os próximos anos e entre os principais fatores associados a essa expansão está o uso de fertilizantes e de agrotóxicos (FERREIRA, 2015).

A partir da década de 40 iniciou-se o período do uso de herbicidas sintéticos, com a descoberta dos herbicidas auxínicos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e o ácido 4- cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA), sendo esses agrotóxicos os mais utilizados no campo mundialmente. Esses herbicidas são seletivos e inovaram o comércio de agroquímicos, desde então inúmeras substâncias químicas passaram a ser utilizadas para o manejo de espécies daninhas, proporcionando um aumento na produtividade e redução de custos em áreas cultivadas (YANG; ZHU, 2013).

No Brasil, a utilização dos agroquímicos expandiu-se na década de 70, e a partir de então o uso desses produtos químicos foi difundido em todo o país (ARAÚJO et al., 2007). Dentre os agrotóxicos comumente utilizados, os herbicidas

são os mais empregados no consumo interno e representam em média 45% dos custos com esses produtos em diversos cultivos (ANVISA, 2012).

No ano de 2002, estavam disponíveis para o agricultor brasileiro 2.011 agrotóxicos formulados com registro no Ministério da Agricultura, dentre eles 655 eram herbicidas e 556 inseticidas, para o controle de plantas daninhas e pragas, respectivamente (SINDAG, 2005). Existem no comércio brasileiro pouco mais de 200 marcas disponíveis de herbicidas (SILVA; SILVA, 2007). Enquanto diversos tipos de agrotóxicos foram abolidos de uso em alguns países, há mais de uma década, como é o caso da União Europeia, no Brasil o número de agrotóxicos de uso permitido só aumenta (BOMBARDI, 2017).

Os componentes ativos mais utilizados na classe dos herbicidas no Brasil são o glifosato, que representa 63% do uso, o 2,4-D com 11%, a atrazina correspondente a 10% e outros herbicidas disponíveis totalizam 16% (OLIVEIRA, FAVARETO; ANTUNES, 2013). Esses herbicidas, somados a tecnologia no cultivo, a utilização de sementes de alta qualidade e vigor, mecanização e manejo da fertilização, têm o propósito de otimizar o setor agrícola e acentuar a produtividade (ALVES; TEDESCO, 2016). No entanto, podem apresentar um encadeamento de inúmeros problemas ambientais (CABRERA et al., 2008).

1.2. Agrotóxicos e Impasses ambientais

Os agrotóxicos são aplicados no campo, frequentemente, no período de pré e pós-colheita das lavouras, principalmente nas culturas de soja, milho e cana-de-açúcar. Dentre esses produtos, os herbicidas utilizados para o controle de plantas espontâneas destacam-se por representar 61,2% do total dos agrotóxicos utilizados no Brasil (Figura 1) (BOMBARDI, 2017).

Embora o objetivo seja proporcionar aumento na produtividade, os principais herbicidas aplicados no campo são compostos sintéticos com alta atividade biológica. Em sua grande maioria, são produtos tóxicos, podendo ocasionar câncer e mutações. Um dos piores problemas é que essas substâncias são aplicadas em quantidades excessivas e em extensas áreas, e o destino final de seus contaminantes é o meio ambiente (CABRERA et al., 2008). Essa degradação tem consequências em longo prazo e seus efeitos podem ser irreversíveis, com prejuízos à saúde humana e alterações significativas nos ecossistemas, uma vez

que utilizados na agricultura, as suas moléculas podem seguir diferentes rotas no ambiente (BOHNER et al., 2013).

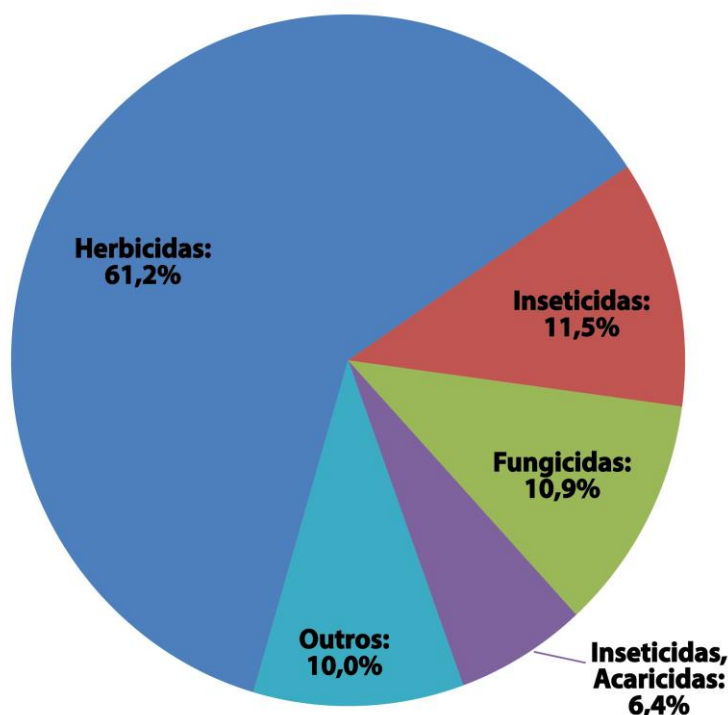


Figura 1. Uso de agrotóxicos por tipo no Brasil. Fonte: (BOMBARDI, 2017).

O glifosato N-(fosfonometil) glicina (Figura 2), foi introduzido no mercado mundial em 1970, sendo um marco no setor agrícola e um dos herbicidas mais vendidos no mundo (KUDSK; STREIBIG, 2003). Esse produto é classificado como herbicida não-seletivo, aplicado no período de pós-emergência e possui mecanismo de ação sistêmico. É considerado muito eficiente, tendo como consequência, alto emprego no mundo inteiro (APPLEBY et al., 2005). No ano de 2013, o glifosato foi o herbicida mais vendido no Brasil, tendo mais de 185 mil toneladas comercializadas (BOMBARDI, 2017).

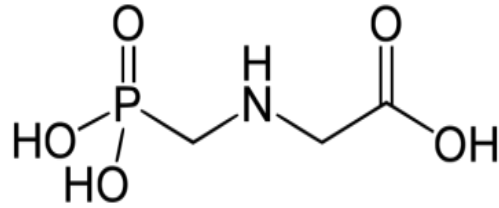


Figura 2. Estrutura química do composto glifosato.

Os agrotóxicos são aplicados diretamente nas plantas ou no solo, e mesmo aqueles aplicados diretamente nas plantas têm como destino final o solo. Estima-se que menos de 10% do que é aplicado por pulverização atinge seu alvo (BOHNER et al., 2013). Sendo que os lençóis freáticos subterrâneos podem ser contaminados através da lixiviação da água e da erosão dos solos. Esta contaminação também pode ocorrer superficialmente, devido à intercomunicabilidade dos sistemas hídricos, atingindo áreas distantes do local de aplicação. Sendo assim, práticas agrícolas e a vulnerabilidade natural de aquíferos podem representar um alto nível de impactos negativos, tornando assim a água imprópria para o consumo (RIBEIRO et al., 2007; BELCHIOR et al., 2014). Frequentemente, a concentração residual de herbicidas em água destinada ao consumo humano é encontrada acima dos níveis permitidos (GIARDI et al., 2005).

Além da contaminação das águas superficiais e subterrâneas, dos solos, a aplicação excessiva dos agrotóxicos desencadeia tanto desequilíbrios ecológicos como biológicos, promovendo pressão agrícola e reduzindo a biodiversidade local da flora e da fauna, levando a instabilidade dos ecossistemas (SILVA et al., 2012; BELCHIOR et al., 2014). Portanto, muitos agrotóxicos podem influenciar de forma direta ou indireta na população da macro e microfauna, como é o caso do herbicida glifosato (ZILLI et al., 2008).

Os agrotóxicos também são considerados um premente problema de saúde pública, uma vez que a população quase na sua totalidade se encontra exposta aos seus efeitos negativos de diferentes formas e níveis, incluindo os produtores e consumidores finais dos alimentos contaminados (GERAGE, 2016). Devido a essas intoxicações humanas, no Brasil existe uma enorme preocupação das autoridades com relação ao contato direto ou indireto com os agrotóxicos.

No período entre os anos de 2007 e 2015, foram notificados 84.206 casos de intoxicação por agrotóxicos no SINAN – (Sistema de Informação de Agravos de

Notificação), sendo que no ano de 2014 foi identificada a maior incidência de casos ,saltando de 6,26 mil para 100 mil. Foi relatado o desenvolvimento de doenças agudas e crônicas associadas à toxicidade dos agrotóxicos, entre elas: dores de cabeça, náuseas, vômitos, letargia, broncoespasmos, fraqueza, insônia, convulsões, efeitos mutagênicos, linfoma, mal de Parkinson, problemas neurológicos e cardíacos, alterações cromossômicas, interferência na gametogênese e alteração de personalidade (GERAGE, 2016).

Além dos problemas citados, a intensa utilização dos agrotóxicos nas áreas agrícolas favorece ainda o aumento da pressão de seleção, contribuindo para a seleção de biótipos resistentes de algumas espécies espontâneas aos herbicidas convencionais, trazendo enormes prejuízos econômicos com seu manejo (MACDONALD et al., 2008).

1.3. Herbicidas Convencionais e Resistência de plantas

Desde a descoberta dos herbicidas, seu uso rotineiro e indevido no campo para o manejo de plantas espontâneas, vem acarretando o surgimento de resistência de biótipos por pressão de seleção a tais substâncias em algumas espécies. Essas plantas daninhas resistentes aos herbicidas são determinadas a partir de indivíduos que apresentam modificações genéticas dentro da mesma população. Essa resistência é notada quando as plantas apresentam capacidade de sobrevivência e propagação após a exposição a doses letais dos herbicidas convencionais (LEAL et al., 2012). Além da resistência por pressão de seleção dos herbicidas, existe a resistência oriunda de forma natural que ocorre espontaneamente nas populações (HRAC-BR, 2016).

Conseqüentemente, o emprego habitual de um mesmo herbicida ou de um conjunto de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação tem aumentado a manifestação de populações daninhas resistentes. Como exemplo, os herbicidas com mecanismo de ação que atuam como inibidores da acetolactato sintase (ALS) foram um dos maiores causadores do surgimento de plantas daninhas resistentes entre a década de 80 e os anos 2000 (TRANEL; WRIGHT, 2002). Atualmente, outros herbicidas têm levado algumas espécies de plantas daninhas a adquirir resistência e entre eles destaca-se o que possui o glifosato como princípio (AMARANTE JÚNIOR et al., 2012).

O glifosato é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, no manejo de plantas daninhas anuais ou perenes em diversos sistemas de produção. O mecanismo de ação do glifosato age inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), resultando no acúmulo de ácido chiquímico nas plantas e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos (GEIGER; FUCHS, 2002). Com a inovação dos transgênicos, que são geneticamente modificados para tolerar as aplicações do glifosato, vem ocorrendo significativo aumento de seleção de biótipos resistentes em espécies de plantas daninhas (KOGER; REDDY, 2015).

Recentemente, no mundo foram reveladas 480 ocorrências de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas, sendo 251 espécies resistentes a 163 ingredientes ativos distintos, abrangendo 91 culturas distribuídas em 69 países (HEAP, 2017). Os primeiros casos de resistência a herbicidas no Brasil foram relatados com as espécies *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), no ano de 1993, estes herbicidas apresentavam mecanismos de ação inibidores da enzima acetolactato-sintase - ALS (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014).

Atualmente foram descritos 44 novos casos de resistência de plantas daninhas, abrangendo 22 espécies distintas e tolerantes a oito mecanismos de ação diferentes dos herbicidas comerciais. Entre essas espécies estão a *Amaranthus viridis* (Caruru de mancha), que no ano de 2011 apresentou resistência aos herbicidas com mecanismos de ação inibidores da ALS + Fotossistema II, e *Eleusine indica* (Capim pé-de-galinha), que no ano de 2016 apresentou esse mesmo comportamento para os produtos com glifosato e mecanismos de ação inibidores da EPSPS (Tabela 1) (HEAP, 2017). Esses novos casos de resistência de plantas daninhas apresentaram-se tolerantes a 23 dos 26 mecanismos de ação descritos dos herbicidas comercializados com o manejo., um total equivalente a 161 produtos diferentes.

Tabela 1. Histórico dos relatos da ocorrência de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil, segundo critérios da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas.

Ano	Nome científico	Nome comum	Mecanismo de ação ¹
2014	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Caruru-gigante	Inibidor Protox
2015	<i>Cyperus iria</i>	Tiririca-do-brejo	Inibidor da ALS
2015	<i>Amaranthus palmeri</i>	Caruru palmeri	Inibidor da EPSPs
2015	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Capim-arroz	Inibidor ACCase+ALS+PSII
2016	<i>Eleusine indica</i>	Capim pé-de-galinha	Inibidor da EPSPs
2016	<i>Digitaria insularis</i>	Capim-amargoso	Inibidor da ACCase
2016	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	Inibidor da ALS+PSII
2016	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	Inibidor da ACCase+ALS
2017	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	Inibidor da EPSPs+ALS
2017	<i>Conyza sumatrensis</i>	Buva	Inibidor do PSI

¹ALS - inibidor da enzima acetolactato sintase; ACCase – inibidor da enzima acetil coenzima-Acarboxilase; EPSPs – inibidor da enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato; Protox – inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase; PSI – inibidor do fotossistema I, PSII- inibidor do fotossistema II. Fonte: HEAP, 2017.

Em países da Europa e na Austrália, nas zonas produtoras de grãos, os custos com o manejo de espécies resistentes a herbicidas podem atingir o dobro em confronto com regiões livres de resistência (PANNELL et al., 2016). Os Estados Unidos têm hoje o maior registro de casos de plantas daninhas resistentes ao glifosato. De acordo com Livingston et al. (2015), o impacto econômico da resistência de plantas daninhas na agricultura americana aumentou os custos de manejo nas áreas com problemas de resistência ao glifosato, podendo chegar a perdas anuais entre 4 a 20%. Na Figura 4, o gráfico apresenta a evolução de casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas no mundo (WEED SCIENCE, 2017).

Diante do exposto, a busca por herbicidas alternativos para o controle dos biótipos resistentes de plantas daninhas aos herbicidas comerciais é de suma importância, visto que essa resistência dificulta onerosamente o manejo das mesmas. O uso de compostos naturais na elaboração de novos herbicidas, os chamados bio-herbicidas, que apresentem novos mecanismos de ação é uma das alternativas para diminuir o número de plantas resistentes (DAYAN; DUKE, 2014).

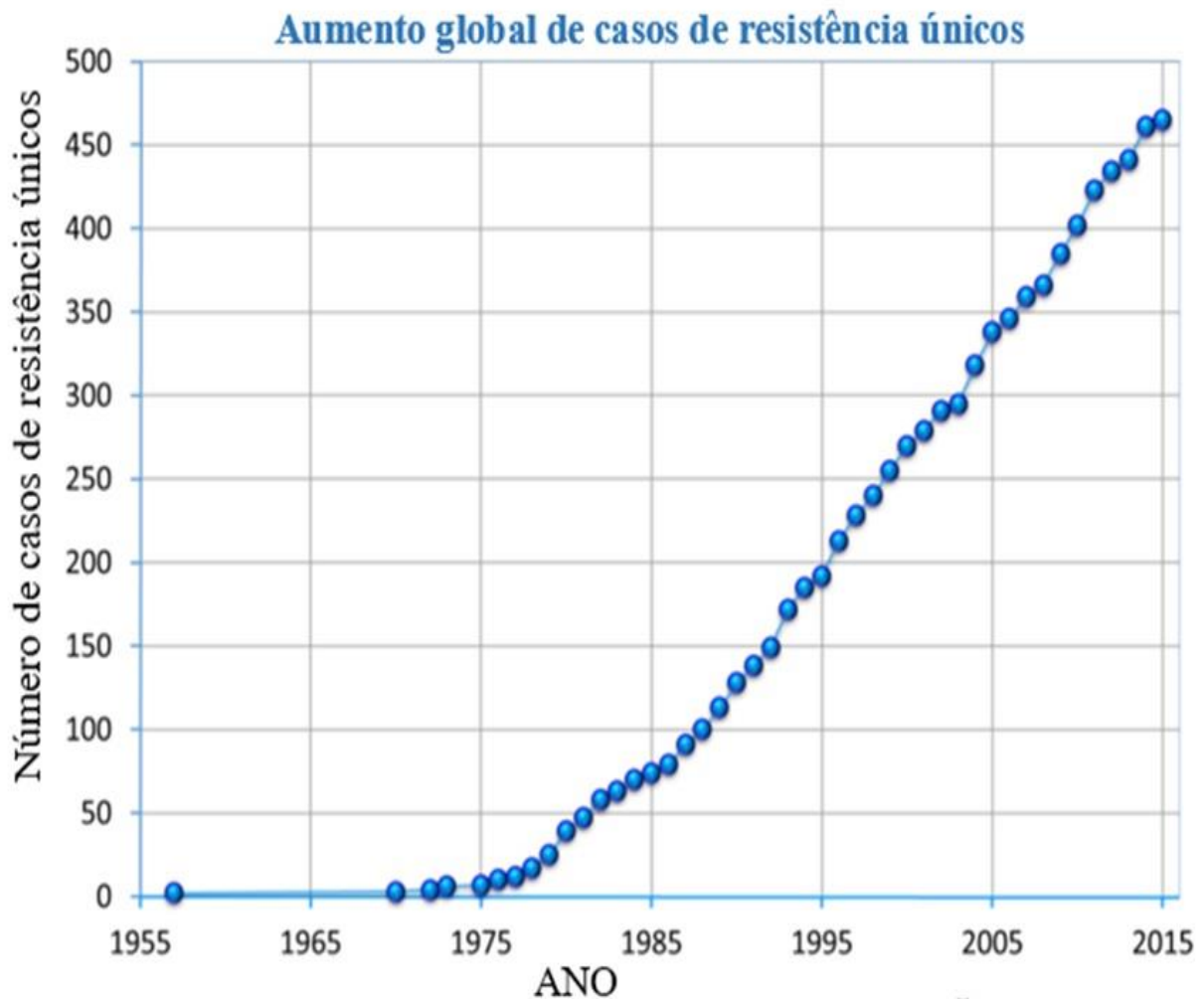


Figura 3. Aumento global de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.
 Fonte: WEED SCIENCE, 2016.

1.4. Obtenção de Bio-herbicidas a partir de compostos naturais

A aplicação de compostos semissintéticos, oriundos de compostos naturais com elevada atividade biológica é uma excelente alternativa para obtenção de bio-herbicidas com diferentes mecanismos de ação no manejo de plantas daninhas. Para obtenção desses bio-herbicidas, é necessário que seus derivados sejam eficazes no controle de plantas e também que sejam facilmente obtidos a um baixo custo (SOUZA FILHO et al., 2006). Essas substâncias naturais têm que ser eficientes na sustentabilidade e na produtividade agrícola, sem ocasionar impactos à saúde e ao meio ambiente, diferentemente dos herbicidas sintéticos convencionais (RAJ et al., 2003; VILA-AIUB et al., 2005).

Muitos compostos derivados, como os metabólitos secundários, são utilizados como referência em programas de síntese na obtenção de novos herbicidas e permitem o estudo do seu modo de ação (COPPING; DUKE, 2007). Esses compostos são produzidos pelos vegetais naturalmente e possuem função na defesa da planta ao ataque de predadores e na competição por espaço, água e nutrientes com outras espécies (principalmente daninhas), podendo ser potencialmente utilizados como produtos fitotóxicos (SIMÕES et al., 2010).

Existem alguns metabólitos secundários produzidos por espécies de plantas, que afetam diretamente a germinação e o desenvolvimento de outras espécies, que ocupam o mesmo ambiente. Esses compostos são determinados como alelopáticos ou aleloquímicos (WEIR et al., 2004). Algumas substâncias aleloquímicas provocam inibição total da germinação de sementes, aparecimento de problemas no sistema radicular, no desenvolvimento das plântulas e podem acarretar a morte das mesmas (TEIXEIRA et al., 2004). Tais compostos naturais são capazes de operar em diversos sítios de ação, diversificando-os dos herbicidas convencionais, que apresentam mecanismos de ação comum (DUKE et al., 2000). Apenas 20 mecanismos de ação dos herbicidas são conhecidos e só dois desses provieram de produtos naturais e possuem ação distinta dos demais (DUKE; DAYAN, 2015). Tais fatos evidenciam as potencialidades dos aleloquímicos para modelos na obtenção de novos herbicidas semissintéticos (bio-herbicidas).

Para obtenção de novos compostos análogos aos herbicidas fenoxiacéticos comerciais é indispensável avaliar o potencial fitotóxico desses fenóis naturais em laboratórios, casa de vegetação e no campo, tanto nas formas puras, como com a adição do grupo ácido que geram novas moléculas semissintéticas, com alta atividade biológica e propriedades diferentes dos produtos comerciais. Alguns óleos essenciais já foram descritos com função herbicida, ocasionando clorose de plântulas no período de emergência, impedindo a biossíntese de clorofilas e de carotenoides (LEI et al., 2016). Dessa forma, os óleos essenciais se tornaram uma importante alternativa para minimizar os problemas com resistência de plantas ao uso de compostos orgânicos, além de serem livres de resíduos e com atividades herbicidas.

1.5. Timol e Ácido Timoxiacético

Inúmeros compostos fenólicos são constituintes voláteis de plantas e de fácil obtenção, sendo comercializados na forma pura, como, por exemplo, o timol (2-isopropil-5-metilfenol). Essa substância fenólica é encontrada em óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), de orégano (*Origanum vulgare*) (DAL POZZO et al., 2011), hortelã pimenta (*Plectranthus amboinicus*) e de outras plantas, apresentando ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante e fitotóxica (PINHEIRO et al., 2015). Estudos comprovam que o timol inibiu a germinação de sementes e do crescimento de plântulas de *Amaranthus retroflexus*, uma espécie daninha, demonstrando seus efeitos bio-herbicidas (AHUJA et al., 2015).

Foi relatado ainda por Zunino e Zygadlo (2004), que o timol teve ação inibitória também no crescimento de plantas de milho, espécie monocotiledônea que apresentaram modificação nos lipídios da membrana. Recentemente, o timol e seu derivado semissintético, o ácido timoxiacético (Figura 4) mostraram-se fitotóxicos em diferentes concentrações, na inibição da germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas de monocotiledônea (sorgo) e eudicotiledônea (alface), sendo que em plântulas de alface a fitotoxicidade foi mais expressiva (DE ASSIS ALVES, et al., 2018). Isso é devido ao fato de que geralmente os monoterpenos têm mais ação sobre eudicotiledôneas quando comparados às monocotiledôneas (AMRI et al., 2013).

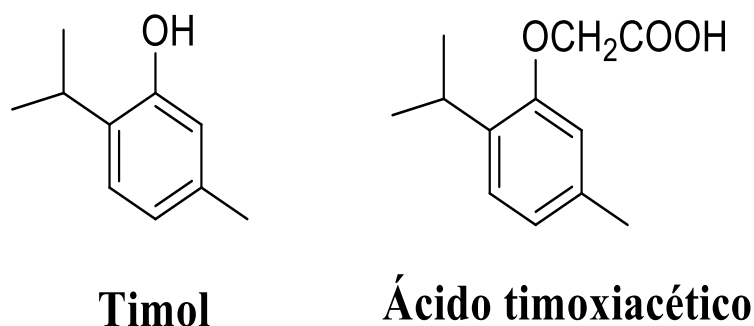


Figura 4. Estrutura química do fenól natural timol e de seu derivado semissintético ácido timoxiacético.

Essa ação inibitória na germinação e no crescimento, provocada pelo monoterpeno timol, foi elucidada também em espécies de plantas daninhas. De acordo com KORDALI et al. (2008), essa inibição provocada pelo timol foi similar ao herbicida comercial 2,4-D, potencializando seu efeito como bio-herbicida.

Além dos efeitos fitotóxicos, o timol apresenta efeitos citotóxicos e mutagênicos, que foram verificados a partir do seu mecanismo de ação na redução do índice mitótico e provocaram alterações nucleares em células vegetais tratadas (DE ASSIS ALVES et al., 2018). Outro ensaio constatou que o timol provoca alta produção de radicais livres e notável efeito citotóxico, até mesmo em baixas concentrações (KASUGAI et al., 1991).

O derivado semissintético do timol, ácido timoxiacético também possui efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênico, sendo considerado um bio-herbicida seletivo, similar ao herbicida comercial 2,4-D, que é classificado como ácidos fenoxiacéticos e são obtidos a partir de compostos fenólicos, se mostrando eficaz no controle de plantas daninhas de folhas largas (DE ASSIS ALVES et al., 2018).

1.6. Características das plantas usadas nos bioensaios

Os organismos vegetais são sensíveis aos agentes tóxicos presentes no meio e vêm sendo utilizados em testes para avaliação de riscos toxicológicos de poluentes. No manejo de plantas daninhas nas culturas, esses vegetais são receptores diretos dos agrotóxicos e permitem análises simultâneas de diferentes mecanismos de ação do agente mutagênico, indicando assim a genotoxicidade e mutagenicidade dos compostos utilizados (GRANT, 1994; FERNANDES et al., 2009; ARAS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Abaixo segue uma descrição de características de espécies daninhas escolhidas para este trabalho, as quais foram utilizadas devido à importância econômica para o setor agrícola e pela aquisição das sementes, que foram obtidas de fonte comercial ou colhidas no IFES (Instituto Federal do Espírito Santo), Campus Alegre-ES (*A. viridis* e *E. indica*).

1.6.1. *Amaranthus viridis* L. ou caruru

O gênero *Amaranthus* contém cerca de 60 espécies, sendo algumas delas consideradas plantas daninhas por competir por luz, água, nutrientes, espaço físico, além de serem hospedeiras de pragas e doenças, que podem afetar as culturas de interesse econômico. Esta espécie é conhecida popularmente como caruru e no Brasil, ocorre em todas as regiões, principalmente no Nordeste onde existem os maiores territórios agrícolas (ZANATTA et al., 2008). Diferentes espécies desse gênero vêm apresentando problemas no seu controle, sendo importante estudar

seus biótipos, visto que, algumas vêm desenvolvendo resistência aos herbicidas comerciais, acarretando enormes prejuízos econômicos no seu manejo. No Brasil, três espécies desse gênero já apresentaram problemas de resistência ao glifosato, sendo elas: *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus viridis* e *Amaranthus palmeri*, que são responsáveis pelo aumento nos custos de controle em áreas cultivadas de soja entre R\$ 249,60 a R\$ 563,00 ha⁻¹(ZHOU et al., 2015).

1.6.2. *Cucumis sativus* L. ou pepino

O pepino (*Cucumis sativus*), pertence à família das curcubitáceas e possui grande importância econômica e social no agronegócio de hortaliças nacional. A cultura do pepino exige clima tropical, sendo a região Sudeste responsável por mais de 50% do total da produção brasileira (AGRIANUAL, 2010). A espécie apresenta enorme variação, porém no mercado interno existem apenas quatro tipos de pepino: “caipira”, “conserva”, “aodai” e “japonês”, com características vegetativas diferentes (NERY et al., 2015). Além disso, essa espécie vegetal é listada pela EPA como importante modelo para estudos de prospecção de mutagênese ambiental (GRANT, 1998). Um estudo realizado para averiguar a viabilidade da utilização do pepino como modelo em biotestes de fitotoxicidade observou que essa espécie é viável para indicar características macroscópicas como germinação e crescimento radicular (BARBOSA et al., 2013).

1.6.3. *Eleusine indica* L. ou capim pé-de-galinha

O capim pé-de-galinha, é uma planta capaz de se desenvolver em qualquer tipo de solo, sendo uma espécie daninha considerada comum, principalmente nas regiões no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Essa espécie herbácea, pertence à família Gramineae e tem seu ciclo de vida anual. Seu centro de origem é indefinido, estando distribuída por todo mundo, devido à sua alta capacidade de reprodução e desenvolvimento em diversos locais, principalmente onde as temperaturas são mais elevadas e a umidade é alta. É de grande preocupação no manejo de plantas espontâneas visto que se adapta a condições adversas de solo compactado, com baixa fertilidade e elevada acidez, sendo hospedeira de agentes patogênicos que atacam diversas culturas de interesse econômico (EMBRAPA MILHO e SORGO, 2010). Já foram detectados, no Brasil, biótipos de *E. indica* resistentes aos herbicidas com os seguintes mecanismos de ação: inibidores de

ACCCase – enzima acetil coenzima-Acarboxilase no ano de 2003, e inibidores de EPSPS–enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato em 2016 (HEAP, 2017).

1.6.4. *Lactuca sativa* L. ou Alface

A Alface faz parte da Família das Asteraceae e pertence ao gênero *Lactuca* com cerca de 100 espécies descritas. É uma espécie eudicotiledônea, anual e autogâmica que está entre as folhosas mais consumidas no Brasil. Esta espécie vem sendo bastante pesquisada em programas de melhoramento por ser a hortícola mais produzida no mundo (PEREIRA et al., 2013). Por se tratar de um modelo vegetal muito sensível, a alface vem sendo utilizada em inúmeras pesquisas (PINHEIRO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017). Banks e Schultz (2005) compararam diferentes espécies vegetais, em testes de germinação avaliando a toxicidade de solos contaminados com petróleo e concluíram que a *Lactuca sativa* L. é uma excelente indicadora. Devido a tal fato, tem sido amplamente utilizada para a realização de ensaios de toxicidade e genotoxicidade de diferentes substâncias, pois é importante que o modelo vegetal tenha ciclo de vida curto, sendo a alface indicada para tais testes (SILVEIRA et al., 2017).

1.6.5. *Sorghum bicolor* L. ou sorgo forrageiro

Uma outra espécie vegetal utilizada como modelo em teste de toxicidade é a *Sorghum bicolor* (sorgo). Trata-se de uma planta monocotiledônea, autógama, típica de clima quente, com baixa exigência nutricional e tolerância ao estresse hídrico, à salinidade e à compactação do solo. Apresenta crescimento rápido, sendo utilizada em pastagens e silagem para alimentação, sendo necessário o manejo (dessecá-lo com herbicidas) pra posterior implantação de culturas convencionais (ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010). Em função de suas propriedades fisiológicas, essa espécie vem sendo comumente utilizada em testes de fitotoxicidade e citotoxicidade (PINHEIRO et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito herbicida dos compostos alelopáticos timol e ácido timoxiacético sobre a germinação de sementes, o desenvolvimento inicial de plântulas e alterações no DNA de *Amaranthus viridis* L., *Cucumis sativus* L., *Lactuca sativa* L., *Eleusine indica* L. e *Sorghum bicolor* L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Amaranthus viridis* L., *Cucumis sativus* L., *Lactuca sativa* L., *Eleusine indica* L. e *Sorghum bicolor* L.;
- Avaliar as alterações a partir de análises fitogenotóxicas dos efeitos das moléculas naturais timol e ácido timoxiacético;
- Estabelecer a relação dos parâmetros de fitotoxicidade com observações nas alterações no DNA;
- Capacitação técnica dos estudantes envolvidos na pesquisa, experiências com análises bioquímicas e moleculares, nos programas de análises genéticas;
- Consolidar o aprendizado pela comparação de informações disponíveis na literatura com os resultados obtidos;
- Publicar os resultados em congressos e revistas científicas relacionadas à área de interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi instalado e conduzido no período de 21 de novembro ao dia 11 de dezembro de 2017 em casa de vegetação do Programa de pós-graduação de Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado na área

experimental no distrito de Rive, município de Alegre, região sul do estado do Espírito Santo, posteriormente foram realizadas nos meses de dezembro de 2017 a junho de 2018 as análises fitogenotóxicas no Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular (CCA-E-UFES).

3.2 Material Vegetal

Foram utilizadas cinco espécies, sendo três eudicotiledôneas (*Amaranthus viridis* L., *Cucumis sativus* L. e *Lactuca sativa* L.) e duas monocotiledôneas (*Eleusine indica* L. e *Sorghum bicolor* L.). As sementes de *Lactuca sativa* L. var. Mônica da marca Feltrin (alface), *Cucumis sativus* L. var. Caipira da marca TOP seed (pepino) e *S. bicolor* L. da marca BR seeds (sorgo) foram adquiridas em comércio local, na cidade de Alegre-ES. Já as sementes das plantas daninhas *Amaranthus viridis* L. (Caruru) e *Eleusine indica* L. (capim pé-de-galinha) foram coletadas no Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Campus Alegre-ES. As sementes foram armazenadas em condições de laboratório (20 °C) até a montagem do experimento.

3.3 Procedimentos Experimentais Gerais

Foram semeadas seis sementes das espécies avaliadas, em tubetes de 115 cm³, contendo 150 g de areia autoclavada, sendo três repetições para cada tratamento, água e solvente como controles negativo (C-), glifosato como controle positivo (C+), timol e ácido timoxiacético na concentração de 3 mmol L⁻¹, tal concentração foi escolhida por apresentar melhores resultados em trabalhos anteriores DE ASIS ALVES et al. (2018).

O timol usado nos testes foi adquirido da empresa Sigma Aldrich, assim como a acetona e o éter dietílico usados nas reações. Já, o ácido timoxiacético foi obtido seguindo a mesma metodologia proposta por DE ASIS ALVES et al. (2018).

O solvente usado no preparo das soluções de timol e ácido timoxiacético (3 mmol L⁻¹) foi a mistura de: água destilada + acetona (2%, v v⁻¹) + Tween (0,05%, v v⁻¹), que foi usado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial glifosato (0,05%, v v⁻¹) (DE ASIS ALVES et al., 2018). A forma de aplicação dos tratamentos para o teste de pré-emergência, foi a areia embebida

com 10 mL das soluções no momento da semeadura, baseado no trabalho de VALENTE (2010), com modificações, já para o teste de pós-emergência a aplicação foi via foliar, pulverizados no 18º dia após a emergência das plântulas, sendo essas expostas por 4 dias.

A irrigação foi controlada diariamente e realizada com água destilada quando necessário. O experimento foi conduzido durante 21 dias, tomando-se medidas diárias do índice de velocidade de germinação (IVG) até estabelecer a germinação. Ao final do experimento foram aferidos o comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e massa fresca e seca das mesmas. A coleta das amostras para realização das análises moleculares foi realizada separando raízes de parte aérea das plântulas, sendo imediatamente acondicionadas em caixa de isopor com nitrogênio líquido, posteriormente armazenadas no freezer -30 °C até etapa de extração de DNA.

3.4 Avaliação da fitotoxicidade

As variáveis avaliadas no teste de germinação foram o índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da raiz (MSR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas.

O IVG foi determinado de acordo com MAGUIRE (1962), utilizando-se a equação:

$$IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + \dots + (Gn/Nn)$$

Na qual G1, G2, Gn é igual ao número de sementes germinadas, e N1, N2, Nn corresponde ao número de dias após a semeadura.

Para avaliação das demais variáveis, ao vigésimo primeiro dia após a semeadura, foram retiradas amostras de plântulas consideradas normais (formaram raiz e parte aérea). Mediu-se o comprimento de raiz e parte aérea, em centímetros, com auxílio de régua. As plântulas foram separadas em parte aérea e a raiz e em seguida pesou-se a massa fresca e foram colocadas em sacolas de papel tipo *kraft*,

secas em estufa a 72 °C por 72 horas para a quantificação da biomassa seca, feita em balança analítica (0,0001 g).

3.4.1 Condutividade Elétrica e Lixiviação de Potássio

Para determinar a condutividade elétrica (CE) e a lixiviação de potássio (LK) nas sementes, antes e após o tratamento com os compostos timol e ácido timoxiacético, seguiu-se a metodologia proposta por Prete (1992), com adaptações. Para cada espécie de planta foram separadas quatro amostras de 50 sementes e as massas foram aferidas (precisão de 0,001 g). Em seguida, estas amostras foram embebidas em 75 mL de água destilada, cada tratamento (no interior de copos plásticos de 180 mL de capacidade) e colocadas em estufa ventilada a 25 °C por 5 horas, as soluções sem as sementes foram vertidas para outro recipiente, sendo realizada a leitura da condutividade elétrica em condutivímetro e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de amostra. Imediatamente após a leitura da condutividade elétrica, realizou-se a leitura do potássio lixiviado na solução em fotômetro de chama. Os resultados da quantidade de potássio lixiviado foram expressos em ppm, esses dados foram transformados para $\sqrt{x+1}$.

3.5 Avaliação da genotoxicidade

As análises moleculares utilizadas para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade dos compostos testados foram feitas utilizando marcadores ISSR.

A extração dos DNAs foi realizada utilizando o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990) com as modificações propostas pelo IAC: tampão de extração para cada amostra: 0,28 mL de NaCl 5 mol L⁻¹; 0,1 mL de Tris-HCl pH 8,0 1 mol L⁻¹; 0,03 mL de EDTA pH 8,0 500 mmol L⁻¹; 10 mg de PVP; 0,4 mL de CTAB 5%; 4 μL de β -mercaptoetanol e água ultrapura para atingir o volume de 1 mL. Em seguida foram armazenados a 4 °C e suas concentrações quantificadas pelo aparelho Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific).

Após quantificação e análise da qualidade do DNA, as amostras foram diluídas para a concentração de 25 ng μL^{-1} . As PCR foram realizadas utilizando primers ISSR “*UBC primer set 100/9*” – 809; 810; 812; 827; 836; 842; 864; 868 e 884, previamente selecionados, para avaliar os danos induzidos pelos tratamentos

no DNA da raiz e parte aérea das espécies. Essas PCR foram feitas com um volume final de 20 μL , contendo para cada amostra: 2 μL de tampão 10X; 1 μL de MgCl 50 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 0,2 μL de Taq 5 U μL^{-1} ; 2 μL de primer 2 μM ; 1 μL de BSA; 3 μL de DNA e 8,8 μL de água ultrapura. As reações de amplificação dos *primers* ISSR foram feitas em termociclador, seguindo as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C – 45 segundos, 50 °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-se o fotodocumentador (Bio-Rad®, Molecular Imager® Gel Doc™ XR System)

3.6 Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com três repetições com seis sementes cada, e parcelas compostas por dezoito sementes, em esquema fatorial simples 5x5, dispostos da seguinte forma: Fator 1- Espécies; Fator 2- Tratamentos. Os dados obtidos com as análises de fitotoxicidade foram submetidos à análise de variância e com as médias foram realizadas análises de regressão e teste de Dunnett em nível de 5% de significância.

Os efeitos provocados pela exposição dos tratamentos foram analisados 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. Com os dados moleculares codificados para os *primers* ISSR foram obtidos o índice de dissimilaridade de coincidência simples entre os diferentes tratamentos. Em seguida, foi realizada a análise de agrupamento UPGMA (Ligação Média Entre Grupo), sendo que os pontos de corte dos cladogramas gerados foram estimados a partir do coeficiente de Mojema. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fitotoxicidade

Com base nos resultados encontrados dos ensaios macroscópicos realizados (Tabela 2), observou-se fitotoxicidade significativa do timol e do ácido timoxiacético sobre as sementes e plântulas das cinco espécies testadas. As sementes de *Lactuca sativa* (alface) expostas ao timol e ao ácido timoxiacético na concentração de 3 mmol L⁻¹ apresentaram redução no índice de velocidade de germinação, comprimento de raiz, e no comprimento de parte aérea. Já para as demais características analisadas como a massa fresca da raiz, massa fresca da parte aérea, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea, condutividade elétrica e lixiviação de potássio apresentaram efeitos inibitórios similares ou superiores ao herbicida comercial glifosato.

Tabela 2 – Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético (3 mmol L⁻¹) no desenvolvimento inicial de plântulas de Alface nos experimentos de pré e pós-emergência.

Tratamento	Pré-emergente								
	IVG	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA	CE	LK
	----- (g plântulas-1) -----				-- (cm plântula-1) --		(Sm -1 g-1) (mg dm ³)		
Ácido Timoxiacético	0,50 c	1,20 bc	1,48 bc	1,57 bc	1,60 bc	0,86	0,70 bc	5,93	38,97
Timol	1,50 c	1,42 bc	1,55 bc	1,60 bc	1,61 bc	0,43	0,26 b	4,66 ab	38,51
Água Destilada	4,66 a	1,71 a	1,65 a	1,62 a	1,62 a	11,46 a	1,33 a	4,67 a	2,08 a
Solvente	3,11 b	1,33 b	1,52 b	1,59 b	1,61 a	9,96 b	0,50 b	4,85 b	27,65 b
Glifosato	1,72 c	1,34 c	1,53 c	1,59 c	1,61 a	7,43 c	0,80 c	3,29 c	25,82 c
Tratamento	Pós-emergente								
	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA			
Ácido Timoxiacético	1,07 b	1,15 b	1,02 abc	1,02 abc	12,20 abc	1,50 abc			
Timol	1,06 bc	1,1	1,01 ac	1,02 abc	1,0333	0,6			
Água Destilada	1,30 a	1,19 a	1,01 a	1,02 a	13,56 a	1,80 a			
Solvente	1,05 b	1,15 b	1,02 b	1,02 b	12,43 b	1,63 b			
Glifosato	1,04 c	1,18 c	1,01 c	1,03 c	10,96 c	1,23 c			

Em que: IVG- representa o índice de velocidade de germinação, MFR- massa fresca da raiz, MFA- massa fresca da parte aérea, MSR- massa seca da raiz, MSA- massa seca parte aérea, CR- crescimento radicular, CA – crescimento da parte aérea, CE - condutividade elétrica, LK – lixiviação de potássio.

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

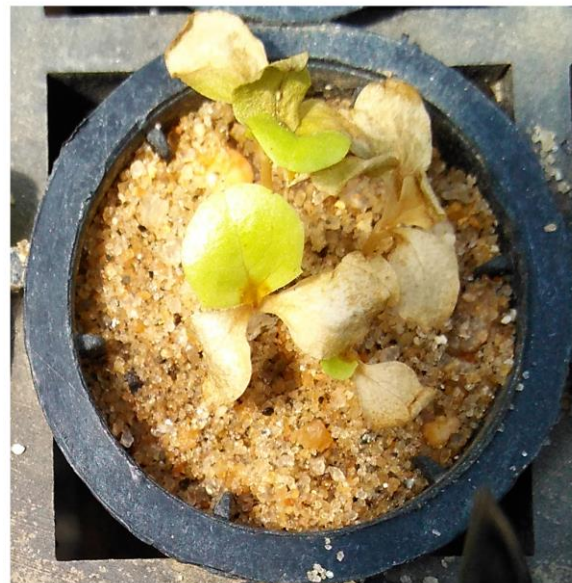
O ácido timoxiacético proporcionou a diminuição do IVG em 30% nas sementes de alface, quando comparado ao controle positivo (C+) glifosato, essa redução chega a 50% com relação ao solvente e a 79% ao controle negativo (C-)

água, tornando-se mais eficaz na inibição dessa variável. De acordo com Valerio et al. (2007), esse efeito de retardo na germinação é um critério eficiente e sensível na análise de fitotoxicidade, evidenciando o ácido timoxiacético como potencial herbicida pré-emergente. Entretanto, para as plântulas de alface, o timol se destacou elucidando seus efeitos tóxicos no desenvolvimento inicial das plântulas, inibindo o CR e o CA, sugerindo maior eficácia como bio-herbicida de ação pós-emergente (Tabela 2). Os resultados encontrados estão de acordo com aqueles encontrados por De Assis Alves et al. (2018), que avaliaram os efeitos do timol e do ácido timoxiacético sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L., e *Sorghum bicolor* e verificaram que nas concentrações de 3 mmol L⁻¹; 1,5 mmol L⁻¹; 0,75 mmol L⁻¹; 0,375mmol L⁻¹, esses compostos foram capazes de reduzir a porcentagem de germinação e, quanto maior a concentração deles, maiores foram os efeitos inibitórios da germinação.

Além dos efeitos inibitórios, tanto nas variáveis germinativas quanto nas de crescimento vegetativo, o crescimento de plântulas de alface é mais sensível aos tratamentos com ácido timoxiacético e timol, principalmente se relacionado ao crescimento da parte aérea, quando comparado ao C- (Tabela 2). Tal fato pode afetar a velocidade e o tempo de germinação, podendo acarretar em raízes necrosadas, plântulas anormais ou morte das plântulas, conforme observado neste estudo em pós-emergência nas plântulas de alface (Figura 5).



A



B

Figura 5. Plântula de alface sadia e normal no controle com água (A) e (B) plântula anormal com indícios de morte provocada pelo ácido timoxiacético após 2 dias de exposição.

Embora neste estudo tenham sido verificadas diferenças significativas no índice de velocidade de germinação, no crescimento radicular e no crescimento da parte aérea, FERREIRA e AQUILA (2000) destacam que o efeito fitotóxico ocorre, geralmente, sobre a velocidade de germinação, promovendo redução nessa variável. Isso é devido à germinação ser menos sensível aos compostos aleloquímicos do que o crescimento da plântula, sendo mais eficiente na verificação de tais efeitos (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Os efeitos fitotóxicos do ácido timoxiacético foram observados em sementes e plântulas de *Amaranthus viridis* L. (Caruru), constatados na redução superior do IVG e CR, tendo inibição semelhante à do herbicida comercial glifosato para todos os parâmetros avaliados. O timol também inibiu significativamente ($p \leq 0,05$) na concentração 3 mmol L^{-1} afetando a germinação e o crescimento inicial de plântulas de caruru, quando comparado ao C+ (Tabela 3). Esse fato pode ser atribuído ao efeito direto do composto, ou como consequência da redução do crescimento das raízes (OLIVEIRA et al., 2004). A redução do crescimento radicular pode estar relacionada à inibição da síntese de proteínas e ao rearranjo das membranas celulares (SETH et al., 2007).

Observa-se na Tabela 3 que de acordo com o aumento da LK, o IVG das sementes de caruru diminuiu, sugerindo que o ácido timoxiacético e o timol afetaram negativamente a velocidade de rearranjo das membranas celulares, permitindo a lixiviação de sais minerais, açúcares, proteínas e outros componentes da semente.

Tabela 3 – Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético (3 mmol L^{-1}) no desenvolvimento inicial de plântulas de Caruru., nos experimentos de pré e pós-

emergência.

Tratamento	Pré-emergente								
	IVG	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA	CE	LK
	----- (g plântulas-1) -----					-- (cm plântula-1) -- (Sm -1 g-1) (mg dm ³)			
Ácido Timoxiacético	0,17	1,41 ac	1,55 ac	1,60 ac	1,61 ac	0,46 bc	0,40 bc	7,34 abc	8,61
Timol	0,63 abc	1,23 bc	1,49 bc	1,58 bc	1,60 c	0,63 bc	0,43 bc	6,64 abc	8,62
Água Destilada	0,65 a	1,44 a	1,56 a	1,60 a	1,61 a	8,00 a	1,00 a	6,47 a	2,18 a
Solvente	0,58 b	1,14 b	1,46 b	1,56 b	1,6 b	0,63 b	0,33 b	6,52 b	6,78 b
Glifosato	0,67 c	1,35 c	1,53 c	1,59 c	1,61 c	2,16 c	0,90 c	6,50 c	6,03 c

Tratamento	Pós-emergente					
	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA
Ácido Timoxiacético	1,01 b	1,03 bc	1,10 abc	1,01 abc	3,86 abc	1,70 ab
Timol	1,00 b	1,01 ab	1,01 abc	1,00 abc	2,50 abc	1,56 ab
Água Destilada	1,06 a	1,02 a	1,05 a	1,02 a	6,10 a	2,00 a
Solvente	1,02 b	1,02 b	1,01 b	1,01 b	4,70 b	1,33 b
Glifosato	1,06 c	1,01 c	1,02 c	1,00 c	1,17 c	0,50 c

Em que: IVG- representa o índice de velocidade de germinação, MFR- massa fresca da raiz, MFA- massa fresca da parte aérea, MSR- massa seca da raiz, MSA- massa seca da parte aérea, CR- crescimento radicular, CA – crescimento da parte aérea, CE - condutividade elétrica, LK – lixiviação de potássio.

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

O timol e o ácido timoxiacético interferiram negativamente e de forma bastante acentuada, na concentração de 3 mmol L⁻¹, sobre a germinação e o crescimento das plântulas de *Cucumis sativus* (pepino). Pode-se observar também redução na massa fresca e na massa seca das plântulas de pepino tratadas com ácido timoxiacético em pré-emergência e para o timol em pós-emergência. O comprimento total dessas plântulas foi reduzido significativamente ($p \leq 0,05$) e o CR das plântulas tratadas com ácido timoxiacético apresentou os menores valores em casa de vegetação, sendo seu CR 11,32 vezes menor, quando comparado com o C- e 8,95 vezes menor que o C+ (Tabela 4).

Tabela 4 – Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético (3 mmol L⁻¹) no desenvolvimento inicial de plântulas de Pepino nos experimentos de pré e pós-emergência.

Tratamento	Pré-emergente								
	IVG	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA	CE	LK
	----- (g plântulas-1) -----				--(cm plântula-1)--		(Sm -1 g-1) (mg dm3)		
Ácido Timoxiacético	0.41	1.79	1.67	1.63	1.62	2.91	2.46 c	2.07	3.29
Timol	1.67 c	2.06 abc	1.75 abc	1.65 abc	1.62 abc	15.70 ab	3.16 ac	2.72 abc	3.11
Água Destilada	3.72 a	2.29 a	1.51 a	1.67 a	1.70 a	14.23 a	3.93 a	2.70 a	1.47 a
Solvente	3.26 b	2.28 b	1.71 b	1.64 b	1.63 b	13.56 b	3.63 b	2.73 b	1.61 b
Glifosato	2.03 c	2.30 c	1.81 c	1.61 c	1.60 c	11.86 c	2.53 c	2.74 c	2.12 c
Tratamento	Pós-emergente								
	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA			
Ácido Timoxiacético	1.16 a	1.26	1.06	1.04	11.93 abc	2.70 abc			
Timol	1.11	1.15	1.05 b	1.03	11.90 abc	2.33 abc			
Água Destilada	1.12 a	1.23 a	1.10 a	1.05 a	11.94 a	2.10 a			
Solvente	1.34 b	1.53 b	1.07 b	1.09 b	14.26 b	2.93 b			
Glifosato	1.28 c	1.32 c	1.11 c	1.06 c	14.00 c	1.93 c			

Em que: IVG- representa o índice de velocidade de germinação, MFR- massa fresca da raiz, MFA- massa fresca da parte aérea, MSR- massa seca da raiz, MSA- massa seca da parte aérea, CR- crescimento radicular, CA – crescimento da parte aérea, CE - condutividade elétrica, LK – lixiviação de potássio.

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

O ácido timoxiacético afetou o desenvolvimento normal das plântulas de pepino em pré-emergência. As alterações observadas foram redução na raiz, queima das folhas, necrose da radícula, ausência de pelos absorventes e parte aérea pouco desenvolvida (Figura 6). Esse fato pode ser atribuído ao efeito direto do composto, ou uma consequência da redução do crescimento das raízes (OLIVEIRA et al., 2004). Plântulas anormais geralmente não completam o seu desenvolvimento, e a diminuição dos pelos radiculares pode dificultar a absorção de nutrientes pela raiz, acarretando deficiências no desenvolvimento (FERREIRA e AQUILA, 2000). De acordo com AIRES et al. (2005) e MARASCHIN-SILVA e AQUILA (2006), os compostos aleloquímicos afetam o crescimento inicial, refletindo em atrofiamento das partes da plântula, sendo o escurecimento evidência de alterações morfológicas e anatômicas causadas por fitotoxinas.

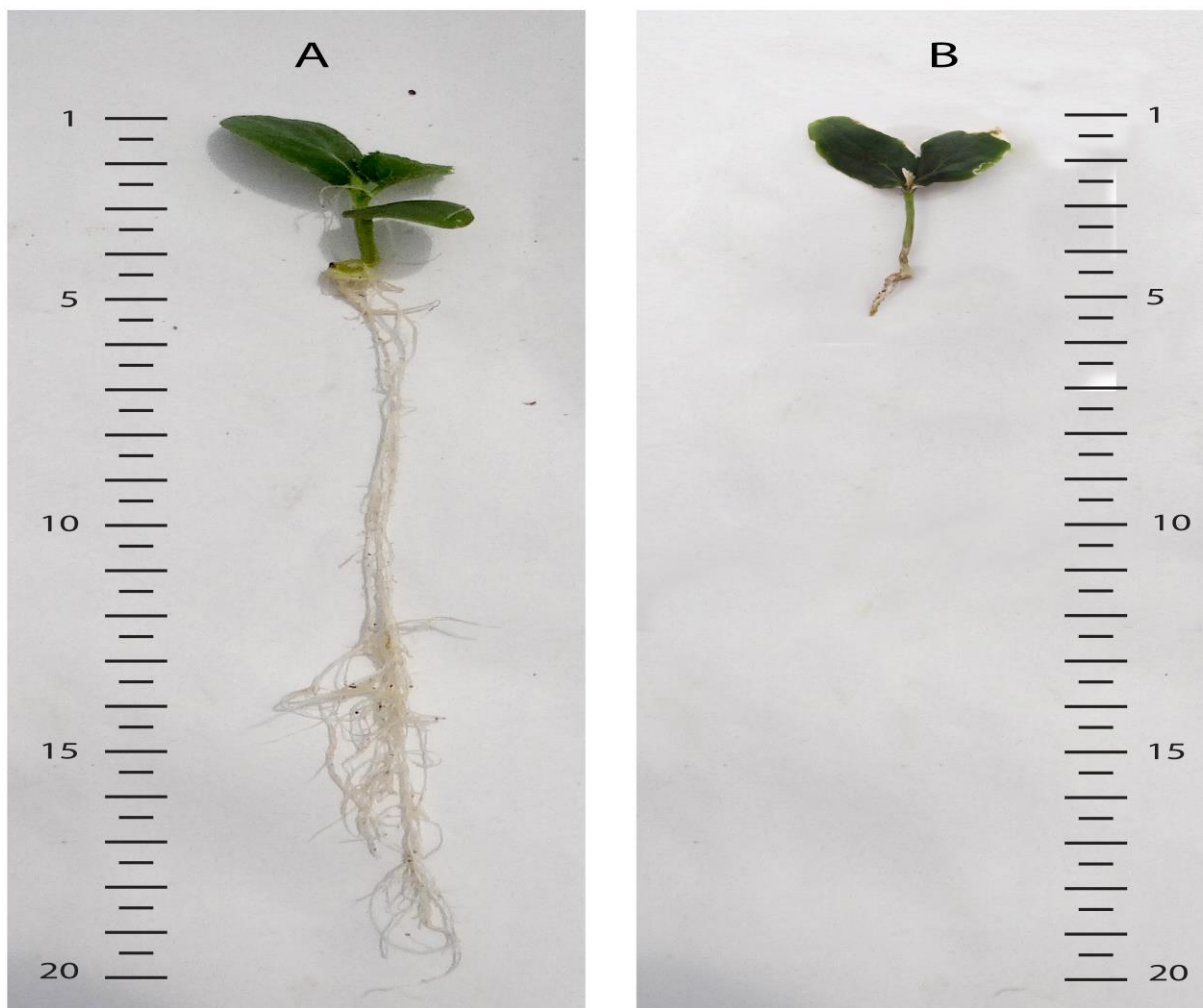


Figura 6. Plântula de pepino sadia e normal no controle com água (A) e (B) plântula anormal com redução na raiz, queima na folha, necrose da radícula, ausência de pelos absorventes e parte aérea pouco desenvolvida, provocada pelo ácido timoxiacético após 21 dias de exposição.

Para a monocotiledônea *Eleusine indica* (pé-de-galinha), o ácido timoxiacético inibiu totalmente a germinação das sementes em pré-emergência em casa de vegetação, isso pode ser explicado devido ao aumento significativo na condutividade elétrica e lixiviação de potássio. Os altos valores obtidos na análise de CE e LK indicam que o ácido timoxiacético e o timol afetaram negativamente as membranas celulares e o IVG, estando esses parâmetros correlacionados (Tabela 5 e Figura 7.D).

Outra característica observada para as plântulas de capim pé-de-galinha foi a redução no acúmulo de matéria fresca da raiz e da parte aérea para todos os tratamentos, quando comparados ao C-. Essa diferença significativa observada na massa fresca das plântulas, provavelmente deve-se às diferenças no conteúdo de água absorvida e retida nos tecidos verdes, que pode ser influenciada pelos demais tratamentos. Esses resultados indicaram a existência de uma fitotoxicidade acentuada do timol e do ácido timoxiacético sobre a qualidade fisiológica de sementes e plântulas dessa espécie (Tabela 5). AZIRAK e KARAMAN (2008) constataram esse efeito inibitório da germinação e no crescimento provocado pelo timol, em outras espécies de plantas daninhas como a *B. decumbens*, demonstrando seu potencial para aplicação em pré e pós-emergência como bio-herbicida.

Tabela 5 – Fitotoxicidade do fenol Timol e seu derivado ácido timoxiacético na concentração de 3 mmol L⁻¹ no desenvolvimento inicial de plântulas de Capim pé-de-galinha, nos experimentos de pré e pós- emergência.

Tratamento	Pré-emergente								
	IVG	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA	CE	LK
	----- (g plântulas-1) -----					-- (cm plântula-1) --		(Sm -1 g-1) (mg dm ³)	
Ácido Timoxiacético	0	0	0	0	0	0	0	12,28	15,25
Timol	0,19 abc	1,06 bc	1,43 bc	1,56 bc	1,5 abc	0,83 abc	0,70 ac	8,71 abc	13,97
Água Destilada	0,31 a	1,15 a	1,56 a	1,57 a	1,7 a	1,53 a	0,70 a	8,61 a	8,11 a
Solvente	0,18 b	1,09 b	1,44 b	1,56 b	1,6 b	2,23 b	0,26 b	9,00 b	12,46 b
Glifosato	0,18 c	1,09 c	1,44 c	1,56 c	1,5 c	1,03 c	0,73 c	8,33 c	9,56 c
Tratamento	Pós-emergente								
	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA			
Ácido Timoxiacético	1,02 bc	1,02 bc	1,03 bc	1,03 bc	0,66 c	0,93 c			
Timol	1,01 bc	1,01 bc	1,01 bc	1,02 bc	0,60 c	0,56 c			
Água Destilada	1,3 a	1,5 a	1,80 a	1,50 a	2,37 a	1,60 a			
Solvente	1,05 b	1,01 b	1,28 b	1,02 b	1,56 b	1,63 b			
Glifosato	1,01 c	1,01 c	1,01 c	1,03 c	0,56 c	0,80 c			

Em que: IVG- representa o índice de velocidade de germinação, MFR- massa fresca da raiz, MFA- massa fresca da parte aérea, MSR- massa seca da raiz, MSA- massa seca da parte aérea, CR- crescimento radicular, CA – crescimento da parte aérea, CE - condutividade elétrica, LK – lixiviação de potássio.

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

Embora neste trabalho o timol e o ácido timoxiacético tenham apresentado efeitos inibitórios tanto nas variáveis germinativas quanto nas de crescimento

vegetativo em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, tais resultados foram mais expressivos para espécies eudicotiledôneas alface (Tabela 2), caruru (Tabela 3) e pepino (tabela 4). Para as monocotiledôneas pé-de-galinha (Tabela 5) e sorgo (Tabela 6) apesar das variáveis significativas ($p \leq 0,05$), são menos representativas nos efeitos dos compostos naturais testados. AMRI et al. (2013) relataram que, geralmente, eudicotiledôneas são mais sensíveis a monoterpenos como o timol do que monocotiledôneas.

Na Tabela 6 observa-se que o ácido timoxiacético foi o tratamento que mais afetou o IVG e o crescimento radicular em pré-emergência, esses efeitos foram mais acentuados no crescimento inicial de plântulas de sorgo quando comparado ao C+. Essas alterações drásticas no crescimento radicular evidenciam forte fitotoxicidade do composto (OLIVEIRA et al., 2011).

Tabela 6 – Fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético (3 mmol L^{-1}) no desenvolvimento inicial de plântulas de Sorgo, nos experimentos de pré e pós-emergência.

Tratamento	Pré-emergente								
	IVG	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA	CE	LK
	----- (g plântulas-1) -----					-- (cm plântula-1) -- (Sm -1 g-1) (mg dm3)			
Ácido Timoxiacético	1,61 c	2,07	1,75	1,66	1,63	4,81	1,90 abc	2,36	2,48
Timol	2,78 abc	2,37 c	1,83 c	1,68 c	1,64 bc	10,70 c	1,53 bc	2,78 abc	2,17
Água Destilada	3,86 a	3,41 a	2,10 a	1,76 a	1,66 a	15,06 a	3,60 a	2,69 a	1,47 a
Solvente	3,61 b	3,12 b	2,02 b	1,74 b	1,65 b	15,40 b	2,73 b	2,72 b	1,49 b
Glifosato	1,34 c	2,82 c	1,95 c	1,72 c	1,65 c	11,00 c	2,56 c	2,68 c	1,42 c
Tratamento	Pós-emergente								
	MFR	MFPA	MSR	MSPA	CR	CPA			
Ácido Timoxiacético	1,54 b	1,26 c	1,12 abc	1,06 ac	15,00 abc	3,60 bc			
Timol	1,50 b	1,24 ab	1,10 abc	1,06 ac	14,83 abc	3,16 abc			
Água Destilada	1,89 a	1,25 a	1,14 a	1,07 a	16,23 a	4,73a			
Solvente	1,49 b	1,26 b	1,08 b	1,08 b	15,26 b	3,83 b			
Glifosato	1,81 c	1,24 c	1,16 c	1,07 c	14,23 c	3,50 c			

Em que: IVG- representa o índice de velocidade de germinação, MFR- massa fresca da raiz, MFA- massa fresca da parte aérea, MSR- massa seca da raiz, MSA- massa seca da parte aérea, CR- crescimento radicular, CA – crescimento da parte aérea, CE - condutividade elétrica, LK – lixiviação de potássio.

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

Para os resultados de pós-emergência de plântulas de sorgo, o ácido timoxiacético apresentou efeitos semelhantes ao do C+, como queima das folhas e redução do sistema radicular e parte aérea (Figura 7). Desse modo, houve

decréscimo em todas as variáveis analisadas nos tratamentos, quando comparados com o C-. No entanto, a redução do CR, CPA e do IVG foram superiores à inibição ocasionada pelo glifosato (Tabela 6).

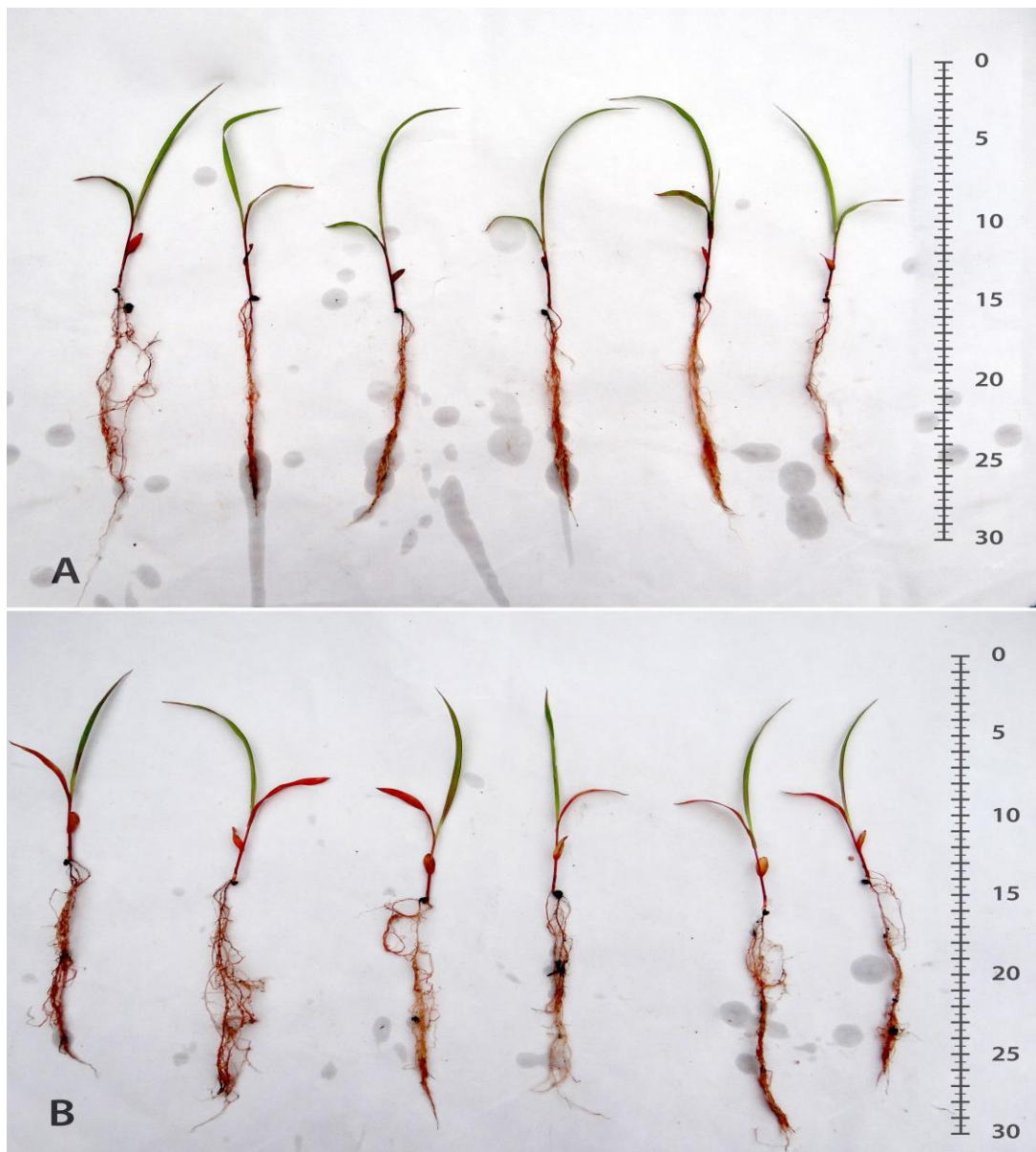


Figura 7. Plântulas de sorgo sob efeitos semelhantes provocados pelo herbicida comercial glifosato (A) e (B) ácido timoxiacético com 4 dias de exposição.

PINHEIRO et al. (2015), estudando o efeito do óleo essencial de *P. amboinicus* e de seus componentes majoritários carvacrol e timol, concluíram que os componentes testados apresentaram efeito na germinação tanto da alface quanto do sorgo, porém, os resultados na alface, assim como no presente estudo,

foram mais expressivos. No entanto, De ASSIS ALVES et al. (2018), estudando a ação do ácido timoxiacético, constataram que da mesma forma que o 2,4-D, ele possui caráter seletivo, pois apresentou efeito apenas em eudicotiledônea, divergindo-se dos resultados obtidos nesse estudo com efeitos também sobre monocotiledôneas (Figura 7).

ZUNINO e ZYGADLO (2004) estudando o efeito do timol verificaram que ele também inibiu o crescimento do milho (monocotiledônea), sendo esta inibição decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio, com a consequente modificação nos lipídios da membrana. De acordo com FERREIRA e AQUILA (2000), a alteração na germinação das sementes pode afetar a permeabilidade das membranas, a transcrição do DNA e tradução das proteínas, o funcionamento dos mensageiros secundários, a respiração, o sequestro de oxigênio, a conformação das enzimas e receptores. Sendo assim, o timol e o ácido timoxiacético, na concentração de 3 mmol L⁻¹ interferiram negativamente sobre o crescimento das duas espécies de monocotiledôneas e nas três espécies de eudicotiledôneas estudadas. O índice de velocidade de germinação foi reduzido para todas as espécies e está diretamente relacionado ao aumento de lixiviação de potássio dessas sementes tratadas (Figura 8).

Portanto, esses resultados expostos na Figura 8 estão relacionados com a capacidade que os aleloquímicos testados apresentam de fragilizar a integridade da membrana celular e provocar mudanças a partir da condutividade elétrica e incremento na lixiviação de potássio. Os monoterpenos atuam nos fosfolipídios da membrana, alterando a composição destes fosfolipídios, como mecanismo de resposta quando essas plantas são submetidas aos estresses hídrico e oxidativo, causando vários distúrbios em processos fisiológicos e bioquímicos (ZUNINO e ZYGADLO, 2004, AMRI et al., 2013). 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 iônicas, determinam o desbalanceamento do pH celular e reduzem a concentração dos íons. Essa variação pode inibir a síntese de ATP e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode ocasionar a ruptura de membranas determinando na necrose celular e redução na germinação verificadas a partir do teste de correlação de Pearson nesse estudo (Tabela 7).

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre o índice de velocidade de germinação (IVG), condutividade elétrica (CE) e lixiviação de potássio (LK) dos tratamentos e germinação das sementes em casa de vegetação.

	Alface	Caruru	Pepino	Pé de Galinha	Sorgo
IVG -LK	-0,80*	-0,85*	-0,60ns	-0,84*	-0,84*
IVG- CE	0,50ns	-0,84*	-0,79*	-0,75*	-0,63ns
CE-LK	-0,08ns	0,96*	0,93*	0,96*	0,38ns

^{ns}Não significativo. * Significativo em nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

O teste da condutividade elétrica determina todos os aspectos de vigor das sementes que podem influenciar no estabelecimento das plântulas em condições de campo. Este teste é baseado no vigor das sementes testadas estando intimamente relacionado à integridade do sistema de membranas celulares. Desse modo, quando as sementes são imersas nos tratamentos durante o processo de embebição, ocorre a liberação de solutos citoplasmáticos no meio líquido, em intensidade proporcional ao estado de desorganização em que se encontram as membranas (MARCHI; CÍCERO, 2002). Os resultados do presente estudo indicaram a existência de uma fitotoxicidade do timol e do ácido timoxiacético sobre a qualidade fisiológica das cinco espécies testadas (Tabela 7).

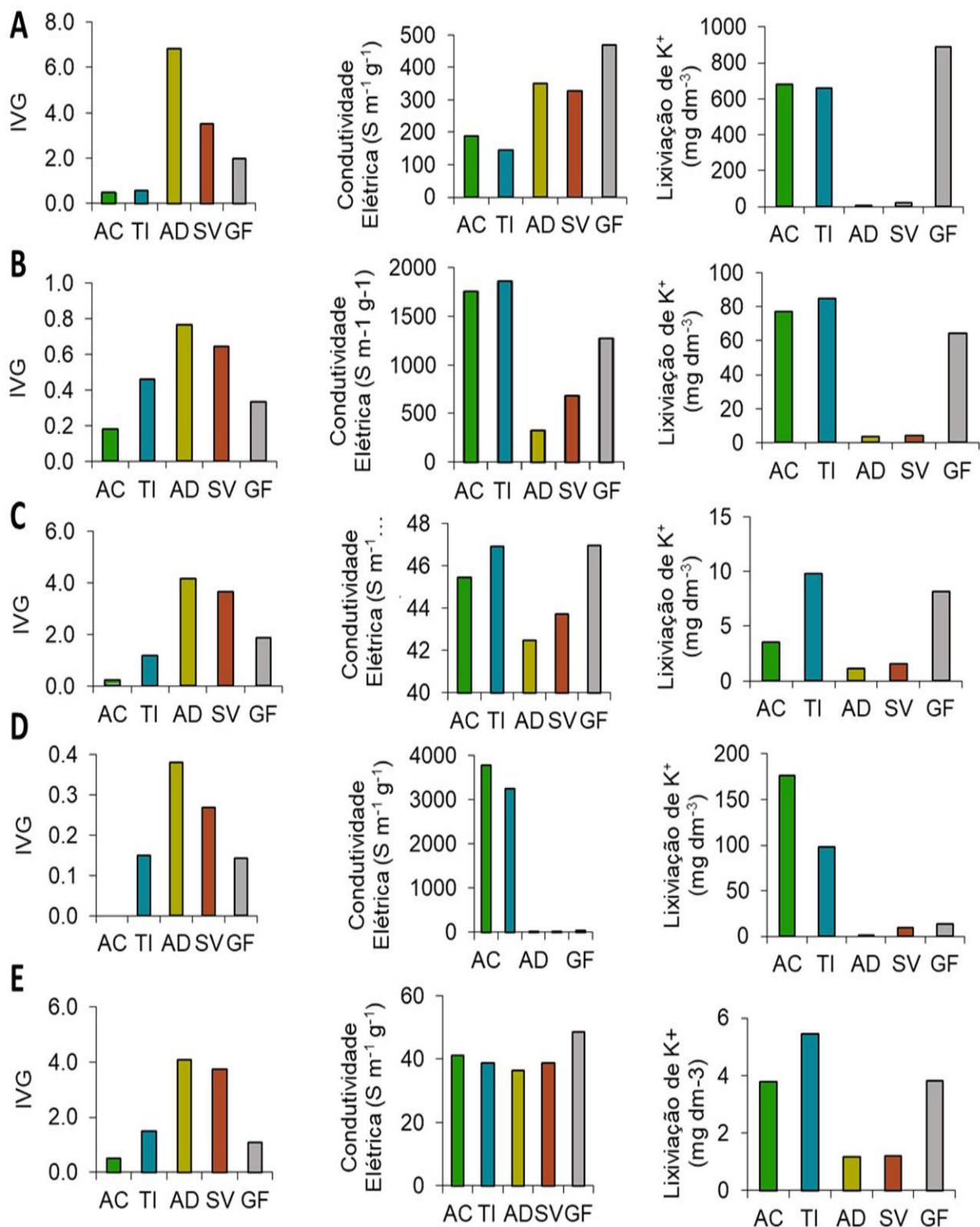


Figura 8. Redução do IVG das 5 espécies estudadas e sua relação com o aumento da condutividade elétrica e da lixiviação de potássio dessas sementes. Em que :A- representa a espécie Alface, B- Caruru, C- Pepino, D- Pé-de-Galinha, E- Sorgo, AC- Ácido timoxiacético, TI- Timol, AD- Água destilada, SV- Solvente e GF- Glifosato.

A elevação nos valores de condutividade elétrica pode manter relação com a redução de valores do índice de velocidade de germinação e o aumento da lixiviação de potássio, uma vez que estes atributos do vigor das sementes estão relacionados com alterações na fluidez e permeabilidade das membranas celulares (ABU-ROMMAN et al., 2010, HUSSAIN; REIGOSA 2011). A emergência de plântulas em casa de vegetação foi reduzida para todas as espécies, devido ao aumento da lixiviação de potássio (Figura 8). Tais resultados podem ser atribuídos a ação dos aleloquímicos, que atuam diretamente nos processos de degradação celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (QIAN et al., 2009), afetando o vigor das sementes (SILVA et al., 2011).

O tratamento com água destilada reduziu a condutividade elétrica e a lixiviação de potássio na solução, e contribuiu com o acréscimo do índice de velocidade de germinação de plântulas das espécies avaliadas. Tal efeito é justificado pela correlação que existe entre essas variáveis, visto que em sementes tratadas com as soluções herbicidas houve aumento da condutividade elétrica, da lixiviação de potássio e como consequência a redução do IVG (Tabela 7 e Figura 8).

O potássio é um nutriente de alto requerimento pelas plantas. A nutrição potássica é substancial ao crescimento e desenvolvimento vegetativo, atuando em diversas funções metabólicas como fotossíntese, estabilização do pH, regulação osmótica, absorção iônica e síntese proteica. No entanto, o excesso deste mineral no solo ou substrato resulta em redução da absorção de água pelas raízes das plantas, bem como prejudica a absorção de cálcio e magnésio por inibição competitiva (FAQUIN, 2005).

4.2 Genotoxicidade

As análises moleculares reforçam e complementam o observado na fitotoxicidade, elucidando os efeitos mutagênicos dos princípios ativos do timol e do ácido timoxiacético e modificações provocadas no DNA, verificado pelos valores de dissimilaridade encontrados entre essas moléculas em relação aos controles negativos e a similaridade entre o controle positivo.

Os marcadores ISSR permitiram observar que a aplicação dos princípios ativos promoveu alterações no DNA, que podem ter relação com o aumento da lixiviação de potássio na solução e inibição da germinação e crescimento inicial das cinco espécies estudadas.

No teste molecular, os compostos timol e ácido timoxiacético apresentaram caráter tóxico semelhante ou superior ao herbicida glifosato, visto que provocaram alterações no DNA de raízes e parte aérea das plântulas. As proximidades dos indivíduos tratados com tais moléculas se diferenciaram dos grupos dos indivíduos tratados com os controles negativos água e solvente, tanto para eudicotiledôneas como para as monocotiledôneas (Figura 9 e 10), reforçando os efeitos anteriormente descritos nas análises de fitotoxicidade.

Na análise molecular, verificou-se que o timol foi mais efetivo em eudicotiledôneas, evidenciada pelos maiores valores de dissimilaridade entre DNA de raiz e parte aérea, em relação aos controles negativos, assim como observados nas análises macroscópicas em pós-emergência. O mesmo foi verificado para ácido timoxiacético, porém as diferenças no DNA entre parte aérea e raiz para esse composto foram menores, permanecendo no mesmo grupo (Figura 9 e 10).

Ao avaliar os DNAs de raiz e parte aérea de alface tanto em pré (Figura 9, A) quanto em pós-emergência (Figura 9, B), observou-se que o tratamento com água agrupou tanto parte aérea quanto raiz, enquanto o glifosato promoveu uma elevada alteração na raiz e formou um grupo isolado e mais dissimilar entre todos os compostos testados. Outro composto que promoveu alteração significativa na raiz foi o timol, que também foi agrupado em outro grupo isolado. Entretanto, ao analisar parte aérea em relação ao timol, o mesmo não provocou muitas alterações moleculares, pois ficou agrupado com o tratado com solvente (controle negativo) (Figura 9, A-B).

Para a espécie Caruru em pré-emergência não foi observada diferença entre os tratamentos com ácido timoxiacético, água, glifosato, timol e solvente para as raízes, enquanto a parte aérea dos controles negativos água e solvente formou grupos isolados (Figura 9, C). Essa menor separação de grupos pode ser devido à baixa amplificação dos marcadores observada para a espécie. Para o tratamento pós-emergente, o timol e o glifosato quando avaliada a parte aérea, formaram um único grupo com 100% de similaridade entre os tratamentos, o mesmo foi observado para utilização dos compostos nas raízes, as quais formaram um grupo

conjunto mas com uma dissimilaridade de 20% entre os compostos, com distância genética de, aproximadamente, 0,04. Os solventes não diferiram nos tratamentos de raízes, formando um grupo com 100% de similaridade, dentro desse mesmo grupo ficaram agrupados também os tratamentos com solvente para parte aérea. O ácido timoxiacético formou um grupo isolado com parte aérea e raiz (Figura 9, D).

Ao avaliar pepino em pré-emergência foi observada a formação de três grandes grupos, nos quais, no primeiro grupo há a presença apenas do composto ácido timoxiacético, com 100% de similaridade entre os DNAs de raiz e parte aérea, sugerindo que a atuação do princípio ativo para essa espécie seja similar em ambas as partes da planta, evidenciando seu efeito tóxico, quando comparada com os resultados macroscópicos, no qual o desenvolvimento normal das plântulas de pepino foi afetado. No segundo grupo ficou evidenciada a similaridade entre os tratamentos com água e solvente, tanto para parte aérea, quanto para raiz. Ainda nesse grupo foi observada a presença da raiz tratada com timol, o que pode sugerir que o efeito mutagênico do timol em raiz em pré-emergência é quase nulo para essa espécie, devido à proximidade com os controles negativos, entretanto, seu efeito na parte aérea é bastante pronunciado, considerando que o mesmo ficou agrupado no terceiro grande grupo, juntamente com o tratamento com o glifosato (controle positivo) (Figura 9, E). Ao contrário do ocorrido em pré-emergência, quando o timol foi utilizado em pós-emergência para o pepino, foi verificado um efeito na raiz, semelhante ao glifosato (Figura 9, F).

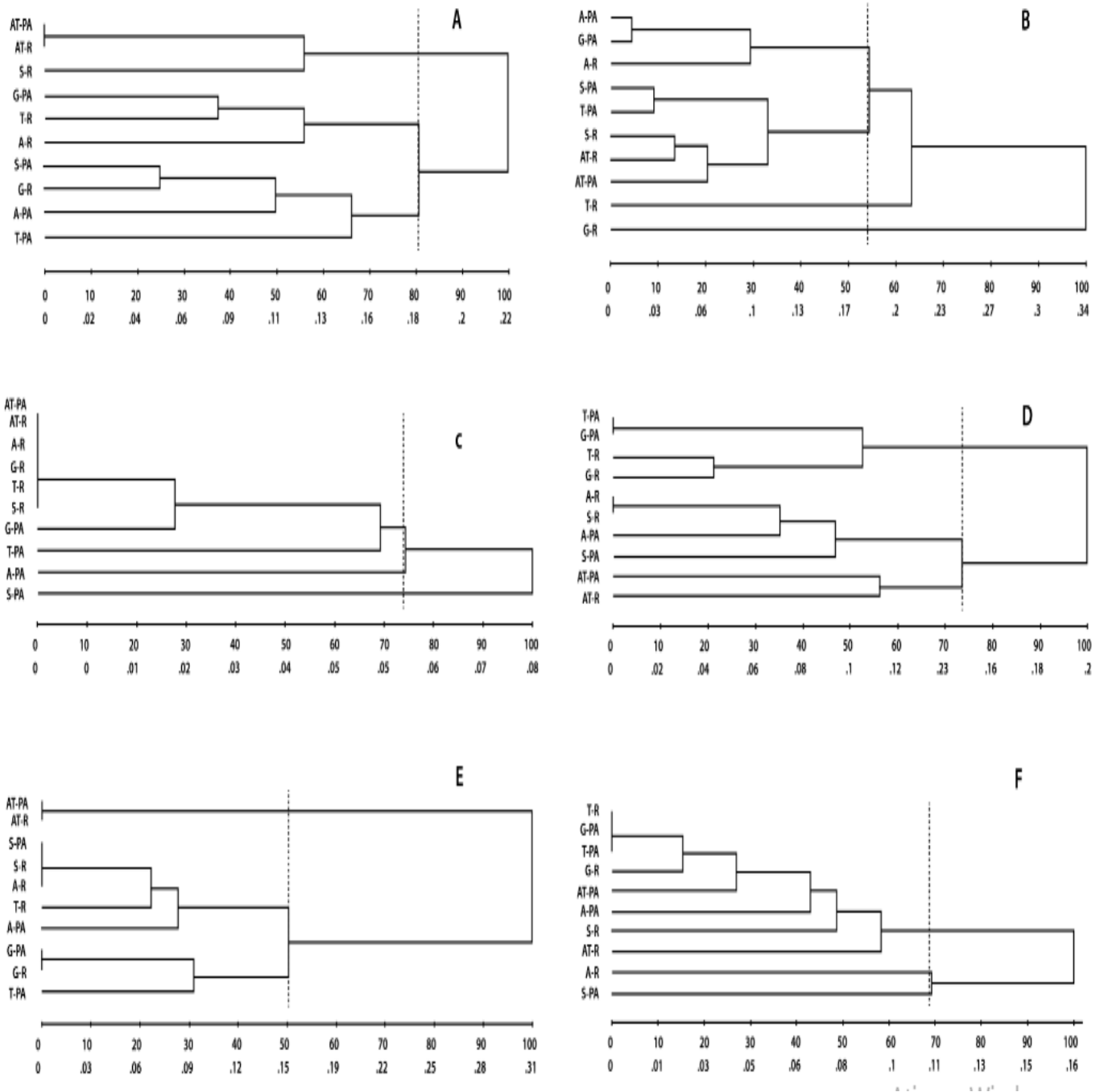


Figura 9. Agrupamento UPGMA das espécies eudicotiledôneas para todos os tratamentos, utilizando primers ISSR. Em que: A- Alface pré, B- alface pós, C- Caruru pré, D- caruru pós, E- pepino pré, F- pepino pós, eAT- ácido timoxiacético, A- água, T- Timol, S- solvente, G- glifosato, R- Raiz e PA- parte aérea.

Na avaliação de parte aérea das monocotiledôneas, tais plantas foram severamente afetadas pelo uso do ácido timoxiacético, pois houve formação de um grupo isolado, contendo somente esse tratamento, com dissimilaridade de 0,14 com os demais grupos. Entretanto, não foram observados efeitos mutagênicos de nenhum dos princípios ativos ao avaliar raízes em pós-emergência para o capim pé-de-galinha, uma vez que todas obtiveram 100% de similaridade, incluindo os controles positivos e negativos (Figura 10, B).

Para as análises com sorgo em pré-emergência, foi verificado que o ácido timoxiacético não causa alterações diferentes em parte aérea e raiz, pois os mesmos obtiveram 100% de similaridade e formaram um grupo isolado. Outro composto que merece destaque é o timol, pois se observa que o mesmo tem capacidade de ocasionar efeitos que levaram a diferenciação da raiz tratada com os demais tratamentos, formando um único grupo (Figura 10, C). Para tratamentos de pós-emergência, houve a formação de três grandes grupos, o timol promoveu maior diferenciação nas raízes, sendo agrupado juntamente com o ácido timoxiacético (parte aérea e raiz), enquanto a parte aérea ficou agrupada juntamente com os controles negativos. Isso permite inferir que o efeito do timol é mais pronunciado nas raízes do que na parte aérea de sorgo (Figura 10, D).

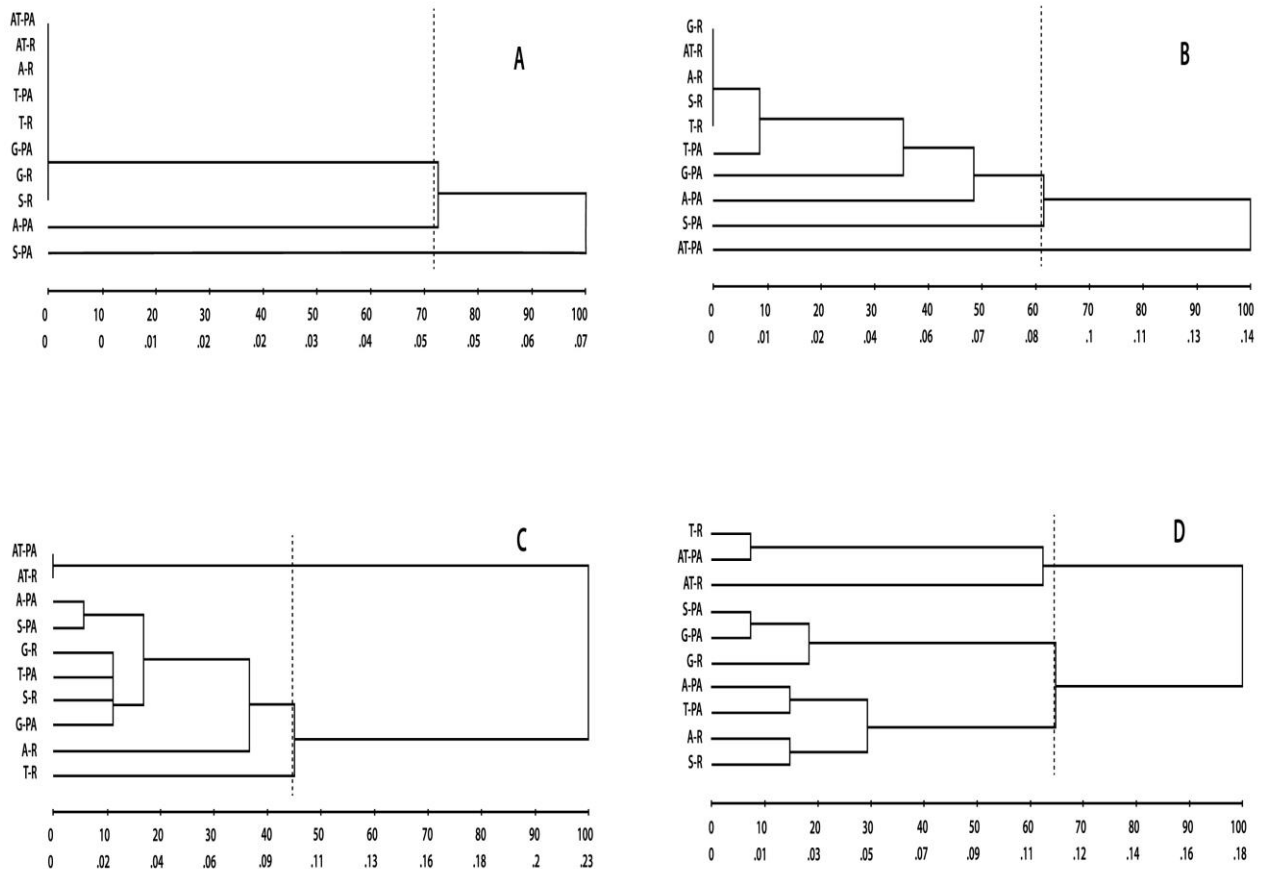


Figura 10. Agrupamento UPGMA das espécies monocotiledôneas para todos os tratamentos, utilizando primers ISSR. Em que: A- Pé-de-Galinha pré, B- pé-de-galinha pós, C- Sorgo pré, D- Sorgo pós, AT- ácido timoxiacético, A- água, T- Timol, S- solvente, G- glifosato, R- Raiz e PA- parte aérea.

O timol apresentou mais divergência entre DNA de raízes e parte aérea, diferentemente do ácido timoxiacético, que na maioria das vezes ficaram agrupados juntos (parte aérea e raiz).

A correlação entre as análises macroscópicas, e moleculares, foi verificada por meio das alterações observadas no DNA provocadas pelos compostos. Os marcadores moleculares ISSR permitiram detectar a genotoxicidade provocada pelo timol e ácido timoxiacético, segundo AL-QURAINY (2010), esses marcadores podem ser usados para a medição quantitativa e qualitativa da atividade genotóxica.

5. CONCLUSÕES

O timol e o ácido timoxiacético possuem atividades fitotóxica e genotóxica.

O efeito tóxico do ácido timoxiacético é mais efetivo em pré-emergência e do timol em pós-emergência.

O timol e o ácido timoxiacético promovem danos na raiz e parte aérea como observados nas alterações em nível de DNA de monocotiledôneas e eudicotiledôneas.

O efeito bio-herbicida das moléculas de timol e do ácido timoxiacético exacerbou a redução de custos da produção agrícola, bem como a redução do impacto ambiental causado pelo uso desordenado e crescente de agrotóxicos.

6. REFERÊNCIAS

ABU-ROMMAN, S.; SHATNAWI, M.; SHIBLI, R. Allelopathic Effects of spurge (*Euphorbia hierosolymitana*) on wheat (*Triticum durum*). **American Eurasia Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 7, n.3, p. 98-30, 2010.

AIRES, S. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 339-344, abr./jun. 2005.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Ed.). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Pelotas: Editora UFPel. 2014. p. 9-32.

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP consultoria e AgroInformativos. 2010. 496 p.

AHUJA, N.; SINGH, H. P.; BATISSH, D. R.; KOHLI, R. K. Eugenol-inhibited root growth in *Avena fatua* involves ROS-mediated oxidative damage. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 64-70, 2015.

ALVES, Clovis Tadeu; TEDESCO, JOÃO CARLOS. A revolução verde e a modernização agrícola na mesorregião noroeste do Rio Grande do Sul–1960/1970. **Revista Teoria e Evidência Econômica**, v. 21, n. 45, 2015.

AL-QURAINY, F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 467-474, 2010.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2012.

AMRI, Ismail et al. Reviews on phytotoxic effects of essential oils and their individual components: news approach for weeds management. **Int J Appl Biol Pharmac Technol**, v. 4, p. 96-114, 2013.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANVISA. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília: ANVISA.2010412. 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>>. (Acessoem: 23 Maio 2018).

APPLEBY, A. P. A history of weed control in the United States and Canada - a sequel. **Weed Science**, v. 53, p. 762-768, 2005.

ARAUCÁRIA SEMENTES, 2010. Disponível em http://www.sementesaraucaria.com.br/sorgo_forrageiro.php. (Acessoem: 13 Maio 2018).

ARAS, S., AYDIN, S.S., KÖRPE, D.A., DÖNMEZ, C. Comparative Genotoxicity Analysis of Heavy Metal Contamination in Higher Plants. In: Dr. GhousiaBegum (Ed.), **Ecotoxicology**, 2012.ISBN: 978-953-51-0027-0, InTech, DOI: 10.5772/30073,2012.

ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. M.; AMARAL A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C. A. N.; NEVES C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n.1, p. 115-130, 2007.

AZIRAK, S., KARAMAN, S. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. Acta Agricultura e Scandinavica Section B, **Soil and Plant Science**, 58(1), 88-92, 2008.

BANKS MK e SCHULTZ KE. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 167: p. 211-219, 2005.

BARBOSA R.M.e GALTER, I.N.; PEREIRA, C.L; MARTINS, L.A.R.; SILVA, K.S.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. **Eficiência do pepino como modelo em bioensaios de fitotoxicidade**. Resumos Expandidos do I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO Universidade Católica de Pernambuco - Recife - PE - Brasil -(v.2); 2013.

BELCHIOR, D. C. V.; SARAIVA A. S.; LÓPEZ A. M. C.; SCHEIDT G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília. v. 34, n. 1, p. 135-151, jan./abr. 2014.

BOHNER, T. O. L.; ARAÚJO, L. E. B. & NISHIJIMA T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM. v. 8, p. 329-341. 2013.

BOMBARDI, L. M. Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. Laboratório de Geografia Agrária. FFLCH - USP, **São Paulo**, 2017.

BOMBARDI, L. M. Agrotóxicos e agronegócio: arcaico e moderno se fundem no campo brasileiro. Direitos Humanos no Brasil 2012. **Relatório da Rede Social de Justiça e Direitos Humanos**. São Paulo, 2012.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.

CASTILLO, Ricardo et al. Regiões do agronegócio, novas relações campo-cidade e reestruturação urbana. **Revista da ANPEGE**, v. 12, n. 18, p. 265-288, 2016.

COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy** (Online), 35, P. 271-276, 2013.

DAL POZZO, M., VIÉGAS, J., SANTURIO, D. F., ROSSATTO, L., SOARES, I. H., ALVES, S. H., COSTA, M. M. D. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, 11, p. 54-56, 2011.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant physiology**, 166.3: p. 1090-1105, 2014.

DE ASSIS ALVES, THAMMYRES et al. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial Crops and Products**, v. 114, p. 59-67, 2018.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, p. 13–15, 1990.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

DUKE, S. O., DAYAN, F. E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. In AmChem **SocSymp** Ser Vol. 1204, p. 79-92, 2015.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2010b. Disponível em <http://panorama.cnpms.embrapa.br/plantasdaninhas/plantasdaninhas/identificacao/folhas-estreitas>. (Acesso em: 23 Maio 2018).

FAQUIN, Valdemar. Nutrição mineral de plantas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 182, 2005.

FERNANDES, T. C. C., MAZZEO, D. E. C., MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, 72(6), p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n. 12, p. 175-204, 2000.

FERRREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Ed. **Artimed**. 323 p. 2004.

FERREIRA, MARIA LEONOR PAES CAVALCANTI. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, v. 15, n. 3, p. 18-45, 2015.

GEIGER, D. R.; FUCHS, M. A. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Ed.). *Herbicide classes in development*. Berlin: **Springer-Verlag**, p. 59-85, 2002.

GERAGE, M. J. **Exposição aos resíduos de agrotóxicos por meio do consumo alimentar da população brasileira**. 2016.102f. Dissertação, (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba, 2016.

GIARDI, M. T.; GUZZELLA, L.; REEUZET, P.; ROUILLON, R.; ESPOSITO, D. Detection of herbicide subclasses by an optical multi biosensor based on an array of photosystem II mutants. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5378-5384, 2005.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), p. 175-185, 1994.

GRANT, W, F. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**, p. 291–307, 1998.

HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds**; 2017. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 14 maio 2018.

HUSSAIN, M.I. REIGOSA, M. J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, nonphotochemical fluorescence quenching, and heatenergy dissipation in three C3 perennial species. **Journal of Experimental Botany** 62(13):453-454, 2011.

KASUGAI, S., HASEGAWA, N., OGURA, H. 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), p. 127-130, 1991.

KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Sci.**, v. 53, p. 84-89, 2015.

KORDALI, S., CAKIR, A., OZER, H., CAKMAKCI, R., KESDEK, M.; METE, E. 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, 2008.

KUDSK, P.; STREIBIG, J. C. Herbicides - a two-edged sword. **Weed Research**, v. 43, p. 90-102, 2003.

LEAL, U. A. S., SILVA, G. N., KARAM, D. Otimização Dinâmica Multiobjetivo da Aplicação de Herbicida Considerando a Resistência de Plantas Daninhas. **Biomatemática**, v.22, p.1-16, 2012.

- LEI, K., HUA, X. W., TAO, Y. Y., LIU, Y., LIU, N., MA, Y., ... KONG, C. H., 2016.
- LIVINGSTON, M.; FERNANDEZ-CORNEJO, J.; UNGER, J.; OSTEEEN, C.; SCHIMMELPFENNIG, PARK, T.; LAMBERT, D. The economics of glyphosate resistance management in corn and soybean production. Washington: USDA, **Economic Research Service**, (Economic Research Report, 184) p. 45 , 2015.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177,1962.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 547-555, jul./ago. 2006.
- MARCHI, J. L.; CÍCERO, S. M. Procedimentos para a condução do teste de condutividade elétrica em sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, n. 12, p. 20-27, 2002.
- NERY, M. C.; NERY, F. C.; GOMES, L. A. A. O mercado e a participação de sementes de hortaliças no Brasil ,2015.
- OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Efeito alelopático de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, n. 18, p. 401-406, 2004.
- OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90- 103, 2011.
- OLIVEIRA, T. G., FAVARETO, A. P. A., ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. Periódico Eletrônico; **Fórum Ambiental** da Alta Paulista, 9(11), 2013.
- PANNELL, D. J.; TILLIE, P.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; ERVIN, D.;FRISVOLD, G. B. Herbicide resistance: economic and environmental challenges. **AgBioForum**, v. 19, n. 2, p. 136-155, 2016.

PEREIRA, M.P., PEREIRA, F.J., RODRIGUES, L.C.A., BARBOSA, S., de Castro, E.M. **Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular.** Revista Agroambiente On-line 1 (7): p. 36-43, 2013.

PINHEIRO, P. F., COSTA, A. V., ALVES, T. D. A., GALTER, I. N., PINHEIRO, C. A., PEREIRA, A. F., ... FONTES, M. M. P. **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),p. 8981-8990, 2015.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida.** 1992. 125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

QIAN, H., XU, X., CHEN, W., JIANG, H., JIN, Y. LIU, W. Allelo chemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere** 75(3):368-375,2009.

RAJ, S. N.; DEEPAK, S. A.; BASAVARAJU, P.; SHETTY, H. S.; REDDYB, M. S.; KLOEPPER, J. W. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. **Crop Protection**, v. 22, p. 579-588, 2003.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 539–549, 2007.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa: Editora UFV, p. 365p, 2007.

SILVA, L. O. C. et al. Action of *Eleusine coracana* in the remediation of soils contaminated with picloram. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 627-632, 2012.

SILVA, V.S., CÂNDIDO, A.C.S., MULLER, C., LAURA, V.A., FACCENDA, O., SIMIONATTO, E., HESS, S.C. PERES, M.T.L.P. **Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae)**. Acta Botanica Brasilica 25(1):95-104,2011.

SILVEIRA, G. L., LIMA, M. G. F., REIS, G. B., PALMIERI, M. J., ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: **Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.** Chemosphere, 178, p. 359-367, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1102, 2010.

SINDAG - SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. 2005. Disponível em: Acesso em: 05 maio 2018.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. **Allelopathic potential of *Myrciaguianensis***. Planta daninha, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

TEIXEIRA, CÍCERO MONTI; ARAÚJO, JOÃO BATISTA SILVA; DE CARVALHO, GABRIEL JOSÉ. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.) **Cover plants allelopathic potential in *Bidens pilosa* L. control**. Ciência e Agrotecnologia, v. 28, n. 3, p. 691-695, 2004.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. **Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned**; Weed Science, v. 50, p.700-712, 2002.

VALENTE, V. M. M. **Síntese e atividade biológica de pironas e piridinonas derivadas do ácido desidroacético**. Tese (Doutorado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2010.

VALERIO, M. E., Garcia, J. F., PEINADO, F. M. **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, 2007.

VILA-AIUB, M. M.; GHERSA, C. M. Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. **European Journal of Agronomy**, v. 22, p. 195-207, 2005.

WEED SCIENCE. International Survey of Herbicide Resistant Weeds, 2017. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/>>. Acesso em: 09 maio 2018.

WEIR, TIFFANY L.; PARK, SANG-WOOK; VIVANCO, JORGE M. **Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals**. *Current opinion in plant biology*, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004.

YANG, DENNIS TAO; ZHU, XIAODONG. Modernization of agriculture and long-term growth. **Journal of Monetary Economics**, v. 60, n. 3, p. 367-382, 2013.

ZANATTA, J. F.; PROCÓPIO, S. O.; MANICA, R.; PAULETTO, E. A.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L.; SGANZERLA, D. C.; ROSENTHAL, M. D' A.; PINTO, J. J. O. Teores de água no solo e eficácia do herbicida fomesafen no controle de *Amaranthushybridus*. **Planta daninha**, v. 26, n.1, p. 143-155, 2008.

ZHOU, X.; LARSON, J. A.; LAMBERT, D. M.; ROBERTS, R. K.; ENGLISH, B. C.; BRYANT, K. J. **Farmer experience with weed resistance to herbicides in cotton production**. *AgBioForum*, v. 18, n. 1, p. 114-125, 2015.

ZILLI, J. E.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M. P.; RUMJANEK, N. G. **Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycinemax (L.) Merrill*) e em características microbiológicas do solo**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 32, n. 2, p. 633-642, mar./abr. 2008.

ZUNINO, MARÍA P.; ZYGADLO, JULIO A. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 303-309, 2004