

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

SÍNTESE, CITOTOXICIDADE E MECANISMO DE AÇÃO DE 1,2,3-TRIAZÓIS CLORADOS EM MERISTEMAS RADICULARES DE *Lactuca sativa*

Thayllon de Assis Alves¹, Thammyres de Assis Alves¹, Mariana Belizario de Oliveira¹, Aidene de Fátima Camilo Faria¹, Vagner Tebaldi de Queiroz¹, Milene Miranda Praça-Fontes¹, Adilson Vidal Costa¹

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/
Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES,
Brasil, thayllonalves@gmail.com, thammyresalves@gmail.com, belizmary@hotmail.com,
aidenecfaria@gmail.com, vagner.queiroz@ufes.br, milenemiranda@yahoo.com.br,
avcosta@hotmail.com

Resumo

O Brasil depende fortemente da agricultura para obter renda, resultando em maior uso de insumos agrícolas, principalmente agroquímicos. Herbicidas à base de glifosato, como o Roundup, são amplamente utilizados, devido à sua natureza não seletiva no controle de plantas daninhas. No entanto, o uso indevido, aplicação de maiores dosagens e mais frequente, leva ao aparecimento de plantas resistentes e intoxicação do produtor. Em função disto, o estudo visa identificar novos derivados triazólicos do glicerol que possam agir como herbicidas. Efeitos citotóxicos significativos nas células meristemáticas das raízes da planta modelo *Lactuca sativa* foram observados, como aderência cromossômica, c-metáfases e pontes cromossômicas. Todos os derivados exibiram citotoxicidade, diferindo no tipo e grau de alteração. As alterações observadas sugerem efeitos clastogênicos, alterando estruturas cromossômicas, e efeitos aneugênicos, causando disfunção do fuso mitótico durante a mitose. Em conclusão, os derivados triazólicos estudados apresentam bioatividade e potencial como herbicidas alternativos. Possuem mecanismos de ação diferentes dos herbicidas comerciais, o que poderia auxiliar no controle de plantas invasoras.

Palavras-chave: Bioensaio, Citogenotoxicidade, Triazol. Herbicidas.

Área do Conhecimento: Genética.

Introdução

A agricultura é uma das principais áreas de renda do Brasil e, com o aumento da produção, cresceu também o consumo de insumos agrícolas. Dentre estes insumos, os mais utilizados são os agroquímicos para controle de organismos indesejáveis, sendo os herbicidas a base de glifosato os mais utilizados mundialmente (PROBST, 2021). O Brasil é um dos principais consumidores destes químicos (BRITO e YADA, 2018).

A ampla utilização dos compostos que têm o glifosato como princípio ativo é o fato dele ser não-seletivo, então tem potencial para controlar uma diversidade de plantas daninhas (BRITO e YADA, 2018). Com o aparecimento de plantas invasoras resistentes, surge então a utilização de forma incorreta destes agroquímicos por parte dos agricultores, na qual ocorre o aumento das doses utilizadas, como também a maior frequência de utilização (AZIZ, 2020).

O aumento do consumo de herbicida acaba gerando danos à saúde, principalmente das pessoas que estão realizando as aplicações. Brito e Yada (2018) relatam que a repetida exposição, modo de uso, tempo de exposição e concentração utilizada, estão diretamente relacionados com os níveis de intoxicação por meio destes compostos. Neste cenário, o glifosato é apontado como um dos possíveis causadores de doenças neurodegenerativas, induzindo efeito cardiovascular e hepático, podendo causar câncer e distúrbios reprodutivos, como a infertilidade (STACHIW, 2019).

Os triazóis possuem atividade biológica comprovada, podendo substituir alguns fungicidas comerciais por exemplo. Além do efeito inibitório em fungos, os triazóis apresentaram ação em plantas modelo (COSTA et al., 2020).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Diante disso, o objetivo do trabalho foi sintetizar novos triazóis derivados do glicerol que apresentem bioatividade no ciclo celular de *L. sativa*, e identificar seus diferentes mecanismos de ação, identificando assim possíveis herbicidas com inibição ao desenvolvimento das plantas invasoras e menor efeito tóxico que os herbicidas comerciais disponíveis.

Metodologia

Síntese dos derivados triazólicos

A síntese dos 1,2,3-triazóis (**4a**, **4b** e **4c**) está descrita no artigo recém publicado pelo nosso Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS) (LIMA *et al.* 2023).

Ensaio Biológico

Utilizou-se como solução teste: triazol derivado do glicerol, as quais foram aplicadas em cinco concentrações (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Como controle negativo (CN) utilizou-se água e o solvente usado no preparo das soluções: diclorometano e, como controle positivo (CP) foi utilizado o glifosato, um herbicida comercial.

As sementes comerciais da eudicotiledônea *L. sativa* L. (alface) foram adquiridas em casa rural e utilizadas como modelos.

As raízes para análise citotóxica foram obtidas por meio da germinação em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com papel filtro fino e regadas com 2,5mL dos tratamentos. As placas foram lacradas com papel filme e adicionadas à uma câmara de germinação (BOD) à 25°C, onde ficaram armazenadas durante 48h (PINHEIRO *et al.*, 2015).

Dez raízes de cada repetição dos tratamentos foram coletadas e fixadas em Álcool etílico:Ácido Acético (3:1) e armazenadas a -4°C por pelo menos 24 horas. A análise citogenética foi realizada, sendo as lâminas preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com Orceína acética 2% (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014).

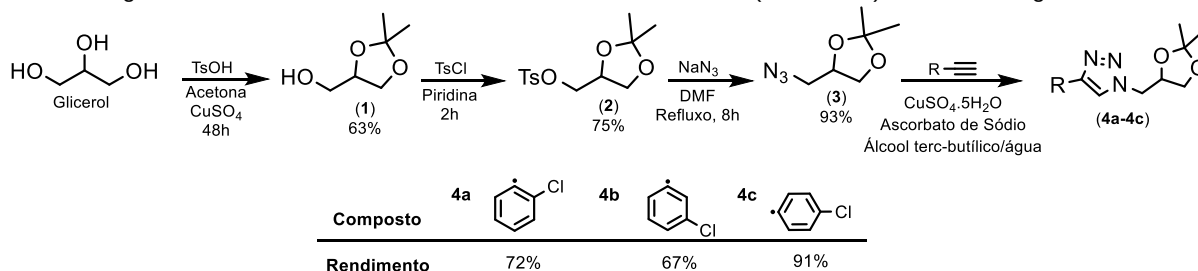
Avaliou-se cerca de 1000 células meristemáticas por tratamento, sendo observadas e quantificadas as diferentes fases da divisão mitótica e possíveis alterações cromossômicas e nucleares. Para obtenção do índice mitótico (IM) foi dividido o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. Já para as frequências das alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN) dividiu-se o número de alteração cromossômica e nuclear, respectivamente, pelo número total de células avaliadas (FISKESJÖ, 1985).

Os dados acessados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de significância, sendo este o mais indicado para experimentos com tratamentos e controles (BERNARDES *et al.*, 2015). As análises estatísticas foram realizadas no programa genes (CRUZ, 2013).

Resultados

A síntese e o rendimento dos 1,2,3-triazóis clorados foi realizada seguindo a rota de síntese apresentada na Figura 1 (LIMA *et al.*, 2023).

Figura 1 – Rota sintética e rendimentos dos triazóis clorados (**4a**, **4b** e **4c**) derivados do glicerol.



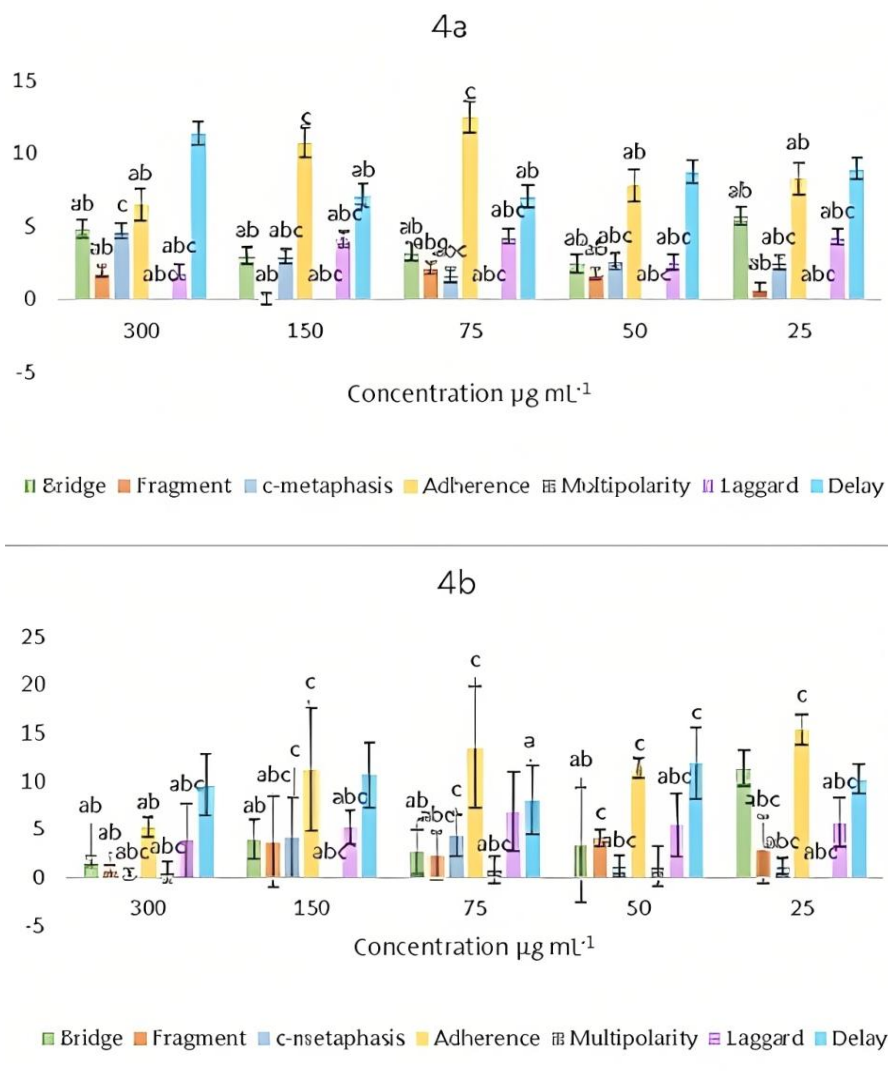
Fonte: Autor (2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

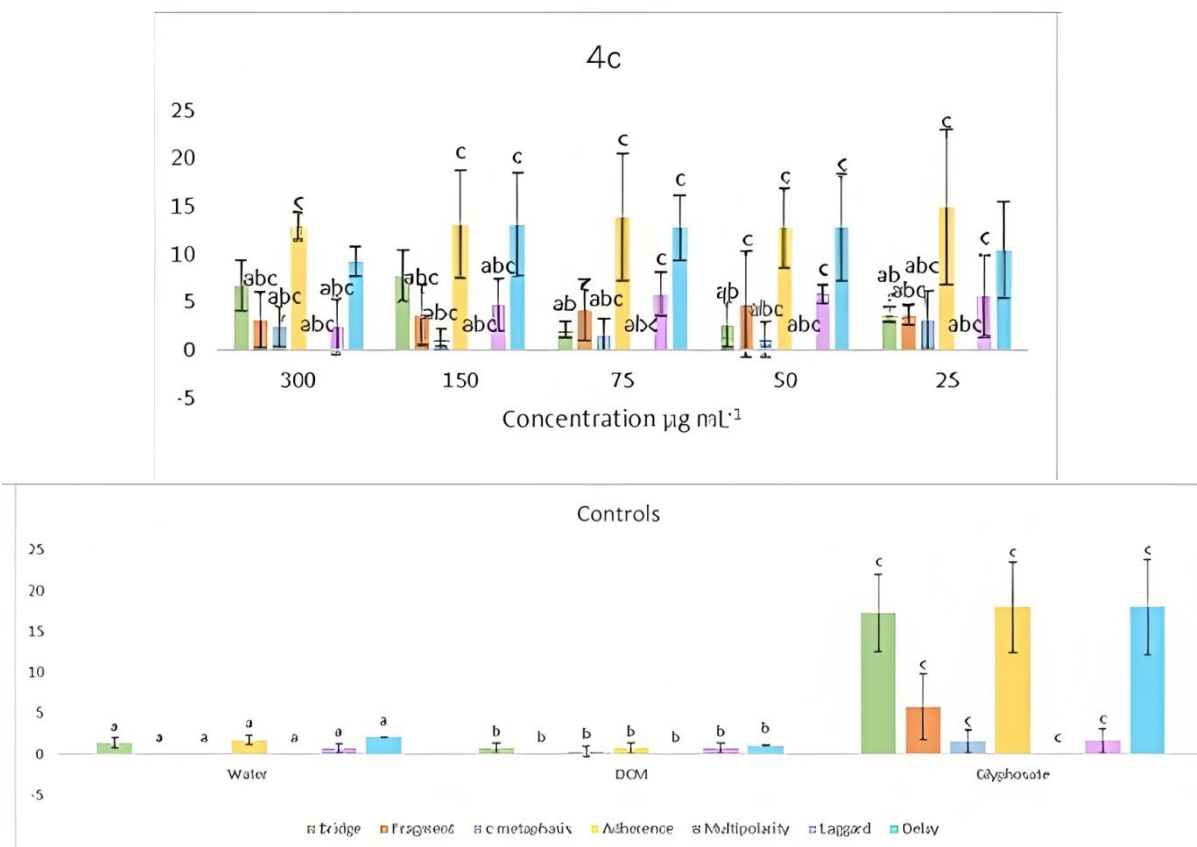
As sementes de *L. sativa*, foram submetidas às diferentes concentrações de triazóis, onde foi avaliado o meristema radicular através de análise microscópica, a partir destas análises foi possível identificar diferentes tipos de alterações cromossômicas, além de identificar os diferentes mecanismos de ação que os compostos possuem no ciclo celular.

Dentre as alterações observadas a mais significativa foram: cromossomos aderentes, c-metáfases e pontes (Figura 2). Dos três derivados avaliados, todos apresentaram algum tipo de citotoxicidade, variando o tipo de alteração e o nível entre eles.

Figura 2– Efeito citotóxico dos triazóis derivados do glicerol.



A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Fonte: Autor (2023).

Dentre as alterações observadas as que apresentaram maior diferença estatística dos controles negativos foram: cromossomos aderentes, c-metáfases e pontes (Figura 2). Dos três derivados avaliados, todos apresentaram algum tipo de citotoxicidade, variando o tipo de alteração e o nível entre eles.

A alteração de cromossomo aderente foi unânime em todos os três compostos testados, aparecendo em diversas concentrações diferentes de cada composto (Figura 2). Com destaque para as concentrações de 150 µg mL⁻¹, 75 µg mL⁻¹, que se igualaram ao controle positivo para os três triazóis. A molécula 4b e 4c ainda tiveram igualdade ao controle positivo nas concentrações 50 µg mL⁻¹ e 25 µg mL⁻¹. Apresentando assim cromossomo aderente em todas as moléculas e em diferentes concentrações.

A presença de c-metáfase foi observada na maior concentração da molécula 4a e nas concentrações de 150 µg mL⁻¹ e 75 µg mL⁻¹ da molécula 4b. As duas maiores concentrações da molécula 4c, apresentaram aumento na frequência de pontes cromossômicas. No entanto, foram superiores significativamente ao controle negativo, mas não se igualaram ao controle positivo, tal efeito também foi observado na menor concentração da molécula 4b, se mostrando eficiente, porém com menor taxa de formação de pontes cromossômicas.

Foi observado ainda a fragmentação cromossômica para as moléculas 4b e 4c, na concentração de 50 µg mL⁻¹ e ainda na concentração de 75 µg mL⁻¹ da molécula 4c. Ambas as moléculas nestas concentrações foram iguais ao controle positivo.

A molécula 4b na concentração de 50 µg mL⁻¹ foi a única a apresentar presença de multipolaridade, se diferenciando de todos os controles, estando superior ao controle positivo.

Estes resultados determinam diferentes modos de ação das moléculas testadas, apresentando alteração tanto cromossômica quanto nos fusos mitóticos.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

A avaliação dos efeitos oriundos da exposição das células meristemáticas de *L. sativa* aos diferentes tratamentos com triazóis derivados do glicerol, permitiu observar diferentes tipos de alterações cromossômicas, indicando diferentes mecanismos de ação destas moléculas. Tais resultados também foram observados por Bernades *et al.* (2023) em seu trabalho com moléculas triazólicas.

A observação de alterações como ponte, fragmentação e cromossomo aderente, definem a molécula como clastogênica, pois apresentam mudanças na sequência de DNA e estrutura do cromossomo. As alterações como c-metáfase, multipolaridade classificam as moléculas como aneugênicas (ALVES *et al.*, 2021).

Segundo Bernardes *et al.*, (2023) a presença de alterações cromossômicas e dos fusos mitóticos, estavam presentes em suas moléculas testadas. Essas alterações classificaram os compostos como efeito aneugênico e clastogênico. É importante encontrar moléculas com diferentes mecanismos de ação, pois assim facilita o controle de plantas invasoras. E evita o desenvolvimento de resistência por parte das plantas invasoras.

Conclusão

As moléculas estudadas, apresentaram efeito bioativo, podendo ser utilizadas como base para investigações de potencial para herbicidas sintéticos alternativos em campo. Apresentaram diferentes mecanismos de ação, tanto clastogênico, quanto aneugênico. E as alterações observadas foram significativas quando comparada com o controle negativo. Algumas alterações não tiveram igualdade ao controle positivo, indicando menor efeito citotóxico que o herbicida comercial utilizado.

Referências

ALVES, T. A. ; et al. Searching an auxinic herbicide to use as positive control in toxicity assays. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 93, p. 1, 2021.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of Jatropha curcas oil in Lactuca sativa root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)**, 86, 373-382, 2014.

AZIZ, Z, A. Efeitos tóxicos do glifosato. Dissertação (Mestrado integrado em Ciências Farmacêutica). **Instituto Universitário de Egaz Moniz**, 2020.

BARCELOS, F. F. ; et al. Synthesis of novel glycerol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their phytotoxic and cytogenotoxic activities. **ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS** , v. 95, p. 1-15, 2023.

BRITO, M, A; YADA, M, M. Impactos do Herbicida Glifosato na Saúde Humana: riscos provenientes da exposição e consumo residual. **V Simpósio de Tecnologia da Faculdade de Tecnologia de Taquaritinga**. São Paulo, 2018.

COSTA, A.; et al. Synthesis of Glycerol-Derived 4-Alkyl-Substituted 1,2,3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicidal, Phytotoxic, and Antiproliferative Activities. **Journal of the brazilian chemical society** , v. 00, p. 1-12, 2020.

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

LIMA, A. M. A. et al. Synthesis and fungicide activity on *Asperisporium caricae* of glycerol derivatives bearing 1,2,3-triazole fragments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 18, p. 6818-6829, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

FISKESJÖ, G., 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112.

PINHEIRO, P. F., et al., 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of agricultural and food chemistry**, 63(41), 8981-8990.

PROBST, R. Q.; FIORIN, P. B. G. . Impactos do Herbicida à base de Glifosato no Sistema Reprodutor e Endócrino: Uma Revisão Sistemática. In: **o 8º Congresso Internacional em Saúde: Determinantes sociais, tecnológicos e ambientais em saúde**, 2021, Ijuí. Anais, 2021.

STACHIW, R, T, S. Percepção de trabalhadores rurais quanto aos efeitos toxicológicos do uso e exposição a agrotóxicos. **Nature and Conservation** , v.12, n.2, 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.6008/CBPC2318-2881.2019.002.0002>> Acesso em 10 agosto, 2023.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS). Agradecimentos também ao laboratório de citogenética e cultura de tecidos vegetais.