

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CITOGENOTOXICIDADE INDUZIDA DE DERIVADOS MONO E DIFLUORADOS DO EUGENOL CONTENDO NÚCLEOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS

Jéssika Santos de Oliveira¹, Wenderson Tinório de Paula³, Thammyres de Assis Alves¹, Mariana Belizario de Oliveira², Loren Cristina Vasconcelos¹, Adilson Vidal Costa², Milene Miranda Praça Fontes¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/ Departamento de Biologia/Laboratório de Citogenética, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, jessikaoliveira664@gmail.com, thammyresalves@gmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br.

²Universidade 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, belizmary@hotmail.com, avcosta@hotmail.com.

³Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas/Departamento de Química, Rua José Lourenço Kelmer, S/N - Campus Universitário, Martelos – 36036-900 – Juiz de Fora – MG, Brasil, wendersonstinorio@hotmail.com.

Resumo

Visando o controle de plantas daninhas, os herbicidas têm se destacado como agroquímicos amplamente empregados no campo. No entanto, inúmeros relatos sobre a resistência dessas plantas a determinados herbicidas ressaltam a necessidade contínua de buscar novas substâncias e métodos alternativos de controle. Nesse cenário, a classe de compostos heterocíclicos, especialmente os 1,2,3-triazóis, ganha destaque, devido à sua versatilidade de aplicação, principalmente no âmbito dos agroquímicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial citogenotóxico do 1,2,3-triazol mono e difluorado, derivado do eugenol, em células meristemáticas de *Lactuca sativa* L. a fim de estudar alterações cromossômicas e nucleares. Para isso, foram conduzidos testes citotóxicos nos quais os triazóis foram diluídos em quatro concentrações e testados nas sementes de alface. O herbicida Glifosato 1% foi utilizado como controle positivo, enquanto água destilada e diclorometano (DCM) serviram como controles negativos. Os compostos induziram um mecanismo de ação clastogênico e aneugênico, o que significa que causaram danos no DNA e no fuso mitótico.

Palavras-chave: Citotóxico. Heterocíclicos. Mutagênese.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Agricultura enfrenta desafios significativos relacionados à infestação de plantas daninhas, o que resulta em impactos adversos (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2006). Essa presença indesejada afeta negativamente a qualidade das colheitas, a biodiversidade, a saúde humana e animal, além dos recursos hídricos (DAY *et al.*, 2020).

Apesar da diversidade de compostos disponíveis para controlar várias espécies de plantas daninhas, há uma demanda crescente por novos herbicidas que sejam mais específicos, ecologicamente menos prejudiciais e mais eficazes. Isso ocorre porque o uso excessivo dos herbicidas comerciais resultou no desenvolvimento de resistência nas plantas ao longo do tempo. Nesse cenário, a indústria tem investido em pesquisa para desenvolver novas moléculas sintéticas (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2006).

A literatura registra vários exemplos de herbicidas comerciais, incluindo os fluorados, que são empregados para controlar plantas daninhas (HOFFMAN e VAUGHN, 1996; PANG *et al.*, 2016; RASOOL *et al.*, 2019). O flúor desempenha um papel crucial nesses herbicidas, aumentando a capacidade de interação com enzimas receptoras e inibindo vias metabólicas essenciais para as plantas daninhas (YU *et al.*, 2009).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

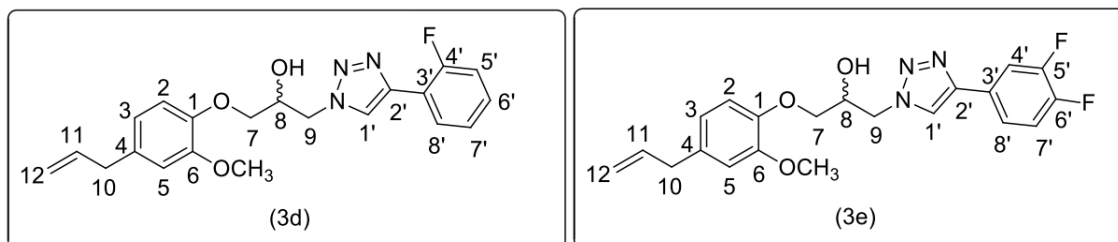
Dentro do esforço de desenvolvimento de novos herbicidas, os compostos heterocíclicos, como os triazóis, têm grande importância. Os triazóis são amplamente estudados devido às suas diversas aplicações e atividades biológicas (MELO *et al.*, 2006 e MAO *et al.*, 2015). Em relação ao controle de plantas daninhas, os derivados do núcleo 1,2,3-triazólico têm demonstrado atividade herbicida (BORGATI *et al.*, 2013).

Nesse contexto, este trabalho aborda a avaliação da citogenotoxicidade dos derivados fluorados do eugenol contendo o núcleo 1,2,3-triazólico, com o objetivo de desenvolver novas moléculas potencialmente ativas, considerando tanto a atividade herbicida conhecida do eugenol quanto dos triazóis.

Metodologia

Os compostos 3d e 3e derivados do eugenol contendo o núcleo 1,2,3-triazólico foram obtidos pela reação de cicloadição entre uma ázida orgânica e um alquino aromático terminal, utilizando metodologia descrita na literatura (LIMA, *et al.*, 2022).

Figura 1- Estruturas dos 1,2,3-triazóis monofluorado (3d) e difluorado (3e).



Fonte: DE PAULA, 2021.

Os testes biológicos foram realizados utilizando sementes comerciais de *Lactuca sativa* L. (alface), adquiridas em lojas especializadas de produtos agrícolas.

O 1,2,3-triazol derivado do eugenol foi diluído em quatro concentrações (50; 100; 250; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para tratamento das raízes para análises citogenéticas. Um volume de 2,5 mL de cada solução foi adicionado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 10 sementes de *L. sativa* L., e cada tratamento foi realizado em quatro repetições. Os papéis filtro foram umedecidos com a solução de cada tratamento e colocados ao fundo da placa de Petri e lacradas com plástico filme, visando promover uma manutenção da umidade do meio. Foram utilizados dois controles negativos, sendo a água destilada e o solvente utilizado na diluição das moléculas, diclorometano (DCM), e como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial Glifosato 1% (m.v⁻¹) (concentração indicada pelo fabricante).

As placas foram armazenadas em câmara incubadora BOD para a germinação das sementes a 25 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ $^{\circ}\text{C}$. Após 48 horas de exposição, as raízes obtidas foram fixadas em solução álcool etílico: ácido acético (3:1) por pelo menos 24h. Para preparo das lâminas, as raízes foram transferidas para microtúbulos e lavados três vezes em água destilada com intervalo de 10 minutos cada, para a remoção do fixador e, em seguida, foram hidrolisadas em HCl 5 mol L⁻¹ à temperatura ambiente por 18 min. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, e posteriormente, coradas com orceína acética 2% e coberta com lamínula.

Cada lâmina foi preparada com dois meristemas tratados e mil células foram avaliadas por lâmina, totalizando 4000 células meristemáticas observadas por cada tratamento. O índice mitótico (IM) foi obtido pelo quociente do número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento, enquanto as frequências das alterações cromossômicas e nucleares foram obtidas pelo quociente do número de alteração (cromossômica e nuclear, respectivamente) pelo número total de células avaliadas (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos das análises de citogenotoxicidade foram submetidos à análise de variância,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de significância. Este teste foi escolhido porque é sensível e capaz de identificar pequenas diferenças entre os grupos. As análises foram realizadas com o programa estatístico GENES, um pacote de software para análise em estatística experimental e genética quantitativa (CRUZ, 2016).

Resultados

Os 1,2,3-triazóis 3d e 3e foram obtidos com rendimentos de 72,5 e 65 % respectivamente, conforme descrito na literatura (LIMA *et. al.* 2022)

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados das análises microscópicas nas células meristemáticas de raízes de *L. sativa* expostas as moléculas de triazol (3d e 3e).

Tabela 1 - Parâmetros microscópicos avaliados em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* submetidas a diferentes concentrações da molécula 3d monofluorada. Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao DCM (diclorometano); médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). IM: Índice mitótico; AC: Alterações cromossômicas; NA: Alterações nucleares.

Concentrações (ppm)	IM	AC	AN	Aderente	C-metáfase	Perdido	Ponte
Água (C-)	21.725a	0.375a	1.2a	0a	0.9325a	0a	0.81a
DCM (C-)	24.85b	0.025b	0b	0b	0.0925b	0b	0b
Glifosato (C+)	5.15c	0.15c	6.75c	0c	4.0325c	0c	0c
50	9.975	1.475	0.5ab	6.2725	4.31abc	0.8225abc	1.9675a
100	9.2725c	0.95a	0.875ab	3.9275abc	2.8975abc	0.85abc	0.835abc
250	11.925	1.2	0.675ab	5.0275abc	5.03abc	0.915abc	1.4325a
500	12.025	1.6	0.525ab	6.1325	6.565ac	1.98	1.375abc

Fonte: o autor.

O triazol monofluorado (3d) na concentração 100 ppm foi estatisticamente semelhante em relação ao controle positivo glifosato, ou seja, causou redução no IM.

A exposição ao triazol provocou vários tipos de alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), no entanto apenas na concentração de 100 ppm apresentou-se estatisticamente igual ao controle negativo água para AC e, por outro lado, AN em todas as concentrações foram estatisticamente iguais aos dois controles negativos.

As células de ponta de raiz de *L. sativa* expostas ao triazol monofluorado apresentaram c-metáfase como alteração mais frequente, seguido de aderência cromossômica, ponte na anáfase e cromossomo perdido (Figura 2).

Tabela 2- Parâmetros microscópicos avaliados em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* submetida a diferentes concentrações da molécula 3 difluorada. Médias seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao DCM (diclorometano); médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao glifosato pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). IM: Índice mitótico; AC: Alterações cromossômicas; NA: Alterações nucleares.

Concentrações (ppm)	IM	AC	AN	Aderente	C-metáfase	Perdido	Ponte
Água (C-)	21.725a	0.375a	1.2a	0a	0.9325a	0a	0.81a
DCM (C-)	24.85b	0.025b	0b	0b	0.0925b	0b	0b
Glifosato (C+)	5.15c	0.15c	6.75c	0c	4.0325c	0c	0c

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

50	8.225c	1.775	0.625ab	6.6125	13.3325	0.5425abc	0.815abc
100	8.475c	1.175a	0.8ab	6.0675	6.355abc	0.6025abc	0.6325abc
250	8.525c	1.525	0.025ab	2.645abc	11.435c	1.4625	2.6575
500	7.775c	1.3a	0.2ab	4.555	8.6375abc	1.765	1.04abc

Fonte: o autor.

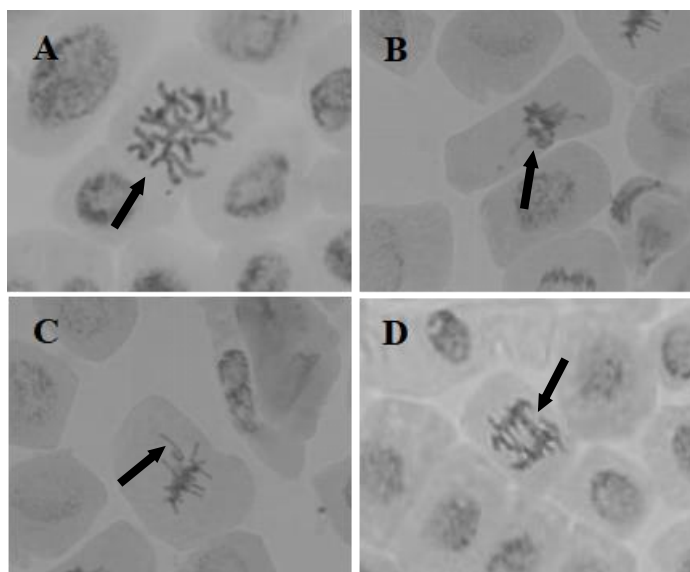
O IM sofreu um aumento em relação aos controles negativos, sendo estatisticamente igual ao controle positivo glifosato em todas as concentrações.

Em AC as concentrações de 100 e 500 foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo água e para AN todas as concentrações foram estatisticamente semelhantes aos dois controles negativos.

A anormalidade c-metáfase foi estatisticamente igual ao controle positivo glifosato na concentração de 250 ppm. As demais concentrações apresentaram a distribuição de anormalidades parecida, sendo elas: aderência cromossômica, ponte na anáfase e cromossomo perdido (Figura 2).

Aderência cromossômica e cromossomo perdido não foram observados em nenhum dos controles para ambas as moléculas e apenas ponte cromossômica foi observada no controle negativo água.

Figura 2 - Principais alterações encontradas nas células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* expostas aos triazóis monofluorados e difluorados. a) c-metáfase, b) aderência cromossômica, c) metáfase com cromossomo perdido, d) anáfase com ponte.



Fonte: o autor.

É interessante ressaltar que as posições dos grupos também influenciam na atividade citogenotóxica, e isto é evidenciado pelos percentuais observados no derivado difluorado 3e (que possui dois átomos de flúor substituídos na posição 3,4 do anel benzênico), o qual quando comparado ao derivado monofluorado 3d (contém apenas um anel benzênico substituído no anel triazólico e um monofluorado parassubstituído no anel aromático), apresentou maior citogenotoxicidade para os parâmetros analisados.

Discussão

Entre as categorias de substâncias naturais que estão sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de novos herbicidas, destaca-se o eugenol. De maneira similar aos triazóis, o eugenol também exibe uma ampla variedade de bioatividades, o que significa que alterações em sua

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

estrutura química podem resultar na criação de compostos altamente eficazes (DE PAULA, 2021). Nesse sentido, moléculas naturais como o eugenol estão sendo empregadas como modelos estruturais para a síntese de novas substâncias por diversos pesquisadores, uma vez que investigações sugerem que esse composto natural demonstra propriedades fitotóxicas contra várias espécies de plantas daninhas, tais como *Taraxacum officinale*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Echinochloa crusgalli*, *Phalaris minor*, *Ageratum conyzoides*, *Leptochloa chinensis*, *Bidens pilosa*, *Commelina benghalensis*, entre outras (AHUJA *et al.*, 2014).

A partir dos ensaios, foi possível verificar que a inserção, a variação dos substituintes fluorados e a quantidade de átomos de flúor influenciaram na atividade dos compostos, no qual, o derivado que contém dois átomos de flúor (3e) se mostrou promissor, o que corrobora com Jeschke (2010), o qual cita que a inserção e o aumento de átomos de flúor em uma estrutura química elevam atividade inibitória do composto.

Os testes citogenéticos são úteis para identificar os efeitos nocivos de uma substância em diferentes níveis de concentração e tempos de exposição (LEME e MARIN-MORALES, 2009). O IM pode ser empregado como um indicador de toxicidade. FERNANDES *et al.* (2007) indicaram que a diminuição ou aumento do IM pode indicar o nível de citotoxicidade de um composto testado. Valores menores que o controle negativo indicam que o crescimento e desenvolvimento da *L. sativa* foram impactados pelos tratamentos, sinalizando a presença de citotoxicidade.

Alterações cromossômicas, como c-metáfases e cromossomos perdidos, podem indicar problemas no fuso mitótico. Uma interrupção ou malformação no fuso pode determinar uma segregação cromossômica inadequada quando as células filhas são formadas, levando a anomalias (FERNANDES *et al.*, 2007). Dessa forma, a geração de c-metáfase e cromossomos perdidos na planta modelo pode ter sido resultado da influência de substâncias aneugênicas encontradas nos triazóis sobre as proteínas que compõem ou controlam o fuso mitótico.

Conclusão

Os 1,2,3-triazol fluorados, derivado do eugenol, um fenol natural, induziu o mecanismo de ação clastogênico e aneugênico, ou seja, promoveu danos no DNA e no fuso mitótico do organismo modelo.

As posições dos grupos influenciam na atividade citogenotóxica, e isto é evidenciado pelos percentuais observados no derivado difluorado 3e, o qual quando comparado ao derivado monofluorado 3d apresentou maior citogenotóxica para os parâmetros analisados.

Referências

AHUJA, N.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of Pest Science**, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C.M.; PALMIERI, M. J.; LAVIOLA, B G; PRAÇA-FONTES, M. M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

BORGATI, T. F.; ALVES, R. B.; TEIXEIRA, R. R.; DE FREITAS, R. P.; PERDIGÃO, T. G.; DA SILVA, S. F.; DOS SANTOS, A. A.; BASTIDAS, A. J. Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 953-961, 2013.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; BORGES, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. P.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; MONQUERO, P. A. Carfentrazone-ethyl aplicado em pós-emergência para o controle de Ipomea spp. e Commelina benghalensis in Sugarcane Crop. **Planta Daninha**, p. 83-90, 2006.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DAY, M.; WITT, A.; WINSTON, R. Weed biological control in low-income and middle income countries. **Current Opinion in Insect Science**, p. 92-98, 2020.

DE PAULA, Wenderson Tinório. **Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de novos 1,2,3-triazóis fluorados derivados do eugenol**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

HOFFMAN, J. C.; VAUGHN, K. C. Flupoxam induces classic club root morphology but is not a mitotic disrupter herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p.49-53, 1996.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.** v. 88, p. 252–259, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>

JESCHKE, P. The unique role of halogen substituents in the design of modern agrochemicals. **Pest Manag Sci.** v. 66, p. 10– 27, 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Rev. Mutat. Res.** v. 682, p. 71–81, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

LIMA, Â. M.; DE PAULA, W. T.; LEITE, I. C.; GAZOLLA, P. A.; DE ABREU, L. M.; FONSECA, V. R.; ROMÃO, W.; LACERDA JR., V.; DE QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, R. R.; COSTA, A. V. Synthesis of Eugenol-Fluorinated Triazole Derivatives and Evaluation of Their Fungicidal Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p1-11, 2022.

MAO, M.; LI, Y.; LIU, Q.; XIONG, L.; ZHANG, X.; LI, Z. Synthesis and biological evaluation of novel N-pyridylpyrazole derivatives containing 1,2,3-triazole moieties. **Journal of Pesticide Science**, p. 138-142, 2015.

MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, p. 569-579, 2006.

PANG, N.; CUI, Y.; HU, J. Weather dependent dynamics of the herbicides florasulam, carfentrazone-ethyl, fluroxypyr-meptyl and fluroxypyr in wheat fields through field studies and computational simulation. **Chemosphere**, p. 320-328, 2016.

RASOOL, R.; BHULLAR, M. S.; SINGH, M.; GILL, G. S. Flufenacet controls multiple herbicide resistant *Phalaris minor* Retz. in Wheat. **Crop Protection**, p. 127-131, 2019.

YU, Q.; ABDALLAH, I.; HAN, H.; OWEN, M.; POWLES, S. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**. v. 230, p. 713–723, 2009.