

POTÊNCIAL CITOGENOTÓXICO DE NOVOS DERIVADOS TRIAZÓLICOS DO TIMOL EM *Lactuca sativa*

Mylena Gonçalves Raymundo¹, Jéssika Santos de Oliveira¹, Loren Cristina Vasconcelos¹, Mariana Belizario de Oliveira², Larissa Carolina Lopes de Jesus¹, Adilson Vidal Costa², Milene Miranda Praça Fontes¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento/Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, s / n, Caixa Postal 16, 29500-000 – Alegre -ES, Brasil, mylenagr16@gmail.com, jessikaoliveira664@gmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, larissa.c.jesus@edu.ufes.br, 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.

Resumo

Os herbicidas são fundamentais para a agricultura, garantindo produtividade e qualidade, entretanto o uso excessivo tem gerado resistência em plantas invasoras. Assim, a busca por moléculas sintéticas de origem natural tem ganhado destaque por proporcionarem maior seletividade, por sua escalabilidade e por gerarem menor impacto ambiental. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial citogenotóxico de dois novos derivados do timol contendo fragmento 1,2,3-triazólicos-4-aril-substituído em *Lactuca sativa*. Os compostos foram testados em diferentes concentrações, utilizando bioensaios de pré-emergência para analisar o índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (ACs) e nucleares (ANs). Os triazóis reduziram significativamente o índice mitótico, induziram alterações cromossômicas e nucleares e apresentaram anormalidades aneugênicas e clastogênicas no ciclo celular, demonstrando assim efeito citogenotóxico e futuro potencial herbicida. Conclui-se que os derivados triazólicos do timol podem ser uma alternativa promissora aos herbicidas comerciais, com efeitos citogenotóxicos relevantes em *L. sativa*.

Palavras-chave: Bioherbicida. Timol. Alterações cromossômicas. C-metáfase. Cromossomo aderente.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

Os herbicidas são essenciais para os agricultores, pois garantem altos rendimentos, uniformidade no desenvolvimento das culturas e qualidade dos produtos. Além disso, protegem as plantações e ajudam a reduzir os custos de produção (Embrapa, 2021; Liu et al., 2020). No entanto, apesar dos benefícios do uso de herbicidas, o uso frequente e indiscriminado desses compostos levou ao surgimento de plantas invasoras resistentes a produtos comerciais. À medida que a população de ervas daninhas resistentes a herbicidas continua a crescer, há uma demanda crescente pela descoberta de novos compostos para controlá-las efetivamente (Qu et al., 2021; Motta et al., 2023).

Avanços em pesquisas têm possibilitado o desenvolvimento de moléculas semissintéticas, como os derivados do timol, que apresentam maior estabilidade, pureza e menor impacto ambiental, além de permitir produção em larga escala (Pinheiro et al., 2024). O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpene fenólico que pode ser encontrado em óleos essenciais de várias plantas, como tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) e pimenta alecrim (*Lippia sidoides*) (Pinheiro et al., 2015; Zinno et al., 2023).

O timol pode ser quimicamente modificado com a adição de fragmentos triazólicos para superar suas limitações, como sua volatilidade, resultando em produtos com alta eficácia e baixa toxicidade a organismos não alvo (Addo et al., 2022). Os 1,2,3-triazóis são moléculas sintéticas com propriedades biológicas diversas, incluindo fitotóxicas e citogenotóxicas (Alves et al., 2018; Dharavath et al., 2020).

Os herbicidas, além de serem utilizados no controle de pragas e espécies invasoras, são indutores de estresse nas plantas, desencadeando respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que são cruciais para sua sobrevivência em ambientes adversos (Zandalinas et al., 2018). Diversas análises são realizadas para indicar o nível de estresse e toxicidade dos herbicidas, incluindo ensaios de citogenotoxicidade, (Messias et al., 2021).

A proposta de avaliar novos compostos semissintéticos se alinha com a necessidade de desenvolver herbicidas que sejam seletivos, eficazes e que apresentem menor risco à saúde e ao meio ambiente e capazes de controlar as ervas daninhas que desenvolveram resistência aos herbicidas existentes (Duke; Dayan, 2022). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial citogenotóxico de novos 1,2,3-triazóis derivados do timol, um fenol natural bioativo, em diferentes concentrações, por meio de bioensaios com *Lactuca sativa*.

Metodologia

A síntese dos compostos contendo porção 1,2,3-triazólica foi realizada por meio de uma rota sintética rápida e de fácil execução, a partir de transformações químicas no timol.

O efeito citogenotóxico foi determinado por ensaios de pré-emergência em placas de Petri. Os dois derivados do timol contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos-4-*aril*-substituídos (1a e 1b) foram utilizados em 6 concentrações (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O diclorometano (DCM), utilizado como solvente e a água, foram aplicados como controle negativo e o glifosato a 0,05% foi adotado como controle positivo.

Para a realização dos testes, 25 sementes de cada planta de alface, *Lactuca sativa* L. foram colocadas em papel de filtro umedecido com 2 mL das concentrações. As placas foram então colocadas em câmara de germinação regulada a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro. Após 48 h de exposição às concentrações de 1a e 1b, pontas de raízes medindo 2–3 cm de comprimento foram fixadas em uma solução de Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) e armazenadas a -18°C .

Para estudar o ciclo celular e os cromossomos, lâminas meristemáticas foram preparadas usando a técnica de esmagamento e foram coradas com orceína acética a 2%. As lâminas foram observadas em microscópio óptico para determinar as diferentes fases da mitose. Um total de 1.000 células por lâmina foi avaliado, totalizando 4.000 células por concentração. A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM) e a genotoxicidade foi determinada pelas frequências de células com alterações cromossômicas (ACs) e alterações nucleares (ANs) (Mendes et al., 2023).

O teste foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições por concentração. A normalidade dos erros e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk & Bartlett, respectivamente. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt dentro do software R versão 4.3.2 (Equipe principal R 2023).

Resultados

Os derivados triazólicos (1a e 1b) foram sintetizados com sucesso, a partir de modificações estruturais no timol e da utilização de alquinos aromáticos (fenilacetileno e 1-bromo-2-etilbenzeno). O derivado 1a foi obtido com 70% de rendimento, enquanto o derivado 1b foi obtido com 68%.

A citogenotoxicidade foi avaliada pela análise do índice mitótico e pelas alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas da ponta da raiz de *L. sativa* (Tabelas 1 e 2).

O triazol 1a, apresentou reduções mais significativas no IM a partir da concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo iguais estatisticamente ao controle positivo, o glifosato. A partir dessa mesma concentração também foi observado redução na formação de alterações cromossômicas, sendo iguais estatisticamente ao glifosato. Nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ observou-se maior redução na formação de alterações nucleares, valores menores em relação ao glifosato.

No derivado 1a, a maior concentração (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) não gerou raízes suficientes para a realização da análise de citogenotoxicidade, demonstrando-se eficiente na inibição da germinação e crescimento das raízes de *L. sativa*.

Tabela 1 – Efeitos citogenotóxicos do derivado 1a sobre o índice mitótico, alterações cromossômicas e alterações nucleares em células meristemáticas da raiz de *Lactuca sativa*.

Tratamentos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IM (%)	AC (%)	AN (%)
10	8,60a	1,72ab	0,55abc
50	5,92abc	1,35abc	0,62abc
100	7,92a	2,10a	0,97abc
250	2,12bcd	0,4cd	0,15bc
500	2,05bcd	0,47bcd	0,12c
1000	-	-	-
Água	7,07ab	1,87a	1,37a
DCM	8,7a	1,6abc	0,77abc
Glifosato	1,22cd	0,05d	1,22ab

Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); IM: índice mitótico; AC: alterações cromossômicas; AN: alterações nucleares; DCM: diclorometano;

Para o triazol 1b, todas as concentrações avaliadas foram iguais estatisticamente em todos os parâmetros avaliados. Para IM e AC, foi observado que o glifosato obteve a menor porcentagem, e para as ANs, todos os resultados foram iguais estatisticamente.

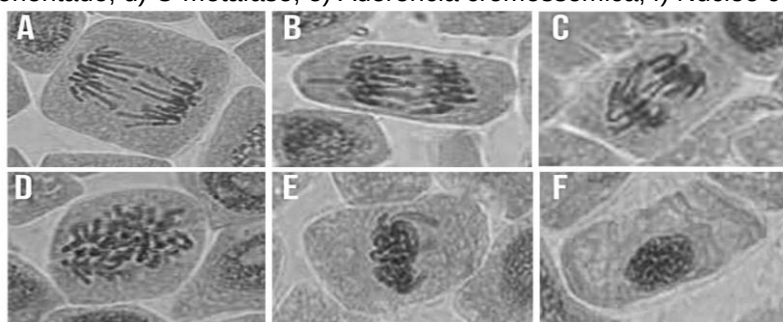
Tabela 2 – Efeitos citogenotóxicos do derivado 1b sobre índice mitótico, alterações cromossômicas e alterações nucleares em células meristemáticas da raiz de *Lactuca sativa*.

Tratamentos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IM (%)	AC (%)	AN (%)
10	8,55a	2,12a	0,67a
50	7,87a	1,92a	0,72a
100	8,45a	1,55a	0,70a
250	8,32a	2,15a	0,55a
500	9,15a	2,27a	0,55a
1000	7,2a	1,62a	0,57a
Água	7,07a	1,87a	1,37a
DCM	8,7a	1,6a	0,77a
Glifosato	1,22b	0,05b	1,22a

Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); IM: índice mitótico; AC: alterações cromossômicas; AN: alterações nucleares; DCM: diclorometano.

Os derivados triazólicos testados apresentaram anormalidades no ciclo celular, sendo encontradas alterações aneugênicas e clastogênicas, como aderência cromossômica, c-metáfases, anáfases com ponte e cromossomo não orientado e núcleos condensados (Figura 1).

Figura 1 - Anormalidades cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos triazóis (1a e 1b). a) Anáfase com ponte; b) e c) Anáfase com ponte e cromossomo não orientado; d) C-metáfase; e) Aderência cromossômica; f) Núcleo condensado.



Fonte: O autor.

Em relação às aderências cromossômicas, o triazol 1a apresentou diminuição do número de cromossomos aderentes a partir da concentração $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, valores menores que os obtidos pelo glifosato e a concentração $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obteve o maior valor. Já no triazol 1b, foi observado maior similaridade entre as concentrações avaliadas, havendo pouca diferença estatística entre elas e os controles.

Para o derivado 1a foi observado uma menor frequência de pontes na anáfase, principalmente nas concentrações iguais ou superiores a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O derivado 1b apresentou maiores frequências nas concentrações mais altas, embora haja pouca variação estatística entre os tratamentos. Em relação a formação de C- metáfases, nos 2 triazóis as concentrações e controles foram consideradas iguais estatisticamente. E para a alteração cromossomo quebrado, foi possível observar incidência apenas na concentração $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 1a e nas concentrações 50 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 1b.

Discussão

O presente estudo demonstrou que as moléculas derivadas do timol podem exibir efeitos tóxicos, em *L. sativa*. Os testes confirmaram que, em vários casos, os resultados foram semelhantes ao glifosato. A literatura já documentou o potencial citogenotóxico dos derivados triazólicos do timol (Barcelos et al., 2023; Alves et al., 2018; Roberto et al., 2023) corroborado pelos resultados obtidos neste estudo.

Neste estudo, apenas o triazol 1a apresentou uma redução no índice mitótico (IM) em *L. sativa* em comparação ao controle positivo. O IM é um parâmetro sensível para a avaliação da citogenotoxicidade, refletindo a frequência da divisão celular, o que é crucial para determinar a taxa de crescimento da raiz (Silveira et al., 2017). Uma diminuição no IM sugere uma perturbação no ciclo celular, indicando interferência nas fases da mitose ou desaceleração nas taxas de divisão celular, possivelmente resultando em uma fase S prolongada e na inibição da síntese de DNA e nucleoproteína (Aragão et al., 2017; Fiskesjo, 1997), podendo levar ao bloqueio das fases G1 e G2 e à inibição da formação de microtúbulos (Turkoglu, 2012).

Os dois derivados triazólicos testados apresentaram alterações cromossômicas e nucleares. As ACs são mudanças na estrutura ou número de cromossomos, resultantes da ação de agentes genotóxicos. Esses agentes podem atuar através de dois mecanismos: clastogênico, causando danos, quebras ou trocas de materiais cromossômicos na molécula de DNA, ou aneugênico, caracterizado pela ausência ou má formação do fuso mitótico (Silveira et al., 2017). Já as alterações nucleares incluem a formação de micronúcleos e de núcleos condensados. Na formação de núcleos condensados, o dano é suficientemente extenso para ativar o processo de morte celular, sendo esta última uma evidência citológica da ocorrência de morte celular (Andrade-Vieira et al., 2012; Costa et al., 2017).

Nas c-metáfases, os microtúbulos inativos impedem o fuso mitótico e a formação da placa equatorial, atrasando a divisão celular e duplicando cromossomos nas células-filhas (Alves et al., 2022). Essas anormalidades ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos não estão ligados ao fuso mitótico, devido ao mau funcionamento ou inativação do mesmo, comprometendo o ciclo celular e paralisando-o na metáfase (Freitas et al., 2016).

A aderência cromossômica resulta de alterações nas proteínas do esqueleto cromossômico, causando aglomeração de cromossomos. Isso gera segregação e distribuição desigual nos núcleos das células-filhas, sendo irreversível e potencialmente fatal (Costa et al., 2017). A aderência cromossômica é irreversível, pode levar à morte celular, e está relacionada à diminuição do IM (Zhang et al., 2014). Nesse sentido, essa alteração pode ter impedido as células de *L. sativa* de completar o ciclo mitótico, resultando na redução do crescimento da raiz.

Os resultados obtidos indicam que ambos triazóis avaliados (1a e 1b) apresentaram diferentes efeitos citogenotóxicos sobre as sementes da planta modelo. Esses efeitos podem estar relacionados à presença de diferentes grupos substituintes (fenilacetileno e 1-bromo-2-etinilbenzeno) em cada composto, visto que esta é a única diferença entre eles. Contudo, são necessários estudos complementares a fim de investigar o mecanismo de ação desses derivados e o efeito específico de cada substituinte em cada triazol analisado.

Conclusão

Os compostos semissintéticos derivados do timol demonstraram potencial citogenotóxico em *L. sativa*, sugerindo sua eficácia como alternativa aos herbicidas tradicionais. Em concentrações específicas, os triazóis testados reduziram o índice mitótico e induziram alterações cromossômicas e nucleares, comparáveis aos efeitos do glifosato. Além disso, a presença de diferentes grupos substituintes pode estar relacionada com a diferença de desempenhos dos dois triazóis. Esses resultados indicam que os novos compostos podem ser promissores no controle de plantas daninhas, oferecendo uma abordagem mais seletiva e ambientalmente sustentável, especialmente para populações resistentes a herbicidas convencionais.

Referências

- ADDO, J. K. et al. Synthesis of 1, 2, 3-triazole-thymol derivatives as potential antimicrobial agents. **Heliyon**, v. 8, n. 10, 2022.
- ALVES, T. 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.
- ALVES, T. A. et al. Phytotoxicity and cytogenetic action mechanism of leaf extracts of *Psidium cattleianum* Sabine in plant bioassays. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e260985, 2022.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. Effects of spent pot liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140-146, 2012.
- ARAGÃO, F. B et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, p. 259-272, 2015.
- BARCELOS, 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, n. 1, p. e20211102, 2023.
- COSTA, A. V. et al. Synthesis of novel glycerol-derived 1, 2, 3-triazoles and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1666, 2017.
- DHARAVATH, R. et al. Microwave-assisted synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of new coumarin-based 1, 2, 3-triazoles. **RSC advances**, v. 10, n. 20, p. 11615-11623, 2020.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. The search for new herbicide mechanisms of action: Is there a 'holy grail'? **Pest Management Science**, v. 78, n. 4, p. 1303-1313, 2022.
- EMBRAPA. **Agrotóxicos no Brasil**. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/qualidade/dinamica/agrotoxicos-no-brasil>>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- FISKESJO, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In W. Wang, J. W. Gorsuch and J. S. Hughes (Eds.). **Plants for environmental studies**. New York: Lewis, p. 308-329, 1997.
- FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426-434, 2016.

LIU, X. H. et al. Synthesis and pesticidal activities of new quinoxalines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 28, p. 7324-7332, 2020.

MENDES, L. A et al. Herbicide and cytogenotoxic activity of inclusion complexes of *Psidium gaudichaudianum* leaf essential oil and β -caryophyllene on 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Molecules**, v. 28, p. 5909, 2023.

MESSIAS, J. B. et al. Cytogenotoxicity and mutagenicity of copper sulphate in different varieties of *Allium cepa* linn. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 88231-88244, 2021.

MOTTA, E. V. S; MORAN, N. A. The effects of glyphosate, pure or in herbicide formulation, on bumble bees and their gut microbial communities. **Science of the Total Environment**, v. 872, p. 162102, 2023.

PINHEIRO, P. F. et al. Synthesis and phytocytogenotoxic activity of N-phenyl-2-phenoxyacetamides derived from thymol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 4610-4621, 2024.

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

QU, R. et al. Where are the new herbicides?. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2620-2625, 2021.

R Core Team (2023). R: Uma linguagem e ambiente para computação estatística (software de computador). Viena: R Core Team. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acessado em: 30 de ago de 2024.

ROBERTO, C. E. O. et al. Phytogenotoxicity of thymol and semisynthetic thymoxyacetic acid in pre/post emergence of model plants and weeds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 13, p. 38955-38969, 2023.

SILVEIRA, G. L et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

TÜRKOĞLU, Ş. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 224-230, 2012.

ZANDALINAS, S. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2-12, 2018.

Zhang, H. et al. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana* BMC **Plant Biology**, v. 14, p. 264, 2014.

ZINNO, P. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Origanum vulgare* genotypes belonging to the carvacrol and thymol chemotypes. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1344, 2023.

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de Estudo Aplicado em Produtos Naturais e Síntese Orgânica (GEAPS), ao Laboratório de Citogenética e Cultura de tecidos (LABCITO) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo apoio.