



## POTENCIAL BIOHERBICIDA DO FENOL NATURAL CARVACROL E DO COMPOSTO SEMISSINTÉTICO, ANÁLOGO AO 2,4-D, ÁCIDO FENOXIACÉTICO

*Thammyres de Assis Alves<sup>1</sup>, Thayllon de Assis Alves<sup>1</sup>, Ramon Machado Loureiro<sup>1</sup>, Patrícia Fontes Pinheiro<sup>1</sup>, Milene Miranda Praça Fontes<sup>1</sup>, Adésio Ferreira<sup>1</sup>, Taís Cristina Bastos Soares<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>UFES/Departamento de Biologia, Alto Universitário s/n, thammyresalves@gmail.com

**Resumo** – Em virtude dos danos ambientais e à saúde humana que os herbicidas promovem, contrapondo a importância de sua aplicação para a manutenção da produção agrícola, tem-se desenvolvido controles alternativos com moléculas naturais, a partir do uso de bioherbicidas. Assim, objetivou-se com esse estudo, prospectar o efeito genotóxico do carvacrol e do ácido carvacroxiaacético (ácido fenoxiacético semissintético sem cloro, análogo ao 2,4-D), na concentração de  $3\text{mmol.L}^{-1}$ , no DNA de plântulas de sorgo e alface, usando marcadores ISSR como ferramenta. Houve formação de dois grupos quanto ao padrão de bandas e à estabilidade genômica. O primeiro formado pelas plantas tratadas com os controles negativos (água e solvente) e o segundo pelas plantas tratadas com carvacrol, ácido carvacroxiaacético e o 2,4-D. Demonstrando o efeito genotóxico e o potencial para uso como bioherbicida das moléculas naturais testadas.

**Palavras-chave:** alface, genotoxicidade, ISSR, mutagênese, sorgo.

### Introdução

Devido à crescente necessidade de aumentar a produtividade agrícola, os herbicidas se apresentam como produtos indispensáveis. Entretanto, dois problemas estão relacionados à essas moléculas: o primeiro é a contaminação à saúde humana e ao ambiente, e o segundo refere-se a resistência que as pragas podem adquirir devido a seleção natural, tornando-se necessário uma introdução constante de novos herbicidas no mercado (GIESY et al., 2000; EDDLESTON et al., 2002).

Nesse contexto, a aplicação de produtos naturais com atividades biológicas, tem se mostrado como uma alternativa de minimizar tais efeitos adversos. Assim, várias moléculas naturais, como o fenol Carvacrol, têm sido estudadas e sua atividade biológica tem sido comprovada em bioensaios (AIT-OUAZZOU et al., 2013; PINHEIRO et al., 2015). Porém, não há estudo relacionado ao seu efeito diretamente ao DNA do organismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito genotóxico do carvacrol e do ácido carvacroxiaacético ( $3\text{mmol.L}^{-1}$ ) em sementes de alface e sorgo.



## Metodologia

Carvacrol; ácido carvacroxiacético e 2,4-D, todos na concentração de  $3\text{mmol.L}^{-1}$ ; água destilada e o solvente (água + acetona 2% + Tween 0,05%) foram utilizados como tratamentos, organizados em DIC, com 5 repetições, cada uma composta por 60 plântulas de *Lactuca sativa* (alface) e *Sorghum bicolor* L. Var. Moench (sorgo). Estas análises foram conduzidas seguindo o protocolo proposto por Bernardes et al. (2015). Avaliou-se a presença e/ou ausência de bandas nos géis de cada tratamento/*primer*, em comparação com os controles negativos e calculou-se a estabilidade genômica (GTS).

Os dados de polimorfismos foram submetidos à AMOVA e ao teste de similaridade de coincidência simples (agrupados por projeção 2D). Os dados de GTS foram analisados utilizando o teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) no programa GENES (Cruz, 2013).

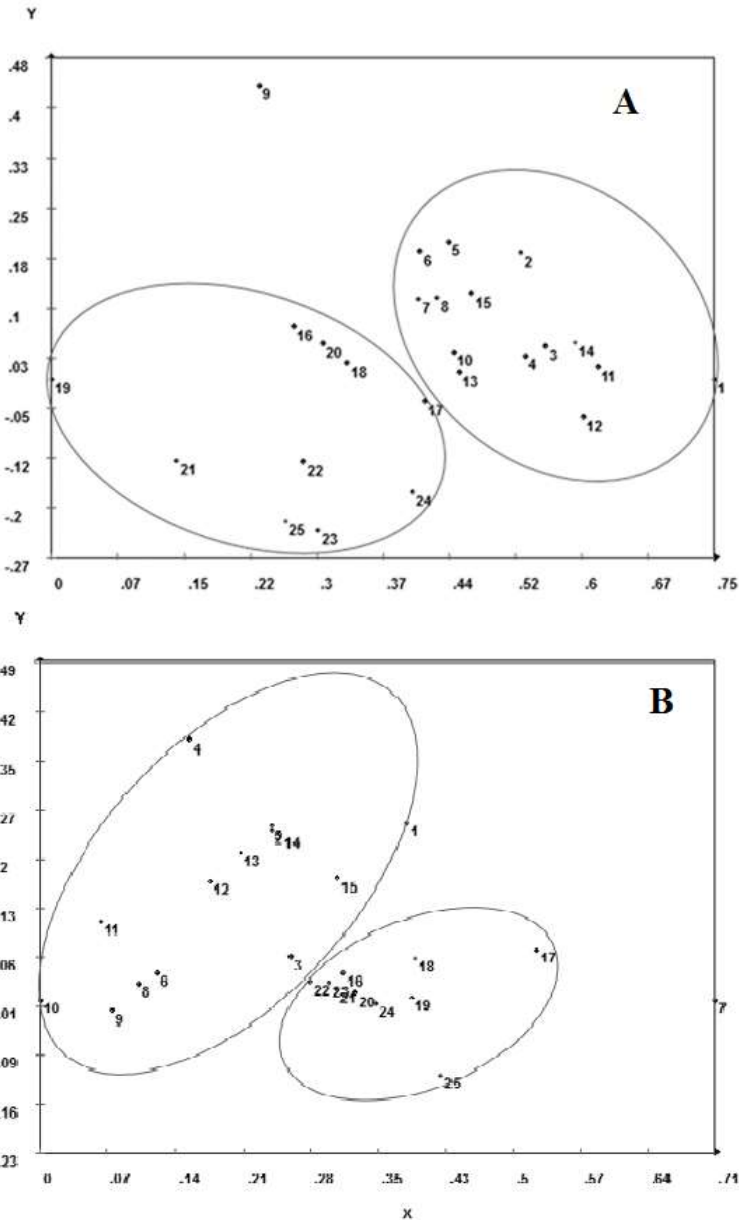
## Resultados e Discussão

As análises moleculares permitiram a separação dos tratamentos em dois grupos distintos tanto para o sorgo, quanto para a alface (Figura 1). Assim, observou-se a formação de um grupo com os dois controles negativos (16-25) e o outro com os tratamentos carvacrol (1-5), ácido carvacroxiacético (6-10) e o 2,4-D, usado como controle positivo (11-15). Esses dados são sustentados pela análise da AMOVA que demonstrou diferença entre esses dois grupos.

As avaliações dos géis provenientes das análises dos sete *primers* ISSR, tanto em sorgo quanto em alface, demonstraram que o carvacrol provocou perdas e ganhos de bandas. Segundo Enan (2007), a presença de adutos de DNA podem estar relacionados com a perda e ganho de bandas, pois esses adutos podem impedir o anelamento do *primer*, sendo a guanina a base nitrogenada com maior propensão de sofrer esse tipo de alteração (DIPPLE, 1995).

Além disso, outro fator que pode contribuir com a alteração no padrão de bandas é a fragmentação cromossômica no sítio de anelamento do *primer* (ENAN, 2007). A perda e ganho de bandas são alterações comumente encontradas em pesquisas que visam avaliar a instabilidade do genoma dos indivíduos frente a agentes tóxicos (BERNARDES et al., 2015).

Para avaliação da estabilidade genômica, calculou-se a porcentagem de polimorfismo e os valores da *Genomic Template Stability* (GTS), que referem à estabilidade do genoma a partir do ganho e perda de bandas, sendo que os tratamentos se igualaram com o herbicida sintético 2,4-D, tanto em sorgo quanto em alface (Tabela 1).



**Figura 1** - Projeção 2D das amostras de sorgo (A) e alface (B) tratadas com carvacrol, ácido carvacroxiacético, 2,4-D, todos na concentração de  $3\text{mmol.L}^{-1}$ , solvente e água (os dois últimos são os controles negativos). Os números de 1 a 25 representam as plantas nos diferentes tratamentos: 1-5 (plantas tratadas com carvacrol), 6-10 (plantas tratadas com ácido carvacroxiacético), 11-15 (plantas tratadas com 2,4-D –controle positivo), 16-20 (plantas tratadas com água – controle negativo) e 21-25 (plantas tratadas com o solvente- controle negativo). Fonte: ALVES et al. (2017).

**Tabela 1** - Genomic Template Stability (GTS) em *L. sativa* e *S. bicolor* tratados com carvacrol, ácido carvacroxiacético, o herbicida 2,4-D e solvente (água, 2% de acetona + 0,05% de tween).

Moléculas ( $3\text{mmol.L}^{-1}$ )	<i>L. sativa</i>	<i>S. bicolor</i>
Carvacrol	<sup>a</sup> 94,13ab	95,11a
Ácido carvacroxiacético	93,53a	97,22ab
2,4-D	93,90a	95,81a
Solvente	100,00b	100,00b

<sup>a</sup>As médias nas colunas seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferença estatística de acordo com o teste de Dunnett ( $P>0,05$ ). Fonte: ALVES et al. (2017).



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

## Conclusão

As análises de perda e ganho de bandas, demonstraram a criação de dois grupos distintos, um composto pelas plantas tratadas com solvente e água, e outro pelos compostos carvacrol, ácido carvacroxiacético e o 2,4-D. Além disso, observou-se igualdade entre plantas tratadas com o herbicida 2,4-D e as moléculas teste carvacrol e ácido carvacroxiacético, quanto à estabilidade genômica, evidenciando o potencial genotóxico dessas moléculas.

## Referências

- AIT- OUZZOU, A. et al. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 1, p. 173-185, 2013.
- BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 7, p. 207, 2015.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- CENKCI, S. et al. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 467-473, 2010.
- DIPPLE, Anthony. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 3, p. 437-441, 1995.
- EDDLESTON, Michael et al. Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticides list. **The Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1163-1167, 2002.
- ENAN, M. R. Assessment of genotoxic activity of para-nitrophenol in higher plant using arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR). **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 103-109, 2007.
- GIESY, J. P. et al. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, 2000. p. 35-120.
- 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.