

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

MAIKON KEOMA DA CUNHA HENRIQUE

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FITO-CITO-
GENOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
EUCALYPTUS UROPHYLLA E DO HÍBRIDO *EUCALYPTUS*
UROCAM (E. UROPHYLLA X E. CAMALDULENSIS) EM
BIOENSAIO VEGETAL

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO
2018

MAIKON KEOMA DA CUNHA HENRIQUE

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FITO-CITO-
GENOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
EUCALYPTUS UROPHYLLA E DO HÍBRIDO *EUCALYPTUS*
UROCAM (*E. UROPHYLLA* X *E. CAMALDULENSIS*) EM
BIOENSAIO VEGETAL

Monografia apresentada ao
Departamento de Ciências Florestais
e da Madeira da Universidade
Federal do Espírito Santo – UFES,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Engenheiro
Florestal

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO
2018

“Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares” Josué 1:9 (Bíblia)

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente pela sua compaixão, pela sua graça, pela sua bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Selma Martins da Cunha e ao meu pai Vanderlei de Oliveira Henrique pelo amor e dedicação, pela compreensão em todos os momentos.

Agradecer a Thammyres de Assis Alves, pelo suporte, apoio, confiança e amor em todos esses anos de aprendizado em conjunto.

Agradeço a Adeilton Alves, Marcelina Victor de Assis Alves, Thaynnara de Assis Alves, Thayllon de Assis Alves e João Alves Monteiro pelo apoio nesses anos, se fazendo presente em todas as situações dessa caminhada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praças Fontes, pelos ensinamentos, pela paciência e apoio ao longo da Graduação.

À Universidade Federal do Espírito Santo e aos professores do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, por toda contribuição profissional e pessoal nesta etapa de Graduação.

Aos amigos que fiz nessa caminhada, Ricardo Mendes de Moraes Jesus, Luan Teixeira Mendes, Apeles Costa Ribeiro, Sillas Ramos Mariano, Eduardo Bassini, Guilherme Bravim Canal.

À família que me acolheu, Abigail, Aéliçon, Thyago, Laiza, Lucemir, Paula, pessoas importantes e que me ajudaram nessa caminhada.

A todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui, mesmo não sendo fácil. Meu muito obrigado.

RESUMO

O uso de agroquímicos tem determinado no aumento da produtividade agrícola. Entretanto, a preocupação a respeito dos prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente, decorrentes do uso indiscriminado dos defensivos agrícolas, têm aumentado em todo o mundo. Assim, métodos alternativos para controle de pragas e doenças têm sido propostos para manutenção da produtividade e da qualidade de vida. Uma opção encontrada é o uso de compostos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas, como os óleos essenciais. Algumas dessas substâncias apresentam atividade, seja inibitória ou estimulatória, sobre o desenvolvimento de outros organismos. Assim, estudos visando a elucidação do efeito de tais compostos é incentivada, e quando possível a indicação para aplicação dos mesmos em campo. Esses estudos podem ser realizados por meio de bioensaios vegetais. Plantas do gênero *Eucalyptus* têm sido estudadas, possuindo diferentes atividades biológicas. Assim o objetivo do presente estudo foi determinar o rendimento e identificar os compostos dos óleos essenciais de *E. urophylla* e do híbrido *E. urocam* (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*), bem como, avaliar o potencial fito-cito-genotóxico e mutagênico desses óleos essenciais, por meio de bioensaios vegetais. Os resultados obtidos indicaram maior rendimento do óleo do híbrido. O composto majoritário de ambos os óleos foi o eucaliptol, representando mais de 85% em relação aos compostos presentes. Tanto o *E. urophylla* quanto o *E. urocam* apresentaram efeitos fito-cito-genotóxicos, mutagenicos e mecanismo de ação clastogênico e aneugênico, além de promoverem alterações epigenéticas nas células meristemáticas de alface. Dessa forma, os resultados apontam o potencial bioherbicida desses óleos.

Palavras-Chave: aneugenicidade, bioherbicida, clastogenicidade, *Lactuca sativa*, *Sorghum bicolor*.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Compostos presentes nos óleos essenciais de *E. urophylla* e em *E. urocam*. Onde a coluna “nº do pico” relaciona os picos mostrados na figura 1 com os compostos que os mesmos representam 11

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 - Picos dos compostos presentes nos óleos essenciais de *E. urophylla* (a) e em *E. urocam* (b) obtidos por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa..... 11
- Figura 2 - Fitotoxicidade dos óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ em alface (a) e em sorgo (b). As médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra *b* se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra *c* se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$). Onde: G – representa a porcentagem de sementes germinadas após 48h de exposição aos tratamentos; IVG – o índice de velocidade de germinação das sementes durante as primeiras 48h, avaliadas de 8 em 8h, após a exposição aos tratamentos; O – porcentagem de raízes oxidadas após 48h de exposição aos tratamentos; CR – tamanho das raízes em mm após 48h de exposição aos tratamentos; CA – tamanho da parte área da planta em mm após 120h de exposição aos tratamentos. 13
- Figura 3 - Ilustração de raízes de alface oxidadas após 48h de exposição aos óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 14
- Figura 4 – Ilustração dos efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. urophylla* (a e c) e com o híbrido *E. urocam* (b e d) no crescimento radicular das plântulas de alface (a e b) e sorgo (c e d). 15
- Figura 5 – Porcentagem de cada fase do ciclo celular de meristemas radiculares de alface tratados com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra *b* se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra *c* se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$)...... 16
- Figura 6 – Alterações celulares e cromossômicas em meristemas radiculares de alface tratadas com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra

b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$). Onde as abreviações representam: IM – índice mitótico, AC – alterações cromossômicas, AN – alterações nucleares, MNC – micronúcleo, NC – núcleo condensado.....	18
Figura 7 – Alterações nucleares, em (a) micronúcleo e em (b) núcleo condensado; e cromossômicas, em (c) c-metáfase, (d) aderente, (e) ponte em telófase, (f) ponte em anáfase com cromossomo perdido, observadas nas células meristemáticas de alface tratadas com os óleos essenciais de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. urocam</i> nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	20
Figura 8 – Frequência das AC observadas nas células meristemáticas de alface tratadas com os óleos essenciais de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. urocam</i> nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).....	21

Sumário

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
Objetivos gerais	2
Objetivos específicos	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Importância do desenvolvimento tecnológico agrícola	3
Preocupação ambiental e com a saúde humana	4
Uso de substâncias naturais com atividade biológica	5
O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua potencialidade	6
Bioensaios vegetais	7
MATERIAIS E MÉTODOS	8
Material vegetal.....	8
Extração do óleo	8
Ensaio fitotóxico	8
Análises estatísticas.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
Óleo essencial	10
Ensaio fitotóxico	12
Ensaio cito-genotóxico e mutagênico.....	16
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e suas aplicabilidades têm determinado em alta produtividade agrícola, bem como, na diminuição dos custos de produção (SILVA et al., 2005; BRAIBANTE e ZAPPE, 2012; ALVES e TEDESCO, 2015). Entretanto, as tecnologias alcançadas têm gerado discussões a respeito de suas consequências para a saúde humana e para o meio ambiente (SOLOMONS, 1989; JAVARONI et al., 1991; ANDRÉA, 2004; WERF, 1996; BOLOGNESI, 2003; SILVA et al., 2005; SOARES, 2011).

Muitos relatos têm sido efetuados em relação à contaminação de rios, lençóis freáticos, solos, culturas circunvizinhas, lagos e ar (RIGITANO e BARBOSA, 1994; MOREIRA e CRUZ, 1996). Associado a isso, encontra-se os problemas à fauna aquática e terrestre (WERF, 1996; FLORES et al., 2004; SOARES et al., 2011; SILVA et al., 2012). Casos de intoxicação e danos à saúde humana decorrente do contato com agroquímicos, seja por ingestão ou por contato pela pele tem alavancado os debates com o dilema dos benefícios e malefícios dessas substâncias (BRASIL, 2002; WAICHMAN et al., 2002 e 2007; MOSS, 2008; CARSON, 2010; LONDRES, 2011; INCA, 2015).

Para manter a qualidade da produção/produtividade e buscando mitigar os efeitos nocivos dos agroquímicos, produtos naturais com atividade biológica têm sido avaliados em estudos visando a produção de bioagroquímicos. Dentre os vários compostos/substâncias proeminentes nesse ramo de pesquisa estão os óleos essenciais de plantas com efeitos medicinais e/ou com uso alimentício (KORDALI et al., 2008; ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015). Além disso, resíduos vegetais de plantas cultivadas em monoculturas podem ser destinados para esse tipo de atividade, fazendo-se assim, maior aproveitamento da biomassa da planta.

Espécies do gênero *Eucalyptus*, dentre elas *E. urophylla* e o híbrido *E. urocam* (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*), são cultivadas em larga escala, visando, com seu caule, suprir a necessidade das indústrias de celulose, carvão e madeira (OLIVEIRA, 1997). Dessa forma, suas raízes e folhas são resíduos na produção, ou seja, são descartadas no processo produtivo. Muitas dessas espécies são descritas na literatura como medicinais, sendo utilizadas

como anti-inflamatórios, analgésicos e no tratamento de doenças respiratórias (SILVA et al., 2003; PEREIRA, 2010). Além disso, estudos confirmaram atividade antimicrobiana (DHALIWAL et al., 2004; OLUMA e GARBA, 2004; FALAHATI et al., 2005; MOREIRA et al., 2005), inseticida (TUNC, et al., 2000; PAPACHRISTOS e STAMOPOULOS, 2002; TINKEU et al., 2004; ERLER et al., 2006), antibactericida (RAMEZANI et. al., 2002), fitotóxica e citotóxica (ARAGÃO et al., 2015) de diferentes espécies de *Eucalyptus*, demonstrando a importância das pesquisas de possível atividade biológica de espécies pertencentes a esse gênero que ainda não tenham sido estudadas.

Os bioensaios têm sido utilizados em pesquisas relacionadas a avaliação da atividade biológica, bem como, para elucidação de compostos bioativos (ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; ARAGÃO et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018). Dentre os testes realizados para determinação de potencial herbicida de agentes testes estão as análises de fito-cito-genotoxicidade, mutagenicidade e determinação de mecanismos de ação do composto de interesse. Tais testes são utilizados, por apresentarem resultados claros e eficientes em curto período de tempo, utilizarem organismos modelo tanto mono quanto eudicotiledônea, serem de baixo custo, além de utilizarem como organismos teste vegetais que apresentam resultados correlatos com os encontrados em mamíferos (GRANT, 1994; ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; ARAGÃO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar o potencial alelopático, mutagênico e bioherbicida dos óleos essenciais de *E. urophylla* e seu híbrido *E. urocam* (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*), a partir de testes realizados com o modelo vegetal *Lactuca sativa* e *Sorghum bicolor*, por meio de avaliações de fitotoxicidade e citotoxicidade, bem como avaliar a similaridade entre os parâmetros avaliados entre as duas espécies, por se tratar de um híbrido e seu progenitor.

Objetivos específicos

- Comparar a composição química dos óleos essenciais de *E. urophylla* e seu híbrido *E. urocam*;
- Avaliar a fitotoxicidade dos óleos essenciais de *E. urophylla* e seu híbrido *E. urocam* frente ao desenvolvimento inicial de *L. Sativa* e *Sorghum bicolor*, a partir das variáveis porcentagem final da germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), oxidação (O), crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA);
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais de *E. urophylla* e seu híbrido *E. urocam* em células meristemáticas de *L. sativa* a partir das variáveis índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN);
- Comparar os parâmetros de fito e citotoxicidade de *E. urophylla* e seu híbrido *E. urocam*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importância do desenvolvimento tecnológico agrícola

Após a segunda guerra mundial teve início, nos Estados Unidos da América, a revolução verde. Esse movimento tinha como objetivo aumentar a produtividade agrícola. Para isso, a distribuição e aplicação de agroquímicos foi aumentada, as fronteiras agrícolas foram expandidas e a produção passou a ser de forma mecanizada (SILVA et al., 2005). Essas ações alcançaram o objetivo e foram difundidas para outros países, principalmente para os menos desenvolvidos, por meio de novas práticas agrícolas (ALVES e TEDESCO, 2015).

Para suprir a demanda de produtos desse movimento, diversos agroquímicos, com finalidades variadas, foram desenvolvidos, os quais possuem mais de 300 princípios ativos, distribuídos em mais de 2000 formulações (LARA e BATISTA, 1992). Como padrão para ordenação e

classificação dos defensivos agrícolas são considerados o seu modo de ação, sua função, sua origem química, seu nível de toxicidade e sobre qual organismo teste o mesmo atua (KRÜGER, 2009).

De acordo com o organismo teste sobre o qual o agroquímico atua, ele é classificado em: fungicidas – atuam no controle de fungo e são os defensivos com maior aplicação em atividades agrícolas (ZAMBOLIM e JESUS, 2008); acaricidas – inibem o desenvolvimento de ácaros (CHENCK e LEHOTAY, 2000); bactericidas – controlam a proliferação de bactérias, sendo aplicados, também, em tratamento de doenças em humanos (BIANCHINI e BEDENDO, 1998; TOKESHI, 2000; MARINHO e ARAUJO, 2008); inseticidas – atuam no controle de insetos indesejados (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012); herbicidas – são aplicados para controle de plantas daninhas, sendo a classe mais comercializada no Brasil (IBAMA, 2018).

Preocupação ambiental e com a saúde humana

Apesar dos reconhecidos benefícios alcançados para a saúde humana (diminuição da quantidade de doenças e controle de vetores) e para a agricultura, a partir do uso das tecnologias obtidas após a revolução verde, discussões a respeito de suas consequências diretas e indiretas para a saúde humana e para o meio ambiente têm sido realizadas (SOLOMONS, 1989; JAVARONI et al., 1991; ANDRÉA, 2004; WERF, 1996; BOLOGNESI, 2003; SILVA et al., 2005; SOARES et al., 2011).

Muitos relatos têm sido efetuados em relação à contaminação de rios, lençóis freáticos, solos, culturas circunvizinhas, lagos e ar (RIGITANO e BARBOSA, 1994; MOREIRA e CRUZ, 1996). Associado a isso, encontra-se os problemas à fauna aquática e terrestre (WERF, 1996; FLORES et al., 2004; SOARES et al., 2011; SILVA et al., 2012). Além de casos de intoxicação e danos à saúde humana decorrente do contato com agroquímicos, seja por ingestão ou por contato pela pele, têm alavancado os debates com o dilema dos benefícios e malefícios dessas substâncias (BRASIL, 2002; WAICHMAN et al., 2002 e 2007; MOSS, 2008; CARSON, 2010; LONDRES, 2011; INCA, 2015).

Uso de substâncias naturais com atividade biológica

Devido à importância do uso de agroquímicos para a manutenção da produtividade agrícola, bem como, para o controle de vetores transmissores de doenças humanas (BIANCHINI e BEDENDO, 1998; TOKESHI 2000; MARINHO e ARAUJO 2008; BRAIBANTE e ZAPPE, 2012), faz-se necessário a aplicação de métodos alternativos (SOUZA FILHO et al., 2006).

As plantas, por necessitarem de se defender de predadores e de se adaptar a diferentes condições ambientais, desenvolveram mecanismo de defesa eficazes (RASCHER e HAY, 2014). Tais mecanismos além de propiciarem maior valor evolutivo, contribuindo para o estabelecimento desses organismos nos mais variados ecossistemas, também fazem parte da interação dos vegetais com outros organismos, podendo inibir, estimular ou não interferir no desenvolvimento desses (ALVES et al., 2004; BAIS et al., 2006; LARCHER, 2006; RASCHER e HAY, 2014).

Os metabólitos secundários, produzidos naturalmente pelos vegetais e dentre os quais encontram-se os óleos essenciais, são os responsáveis por sua interação com o ambiente, sendo dessa maneira, o alvo de estudos que visam a avaliação de atividade biológicas de plantas (SOUZA et al., 2002; IGANCI et al., 2006).

Dessa forma, para manter a qualidade da produção/produtividade e buscando mitigar os efeitos nocivos dos agroquímicos, produtos naturais com atividade biológica têm sido avaliados em estudos visando a produção de bioagroquímicos. Dentre os vários compostos/substâncias proeminentes nesse ramo de pesquisa estão os óleos essenciais de plantas com efeitos medicinais e/ou com uso alimentício (KORDALI et al., 2008; ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015). Além disso, resíduos vegetais de plantas cultivadas em monoculturas podem ser destinados para esse tipo de atividade, fazendo-se assim, maior aproveitamento da biomassa da planta.

O gênero *Eucalyptus* e sua potencialidade

De origem Australiana o gênero *Eucalyptus* pertence à família das Myrtaceae. No Brasil seu plantio é feito em escala comercial, para atender principalmente aos seguimentos de celulose e energia. De acordo com Pereira et al. (2000), as primeiras árvores desse gênero, no Brasil, foram plantadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro no século XIX. As pesquisas com eucalipto tiveram início em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade para atender a demanda existente de madeira para construção de ferrovias (SAMPAIO,1961). Atualmente as espécies mais plantadas no Brasil são *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e o *E. camadulensis* (SBS,2008).

Devido ao seu rápido crescimento e a plasticidade como se adaptam as condições edafoclimáticas do Brasil (STURION e BELLOTE, 2000; MARTINEZ et al., 2012), seu fuste é utilizado como uma estratégia para diminuir a pressão por matéria prima nas florestas nativas (CAMPINHO, 2001). O tronco fornece madeira para diferentes finalidades como energia, serraria e na produção de polpa de celulose (OLIVEIRA ,1997). Os resíduos da colheita florestal como galhos e folhas são deixados no solo na forma de ciclagem de nutrientes, retornando ao solo um teor aproximado de 65% de N, P, K, Ca e Mg (SANTANA et al., 2008).

A composição química do eucalipto contribui positivamente para sua ação em diferentes atividades biológicas. Dessa maneira, já foram descritas as atividades fitotóxica e citotóxica dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. citriodora* (ARAGÃO et al., 2015); a atividade inseticida de *E. camaldulensis* (TUNC, et al., 2000; ERLER et al., 2006), *E. globulus* (PAPACHRISTOS e STAMOPOULOS, 2002), *E. citriodora* (TINKEU et al., 2004); e a atividade antimicrobiana de *E. camaldulensis* (DHALIWAL et al., 2004; FALAHATI et al., 2005), *E. globulus* (OLUMA e GARBA, 2004; MOREIRA et al., 2005), *E. urograndis* (LIU et al., 2008), *E. saligna* e *E. robusta* (SARTORELLI et al., 2007); atividade antibacteriana de *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. tereticornis* (RAMEZANI et. al., 2002). Além disso, os óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* têm atividades medicinais, sendo aplicados para tratamento de problemas da saúde humana, como em infecções pulmonares e

tuberculose (PEREIRA, 2010), bem como anti-inflamatório e analgésico (SILVA et al., 2003).

Bioensaios vegetais

Um importante modelo, dentre os organismos eucariotos, são os vegetais superiores, como a *Lactuca sativa* (alface - eudicotiledônea), *Allium cepa* (cebola - monocotiledônea) e *Sorghum bicolor* (sorgo - monocotiledônea). Esse grupo de seres vivos são sensíveis a substâncias tóxicas, possibilitando a identificação dos níveis de toxicidade de diferentes concentrações de compostos isolados, bem como, de efeitos sinérgicos entre moléculas (SOUZA et al., 2002; REIGOSA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2015).

Devido à universalidade do código genético, os resultados obtidos a partir de ensaios com vegetais, apontam os riscos que determinadas substâncias conferem a outros organismos (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2009; FIRBAS e AMON, 2013; BRAGA e LOPES, 2015). Além disso, existe correlação entre as respostas encontradas em bioensaios vegetais com os encontrados em ensaios que utilizam outro sistema teste, incluindo mamíferos (BAGATINI et al., 2007; ARRAES e LONGHIN, 2012; TEDESCO et al., 2015).

Outra vantagem da utilização de plantas superiores como organismos teste é a possibilidade de avaliar diferentes variáveis simultaneamente, como: fitotoxicidade - porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e aéreo; citotoxicidade - alteração na proporção das fases do ciclo celular, alteração do índice mitótico; genotoxicidade - alteração cromossômicas estruturais e numéricas; mutagenicidade - alterações nucleares; além de elucidar o mecanismo de ação celular da substância teste (GRANT, 1994; LEME e MARIN MORALES, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de clones adultos de *E. urophylla* (parental) e *E. urocam* (híbrido de *E. urophylla* com *E. camaldulensis*) foram coletadas no horto florestal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo que está localizado na Rodovia ES 482, Km 43, sem número, tendo as coordenadas 20°47'43.7"S 41°24'20.9"W e seus respectivos óleos foram extraídos. Para análises do efeito biológico foram utilizadas sementes de *L. sativa* (eudicotiledônea) “Crespa Grand Rapids - TBR” (ISLA) e de *S. bicolor* (monocotiledônea) “AL precioso” (Br seeds).

Extração do óleo

Primeiramente as folhas foram pesadas, trituradas com água destilada e colocadas no aparelho Clevenger para extração do óleo. Posteriormente, pesou-se o óleo obtido e identificou-se os seus constituintes a partir de cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (MENDES et al., 2018). Esse procedimento foi realizado isoladamente para ambas as espécies em estudo.

O rendimento de cada óleo essencial é expresso em porcentagem, sendo calculado comparando a quantidade, em g, de folhas utilizadas para obtenção do óleo com a quantidade, em g, de óleo obtido.

Ensaio fitotóxico

Para realização do ensaio fitotóxico, utilizou-se cinco concentrações (3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) de cada óleo essencial obtido. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituído por 25 sementes. As análises foram realizadas com alface e sorgo, sendo aplicado como controles negativos (C-) água destilada e diclorometano (solvente usado na preparação dos concentrados) e como controle positivo (C+) foi utilizado o herbicida comercial glifosato, na concentração indicada pelo fabricante, 0,1%.

Avaliou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes acompanhando o número de sementes germinadas por placa de 8 em 8h durante as primeiras 48h de exposição aos tratamentos. A porcentagem de germinação (G) e a porcentagem de raízes oxidadas (O) foram avaliadas a partir da contagem de sementes germinadas/raízes oxidadas por placa após 48h de exposição aos tratamentos. Os crescimentos radiculares (CR) e aéreos (CA) foram aferidos após 48h e 120h de exposição aos tratamentos, respectivamente.

Ensaio cito-genotóxico e mutagênico

Foi realizado em raízes de alface após 48h de exposição aos tratamentos supracitados e com o mesmo delineamento experimental descrito. Para isso, raízes após 48h de exposição foram coletadas e fixadas em álcool etílico:ácido acético (3:1). Após 24h de fixação, preparou-se as lâminas utilizando como coranteorceína acética 2%. Em cada lâmina foram avaliadas aproximadamente 1000 células, classificando-as de acordo com a fase do ciclo mitótico e em relação aos danos celulares apresentados.

Para avaliação da citotoxicidade calculou-se o índice mitótico (IM) dividindo o número de células em divisão pelo número total de células avaliadas. O efeito genotóxico foi averiguado a partir da quantidade de alterações cromossômicas observadas (AC), a qual é calculada a partir da razão entre a quantidade de células com AC e o número total de células avaliadas, bem como, pelas frequências de cada AC observadas, as quais são calculadas pela razão entre a quantidade de cada AC pelo total de células em divisão observadas. O efeito mutagênico foi mensurado a partir das alterações nucleares (AN), calculada a partir da razão entre a quantidade de células com AN e o número total de células avaliadas, bem como, pelas frequências de cada AN observada, as quais são calculadas por meio da razão entre a quantidade de cada AN e o número total de células avaliadas.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas entre si por meio do teste de Dunnett ($p < 0,05$). Esse teste foi escolhido, por ser o mais indicado para comparação de tratamentos com controles (McHUGH, 2011). Todos os dados foram processados no programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Óleo essencial

O óleo essencial de *E. urocam* apresentou rendimento de 0,77%, enquanto o *E. urophylla* apresentou 0,20% por fração fresca de folha. Cimanga et al. (2002), estudou o óleo essencial de diferentes espécies de eucalipto e obteve um rendimento de 0,53% do óleo essencial de *E. urophylla*, utilizando o mesmo método de extração e comparando com o peso das folhas frescas. A variação encontrada pode ser decorrente das condições ambientais, idade da planta e da folha, fatores genéticos, bem como, método utilizado para extração e identificação do óleo (XAVIER, 1993).

Cimanga et al. (2002), também estudaram o óleo essencial de *E. camaldulensis* o outro progenitor do híbrido *E. urocam*. Os dados obtidos demonstraram menor rendimento desse progenitor (0,30% de rendimento) quando comparado com o *E. urophylla* o qual apresentou como já relatado 0,53%. Uma vez que, a coleta dos indivíduos da atual pesquisa foi feita em mesmo local (mesma condição ambiental) e seguiu o mesmo padrão de tamanho e idade dos indivíduos e das folhas (minimizando as diferenças fisiológicas), pode se inferir que o rendimento do híbrido (0,77%), por ser superior ao dos parentais, decorre do efeito aditivo da combinação dos genes parentais, determinando em maior rendimento no óleo do híbrido.

Em relação à caracterização química dos óleos essenciais, observou-se quatro picos em cada óleo, permitindo a identificação de quatro compostos em cada (Figura 1). No óleo essencial de *E. urophylla* o composto majoritário foi o monoterpeno oxigenado eucaliptol com 87,9%, seguido pelo sesquiterpeno oxigenado viridiflorol (5,1%), hidrocarboneto monoterpeno α -pineno (4,3%) e

hidrocarboneto sesquiterpeno aromadendreno (2,6%) (Tabela 1). O composto majoritário do *E. urocam* também foi o eucaliptol, com 89,8%, seguido pelo monoterpreno oxigenado terpineol (6,73%), α -pineno (1,9%) e monoterpreno oxigenado linalol (1,4%) (Tabela 1).

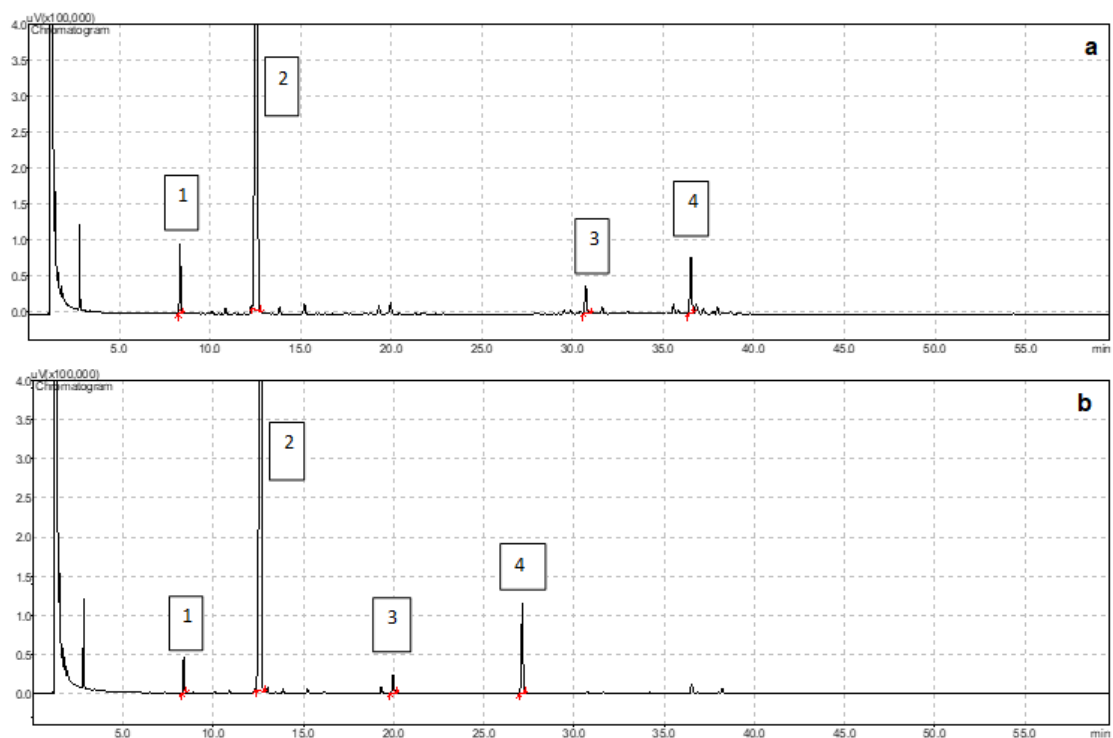


Figura 1 - Picos dos compostos presentes nos óleos essenciais de *E. urophylla* (a) e em *E. urocam* (b) obtidos por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas.

Tabela 1 - Compostos presentes nos óleos essenciais de *E. urophylla* e em *E. urocam*. Onde a coluna “nº do pico” relaciona os picos mostrados na figura 1 com os compostos que os mesmos representam

ESPÉCIE	Nº DO PICO	COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO	ÁREA DO PICO (%)
<i>Eucalyptus urophylla</i>	1	Alfa Pineno	8.3	4.3
	2	Eucaliptol	12.6	87.9*
	3	Aromadendreno	30.7	2.6
	4	Viridiflorol	27.1	5.1
<i>Eucalyptus urocam</i>	1	Alfa Pineno	8.3	1.9
	2	Eucaliptol	12.6	89.8*
	3	Linalol	19.9	1.4
	4	Terpineol	27.1	6.73

*Composto majoritário.

O eucaliptol foi descrito na literatura como o componente majoritário tanto do óleo essencial de *E. urophylla*, quanto de *E. camaldulensis* (CIMANGA et al., 2002; PEREIRA, 2010). Fato também observado no óleo do híbrido *E. urocam* na presente pesquisa. Além disso, Cimanga et al. (2002) e Pereira (2010), descreveram a presença de α pineno, eucaliptol e terpineol em ambos os parentais, enquanto a presença do linalol foi descrita por Cimanga et al. (2002) em *E. urophylla*.

O α pineno é um hidrocarboneto monoterpreno presente em ambos os parentais. Segundo Pereira (2010), esse composto representava 1,7% do óleo de *E. camaldulensis* e 5,0% do óleo do *E. urophylla*. Dessa forma, a porcentagem de α pineno encontrada em *E. urophylla*, no presente estudo, se assemelha à encontrada por aquele autor. A porcentagem de α pineno encontrada em *E. urocam*, no presente estudo, tem maior semelhança com a encontrada no parental *E. camaldulensis* por Pereira (2010).

Já o linalol foi descrito por Cimanga et al. (2002), como parte da composição do óleo de *E. urophylla*, representando 2,5% da composição total do óleo. Dessa maneira, observa-se uma diminuição na proporção observada no híbrido *E. urocam*, quando comparado com o parental.

Tanto Pereira (2010), quanto Cimanga et al. (2002), descreveram o terpineol como parte dos óleos essenciais das espécies parentais, entretanto em proporções inferiores à encontrada no híbrido, no presente estudo, indicando a presença de efeito aditivo em sua produção.

Ensaio fitotóxico

As análises de fitotoxicidade demonstraram o efeito tóxico de ambos os óleos testados. Todos os tratamentos apresentaram médias do IVG inferiores às dos C-, sendo que tal diferença foi demonstrada por meio da análise estatística nos tratamentos de *E. urocam* na concentração de $3000\mu\text{g L}^{-1}$ em alface e em sorgo, e na concentração de $1500\mu\text{g L}^{-1}$ em alface (Figura 2). Segundo Iganci et al. (2006), esse é o parâmetro mais sensível dentre os

avaliados em ensaios de fitotoxicidade. De modo que, sua inibição indica a toxicidade do agente teste independentemente dos resultados observados nos demais parâmetros mensurados.

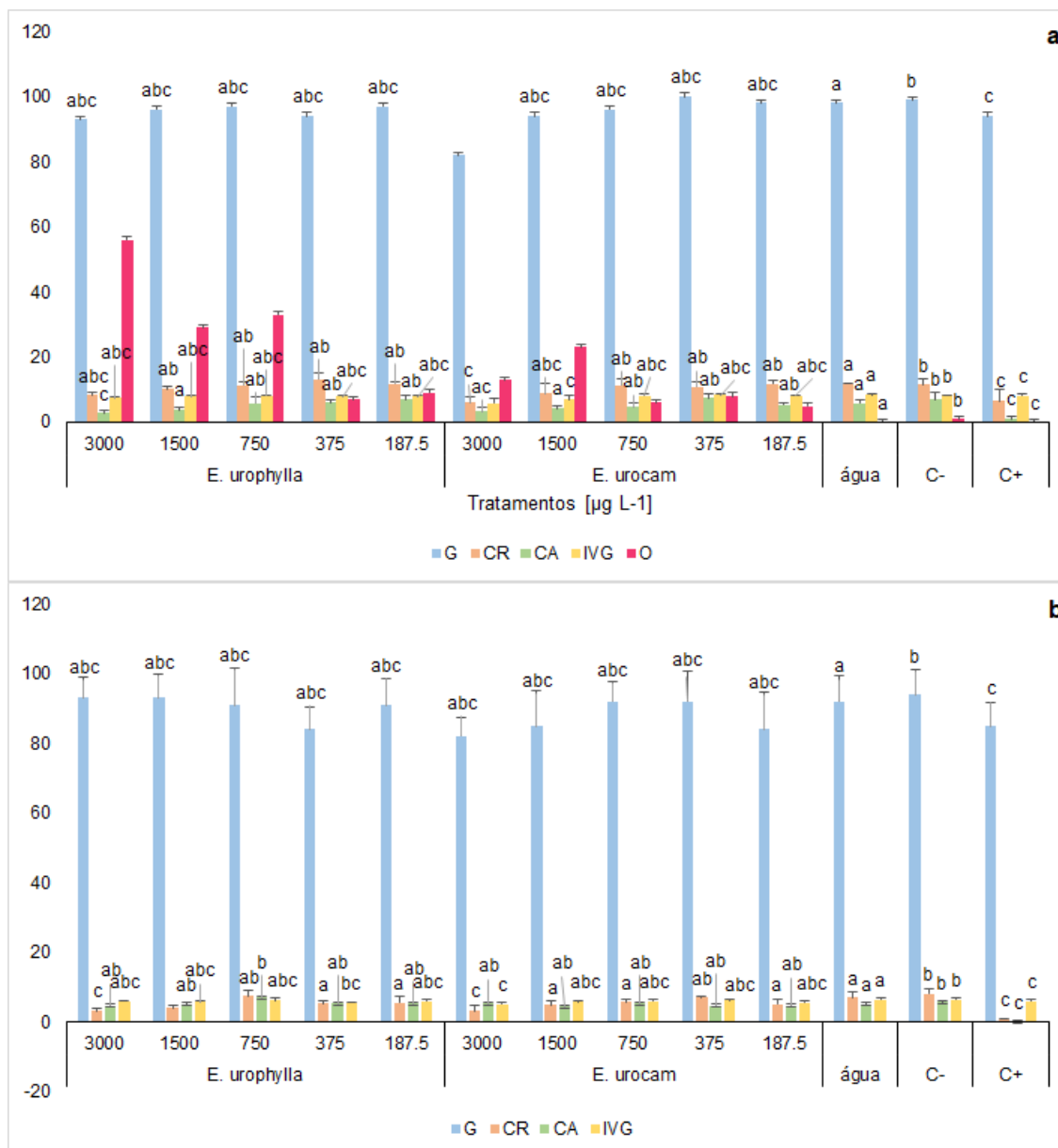


Figura 2 - Fitotoxicidade dos óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 µg L⁻¹ em alfaca (a) e em sorgo (b). As médias seguidas pela letra *a* se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra *b* se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra *c* se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$). Onde: G – representa a porcentagem de sementes

germinadas após 48h de exposição aos tratamentos; IVG – o índice de velocidade de germinação das sementes durante as primeiras 48h, avaliadas de 8 em 8h, após a exposição aos tratamentos; O – porcentagem de raízes oxidadas após 48h de exposição aos tratamentos; CR – tamanho das raízes em mm após 48h de exposição aos tratamentos; CA – tamanho da parte área da planta em mm após 120h de exposição aos tratamentos.

A G foi inibida significativamente nas sementes de alface tratadas com *E. urocam* $3000\mu\text{g L}^{-1}$, sendo tal inibição de 17% (Figura 2). Segundo Aragão et al. (2017), esse é o parâmetro menos sensível, expressando a fitotoxicidade aguda dos compostos teste.

Ambos os óleos testados promoveram oxidação nas raízes de alface (Figura 3), sendo tal efeito não observado em sorgo. Todos os tratamentos com óleos provocaram aumento da O em alface, sendo que tal aumento foi significativo nos tratamentos com *E. urophylla* nas concentrações 3000, 1500 e $750\mu\text{g L}^{-1}$, sendo em 56, 29 e 33 vezes, respectivamente, quando comparados com o controle (Figura 2). Esse fenômeno oxidativo, expresso a partir do escurecimento das raízes, tem sido relacionado com a produção, oxidação e liberação de compostos fenólicos, os quais inibem o crescimento e desenvolvimento do indivíduo (MELO et al., 2001).



Figura 3 - Ilustração de raízes de alface oxidadas após 48h de exposição aos óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e $187,5\mu\text{g L}^{-1}$.

O óleo de *E. urocam* $3000\mu\text{g L}^{-1}$ provocou inibição significativa no CR de ambas as espécies modelo, sendo tal inibição de 48% na alface e 60% no sorgo, quando comparado com o C- (Figura 2 e 4). Já o óleo de *E. urophylla* nas concentrações de 3000 e $1500\mu\text{g L}^{-1}$ inibiram o desenvolvimento radicular de sorgo em 60% e 50%, respectivamente, quando comparados com o C- (Figura 2). Tal resultado pode estar associado ao efeito tóxico oxidativo acima descrito, o que promoveu diminuição no CR das plântulas. Além disso, Aragão et al. (2017), descreveram essa variável como a mais sensível dentre as referente à crescimento.



Figura 4 – Ilustração dos efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. urophylla* (a e c) e com o híbrido *E. urocam* (b e d) no crescimento radicular das plântulas de alface (a e b) e sorgo (c e d).

O óleo de *E. urocam* não promoveu inibição significativa no CA das plantas modelo, enquanto que o de *E. urophylla* na concentração de $3000\mu\text{g L}^{-1}$ inibiu em 60% o CA da alface (Figura 2). Tal resultado, provavelmente está relacionado com a composição química dos óleos essenciais, bem como pelo efeito sinérgico entre as moléculas. Aragão et al. (2015), estudando a atividade alelopática de *E. grandis* e de *E. citriodora*, relataram que o efeito sinérgico do óleo essencial de *E. grandis*, o qual possui α pineno como componente majoritário, foi mais evidente, propiciando maior efeito fitotóxico. Comparando

esses resultados com o da presente pesquisa, conclui-se que o α pineno, mais abundante em *E. urophylla* do que em *E. urocam*, proporciona maior fitotoxicidade, quando em sinergismo com os demais componentes do óleo, propiciando maior inibição no CA das plântulas tratadas com *E. urophylla*, do que com o seu híbrido *E. urocam*.

Ensaio cito-genotóxico e mutagênico

O óleo de *E. urophylla* nas concentrações de 3000 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ promoveram um incremento significativo de 1,5 e 3%, respectivamente, na frequência de células em intérfase (Figura 5). O aumento de células em intérfase indica a ocorrência de um bloqueio da mitose (ARAGÃO et al., 2015 e 2017), podendo estar relacionado com a inibição da síntese de DNA devido ao aumento de danos a essa molécula, visado minimizar os prejuízos ao tecido (KORDALI et al., 2008). Esse resultado também foi observado por Aragão et al. (2015), em tratamentos com óleo essencial de *E. grandis* e *E. citriodora*.

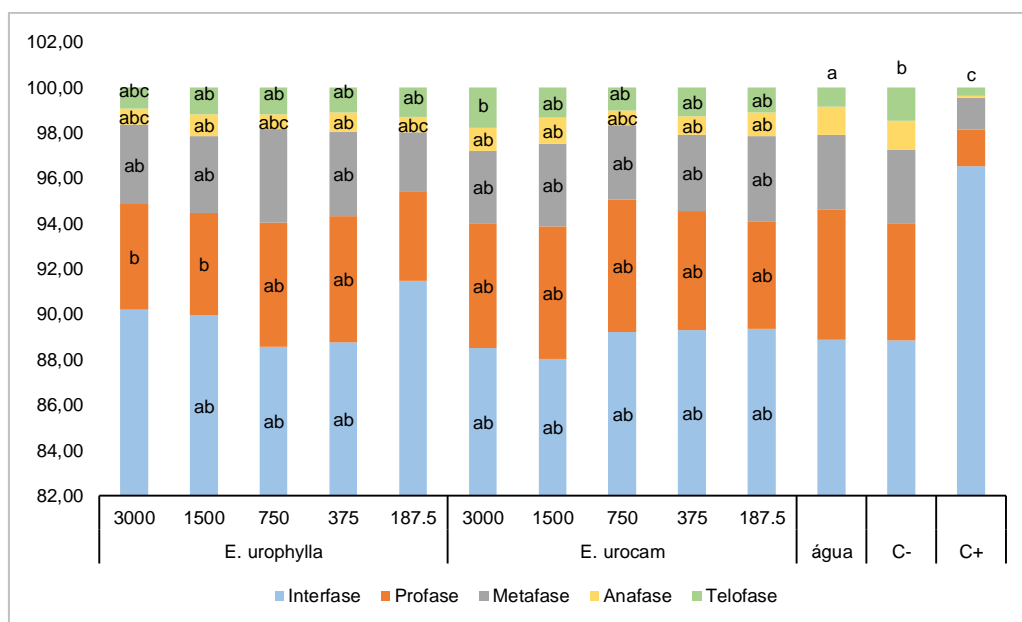


Figura 5 – Porcentagem de cada fase do ciclo celular de meristemas radiculares de alface tratados com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- água destilada, as seguidas

pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).

O óleo de *E. urophylla* na menor concentração ($187,5\mu\text{g L}^{-1}$) provocou o decréscimo na porcentagem de prófase e metáfase em 31% e 21%, respectivamente. Esse resultado reforça o resultado anterior e pode estar relacionado com o aumento de oxidação das raízes tratadas com esse óleo, anteriormente relatado. Uma vez, que tal fenômeno está relacionado com a liberação de compostos fenólicos, os quais são tóxicos para a planta (ARAGÃO et al., 2017).

Além disso, o óleo de *E. urophylla* na concentração de $750\mu\text{g L}^{-1}$ resultou em aumento de 24% na frequência de metáfases (Figura 5). Esse resultado pode estar relacionado ao aumento da aderência cromossômica, o que altera o padrão das fases da divisão mitótica e determina na permanência da célula em metáfase (ARAGÃO et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Os tratamentos mais citotóxicos foram o do óleo de *E. urophylla* nas concentrações de 3000 e $187,5\mu\text{g L}^{-1}$, os quais inibiram significativamente o IM em 13 e 23%, respectivamente (Figura 6). Esse parâmetro é um endpoint bem estabelecido como um indicador de agentes tóxicos, uma vez que, em condição de estresse as células sofrerão redução na quantidade de células em divisão, visando minimizar o contato com a substância tóxica (LEME e MARIN-MORALES, 2009; ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; ARAGÃO et al., 2017; COSTA et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

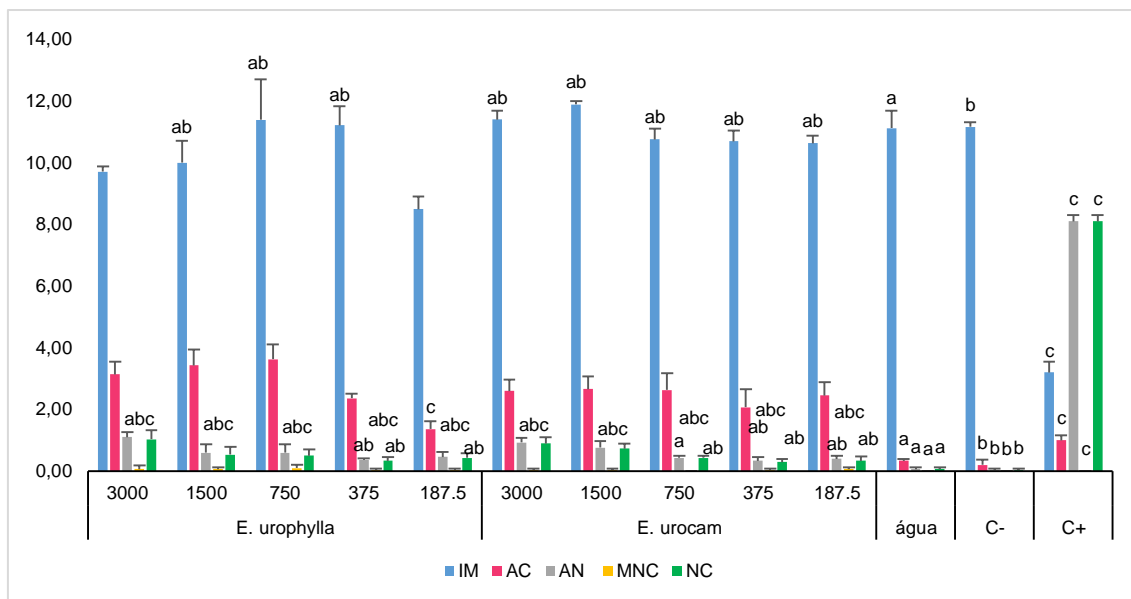


Figura 6 – Alterações celulares e cromossomais em meristemas radiculares de alfaca tratadas com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5µg L⁻¹, onde as médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett (p<0,05). Onde as abreviações representam: IM – índice mitótico, AC – alterações cromossômicas, AN – alterações nucleares, MNC – micronúcleo, NC – núcleo condensado.

Todos os tratamentos foram genotóxicos, promovendo aumento significativo nas AC, quando comparados com os C- e o C+, sendo esse aumento de 9,4; 10,3; 11; 7,96; 4,15 vezes, nos tratamentos com *E. urophylla* nas concentrações 3000, 1500, 750, 375 e 187,5µg L⁻¹, respectivamente (Figura 6). Nos tratamentos com o óleo de *E. urocam* nas concentrações 3000, 1500, 750, 375 e 187,5µg L⁻¹ esse aumento foi de 7,8; 8; 7,96; 6,27 e 7,15, respectivamente (Figura 6). As ACs são provocadas pela interação entre o material genético da célula com o composto químico presente no ambiente, sendo um endpoint de genotoxicidade (BERNARDES et al., 2015).

O óleo de *E. urophylla* tem maior potencial mutagênico do que o de *E. urocam*, uma vez que ambos promoveram aumento na frequência de AN,

porém o óleo de *E. urophylla* nas concentrações de 3000, 1500, 750, e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, promoveram aumento significativo de 15,7; 8,5; 8,5 e 6,71 vezes, respectivamente. Enquanto o óleo de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, propiciou o aumento significativo de 5,5 e 11 vezes, respectivamente, quando comparados com o C- (Figura 6). As ANs são alterações morfológicas, que ocorrem em decorrência de mudanças bioquímicas no núcleo da célula, como mecanismo de defesa de possíveis “erros” nucleares provenientes da interação com o ambiente (FERNANDES et al., 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

As AN observadas foram micronúcleo (MNC) e núcleo condensado (NC) (Figura 7a e 7b), sendo que NC foi mais frequente de forma a contribuir em maior escala na quantidade total de AN (Figura 6). O MNC provém de cromossomos que são “perdidos” durante a divisão celular (não incorporados corretamente ao núcleo da célula filha) ou ainda são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (também não incorporados no núcleo das células filhas). Dessa forma, esses MNC tem a função de envolver e eliminar essas porções extras/soltas de DNA do citoplasma da célula (DIETZ et al., 2000; FERNANDES et al., 2009; SANTOS et al., 2018).

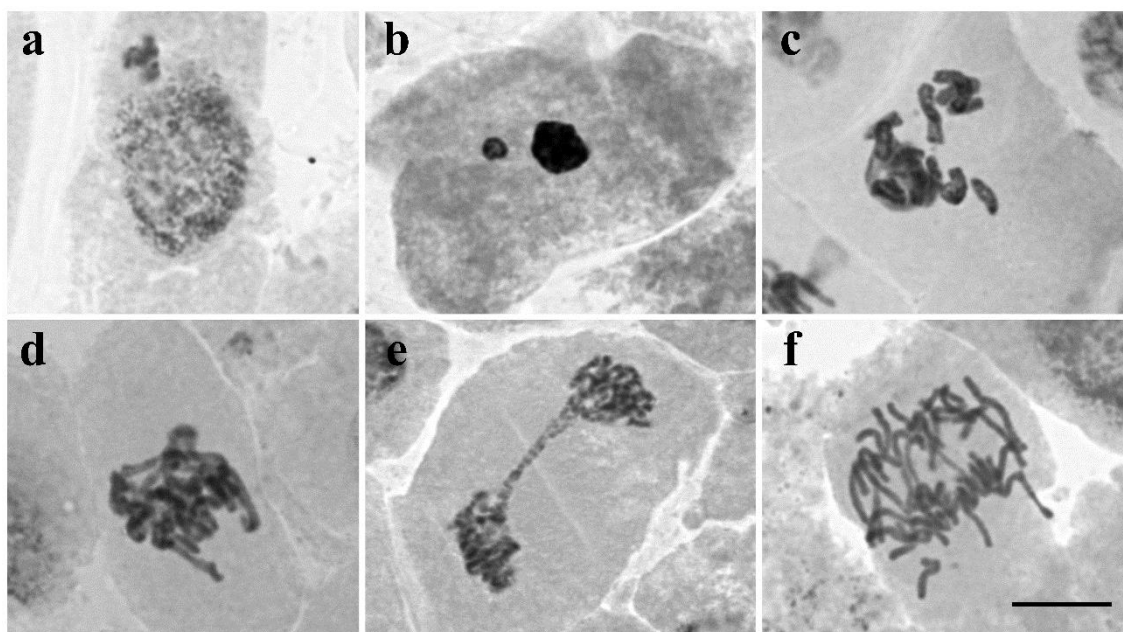


Figura 7 – Alterações nucleares, em (a) micronúcleo e em (b) núcleo condensado; e cromossômicas, em (c) c-metáfase, (d) aderente, (e) ponte em telófase, (f) ponte em anáfase com cromossomo perdido, observadas nas células meristemáticas de alface tratadas com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5µg L⁻¹.

As células tratadas com o óleo de *E. urophylla* nas concentrações de 3000, 1500 e 750µg L⁻¹, apresentaram frequência de NC significativamente superior a frequência do C- de 14,71, 7,57 e 7,14 vezes, respectivamente. Enquanto que, o óleo de *E. urocam* nas concentrações de 3000 e 1500µg L⁻¹, promoveu aumento significativo de 12,8 e 10,4 vezes, respectivamente (Figura 6). O NC é a expressão citológica da ocorrência da morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011 e 2012). Tal mecanismo tem como principal função a manutenção da homeostase tecidual, além de eliminar as células que poderiam desencadear processos malignos ao organismo, por conterem alterações no DNA (SILVA et al., 2017). Dessa maneira, essa variável sofre incremento de acordo com que os danos genéticos aumentam (KORDALI et al., 2008).

As AC observadas foram: cromossomo perdido, multipolaridade, aderência cromossômica, c-metáfase, ponte cromossômica, atraso dos cromossomos na telófase e fragmento cromossômico (Figura 7). Essas frequências de cada AC elucidam o mecanismo de ação do óleo, o qual pode ser clastogênico ou aneugênico (FERNANDES et al., 2009; ARAGÃO et al., 2015; BERNARDES et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; ARAGÃO et al., 2017; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

O mecanismo de ação aneugênico é promovido em decorrência de alterações na maquinaria mitótica da célula, promovendo mudanças no fuso mitótico, envolvendo a polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Enquanto, os agentes clastogênicos interagem com o material genético da célula, provocando danos ao DNA (FERNANDES et al., 2009; BERNARDES et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Houve aumento na frequência de cromossomo perdido em todos os tratamentos analisados, sendo significativo nos tratamentos com óleo *E. urophylla* nas três maiores concentrações, tais aumentos foram de 13,9, 10,94 e 13,6 vezes, respectivamente (Figura 8).

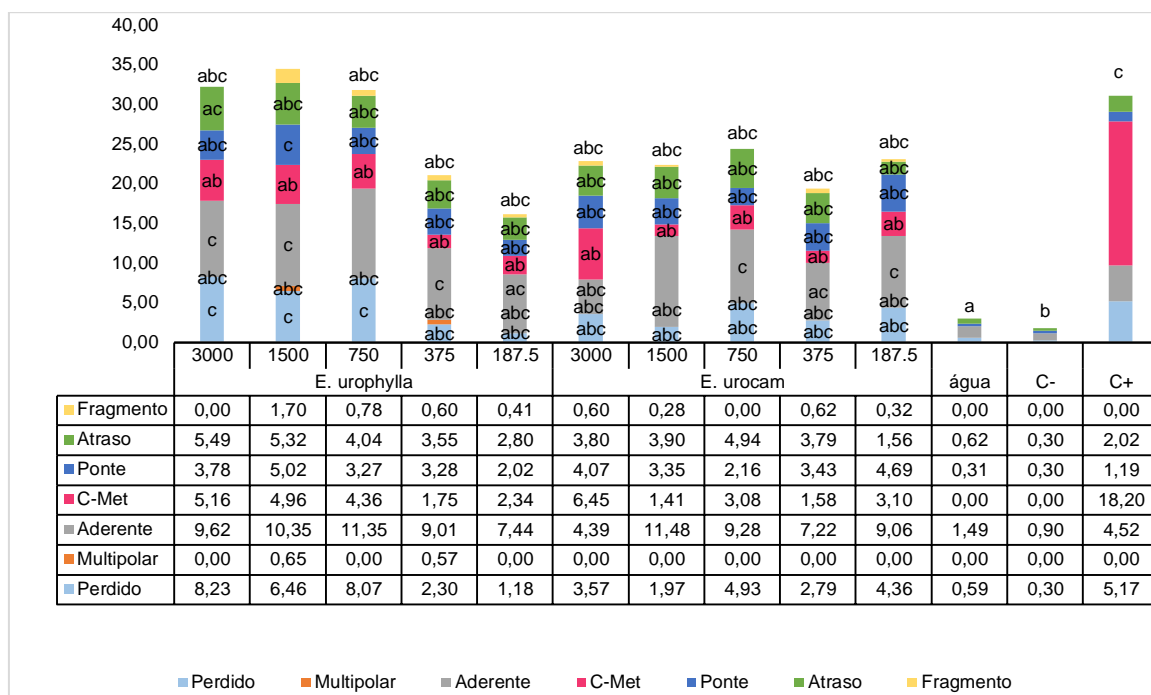


Figura 8 – Frequência das AC observadas nas células meristemáticas de alfaca tratadas com os óleos essenciais de *E. urophylla* e de *E. urocam* nas concentrações de 3000, 1500, 750, 375 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as médias seguidas pela letra a se igualaram ao C- água destilada, as seguidas pela letra b se igualaram ao C- diclorometano (DCM) e as seguidas pela letra c se igualaram ao C+ glifosato, de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).

A multipolaridade, alteração aneugênica, foi observada nas células tratadas com óleo *E. urophylla* nas concentrações de 1500 e 375 $\mu\text{g L}^{-1}$, não apresentando aumento significativo (Figura 8). Essa AC tem relação com a ação aneugênica, uma vez que resulta da formação de múltiplos sítios de nucleação, o que pode ser provocado pelo desequilíbrio genético da célula, ocorrendo em células poliploides (FERNANDES et al., 2009).

A aderência cromossômica foi a alteração mais frequentemente observada apresentando incremento em todos os tratamentos, tendo aumento

significativo de 6,45; 6,94; 7,61 e 6,04 vezes nos tratamentos de *E. urophylla* nas concentrações de 3000, 1500, 750 e 375 $\mu\text{g L}^{-1}$, bem como, de 7,7; 6,22 e 6,08 vezes nas células tratadas com o óleo de *E. urocam* nas concentrações de 1500, 750 e 187,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 8). A aderência cromossômica é decorrente de alterações citológicas, genéticas e epigenéticas, sendo essa última indicada uma vez que tal alteração advém de mudanças no padrão de fosforilação das histonas, indicando tanto ação aneugênica, quanto ação clastogênica (FREITAS et al., 2016; SILVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Embora muito frequente e tendo aumento em todos os tratamentos, a c-metáfase não apresentou diferença estatística dos C-, por conta do baixo número de células em divisão do C+, fazendo com que a frequência de c-metáfases (que é obtida pela razão do número de células com c-metáfase observada pelo total de células em divisão) ficasse alta nesse tratamento (Figura 8). As c-metáfases demonstram ação aneugênica do agente teste, já que, expressa a inativação completa dos microtúbulos e conseqüentemente da formação do fuso mitótico (COSTA et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Outra alteração que apresentou aumento, não significativo, em todos os tratamentos foi o atraso dos cromossomos na telófase (Figura 8). Essa alteração está relacionada com a interferência dos óleos essenciais testados na despolimerização dos microtúbulos, determinando em um arrastamento desigual dos cromossomos. Tal alteração faz com que a célula tenha a reconstituição de um envoltório nuclear com deformação, visando envolver todo o material genético cabível a ele e posteriormente essa deformação é desfeita (FERNANDES et al., 2009).

A frequência de ponte cromossômica aumentou em todos os tratamentos, sendo esse significativo e de 16 vezes, quando comparado ao C-, nas células tratadas com o óleo de *E. urophylla* na concentração de 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Fato semelhante foi observado na fragmentação cromossômica, a qual teve aumento significativo nesse mesmo tratamento (Figura 8). O aumento da frequência de ponte e fragmentos cromossômicos indica a ação clastogênica do agente teste (FERNANDES et al., 2009). Além disso, tal resultado sugere a ocorrência do ciclo quebra-fusão-quebra, onde ocorre a fragmentação

cromossômica deixando extremidades coesivas livres nos cromossomos, o que provoca a fusão (ponte) de cromossomos. Quando esses cromossomos são arrastados pelos seus centrômeros para os polos celulares, por meio da despolimerização dos filamentos de alfa e beta tubulina, ocorre novamente a quebra de cromossomos formando novos fragmentos cromossômicos, possibilitando nova fusão e futuras quebras (SILVEIRA et al., 2017).

Experimentos elucidativos englobando a fito-cito-genotoxicidade, mutagenicidade e o mecanismo de ação de compostos naturais é importante para melhor aproveitamento do material/resíduo vegetal, bem como, para minimização dos prejuízos ambientais.

CONCLUSÃO

O rendimento e a caracterização dos óleos essenciais de *E. urophylla* e de seu híbrido *E. urocam* indicaram efeito aditivo dos genes herdados para tais características, sendo o rendimento do óleo essencial do híbrido superior ao dos parentais.

Tanto o *E. urophylla* quanto o *E. urocam* apresentaram efeitos fito-cito-genotóxicos, mutagênicos e mecanismo de ação clastogênico e aneugênico, além de promoverem alterações epigenéticas nas células meristemáticas de alface, identificadas a partir do aumento de aderência cromossômica.

Os resultados apontam o potencial bioherbicida desses óleos, levantando dessa forma, a possibilidade de os resíduos foliares dessas espécies serem destinadas para a extração de óleo essencial, visando sua aplicação no controle de plantas daninhas

REFERÊNCIAS

ALVES, M. D. C. S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, p.1083-1086, 2004.

ALVES, C. T.; TEDESCO, J. C. A revolução verde e a modernização agrícola na mesorregião noroeste do Rio Grande do Sul–1960/1970. **Revista Teoria e Evidência Econômica**, v. 21, 2015.

ALVES, T. A.; PINHEIRO, P. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CORRÊA, K. B.; ALVES, T. A.; DA CRUZ, F. A.; LACERDA JÚNIOR, V.; FERREIRA, A.; SOARES, T. C. B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxy acetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial Crops and Products**. v. 114, p. 59-67, 2018.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAITE, L. S.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.74, p. 882–888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. 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.

ANDRÉA, M.M. “Contaminação do solo por pesticidas”. Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico. In: http://www.geocities.com/~esabio/agua/contaminacao_pesticidas.htm.

ARAGÃO, F. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**. v. 35, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of

Lepidaploa rufogrisea (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biologia Tropical**. v. 65, p. 1-10, 2017.

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, p. 1958-1972, 2012.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233-266, 2006.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollution (Dordrecht. Online)**. v. 226, p. 207-218, 2015.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 149-152, 1998.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272. 2003.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, 2015.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e

a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial, Brasília; 08 de janeiro de 2002.

CAMPINHO, E. A. A importância da produção de madeira de Eucalipto, geneticamente melhorado, para os setores moveleiros e de construção civil: perspectivas e desafios. **SEMINÁRIO MADEIRA DE EUCALIPTO: TENDÊNCIAS E USOS**. Curitiba, p. 53-58, 2001.

CARITÁ, R; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51-61, 2000.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 213-220, 2002.

COSTA, A. V.; DE OLIVEIRA, M. V. L., PINTO, R. T., MOREIRA, L. C., GOMES, E. M. C., ALVES, T. A., PINHEIRO, P. F., DE QUEIROZ, V. T., ANDRADE-VIEIRA, L. F., TEIXEIRA, R. R., JESUS JÚNIOR, W. C. 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.

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

DHALIWAL, H. J. S.; THIND, T. S.; MOHAN, C. Relative activity of essential oils from plants against *Penicillium digitatum* causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin. **Research in Plant Disease**, v. 19, p. 140-143, 2004.

- DIETZ, J.; DIEHL, A. S.; PROLLA, J. C.; FURTADO, C. D.; FURTADO, A. D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Revista da Associação Médica Brasileira**. p. 207-211, 2000.
- ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7-8, p. 491-494, 2006.
- FALAHATI, M.; OMIDI TABRIZIB, N.; JAHANIANI, F. Anti dermatophyte activities of *Eucalyptus camaldulensis* in comparison with Griseofulvin. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 80-0, 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 Environmental Safety**. v. 72, n.6, p.1680–1686, 2009.
- FIRBAS, P.; AMON, T. *Allium* Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 4, p. 189, 2013.
- FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. D. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, p. 11-125, 2004.
- FREITAS, A. S.; FONTES CUNHA, I. M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V. H. 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 Environmental Safety**. v. 124, p. 426–434, 2016.
- GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.
- IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Brasília: IBAMA, 2018. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 79-82, 2006.

INCA. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Acerca dos Agrotóxicos. 2015.

In:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>.

JAVARONI, R.C.A; TALAMON, J; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O., Estudo da degradação de lindano em solução aquosa através da radiação gama. **Química Nova**, v.14, p.237-239, 1991.

KRÜGER, R.A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. 2009. 43p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

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**. v. 99, n.18, p. 8788–8795, 2008.

LARA, W.H.; BATISTA, G.C., Pesticidas. **Química Nova**, v.15, p.161-166, 1992.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Editora, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LIU, X.; CHEN, Q.; WANG, Z.; XIE, L.; XU, Z. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. **Frontiers of Forestry in China**, v. 3, n. 2, p. 232-236, 2008.

- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- MARINHO, V. S.; ARAÚJO, A. C. B. S. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental/Use mouthwash in gingivitis and dental biofilm. *IJD. International Journal of Dentistry*, v. 6, p. 124-131, 2008.
- MARTINEZ, D. T.; HIGA, A. R.; LINGNAU, C.; SILVA, I. C. Escolha de espécies, planejamento e sistemas de produção para reflorestamento em pequenas propriedades no estado do Paraná. **Curitiba: FUPEF**, 2012.
- McHUGH, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemical Medicine**, 21(3), 203–209, 2011.
- MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da Guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.
- MENDES, L. A.; DE SOUZA, T. D. S.; MENINI, L.; GUILHEN, J. H. S.; DE OLIVEIRA, C. B.; FERREIRA, A.; DA SILVA FERREIRA, M. F. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 295-302, 2018.
- MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.
- MOREIRA, L. F.; CRUZ, J.C.S., **Uso correto e seguro de fitossanitários**. Viçosa, MG: EMATER; DETEC; Departamento Técnico. Não paginado, 1996.
- MOSS, B. Water pollution by agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 363, p. 659-666, 2008.
- OLIVEIRA, J. T. S. **Caracterização da madeira de eucalipto para a construção civil**. 1997. 2v. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997

OLUMA, H. O. A.; GARBA, I. U. Screening of *Eucalyptus globulus* and *Ocimum gratissimum* against *Pythium aphanidermatum*. **Nigerian Society for Plant Protection**, v. 21, p. 109-114, 2004.

PAPACHRISTOS, D. P.; STAMOPOULOS, D. C. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae). **Journal of stored products research**, v. 38, n. 2, p. 117-128, 2002.

PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A., HIGA, A. R., HIGA, R. C. V., & SHIMIZU, J. Y. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus L'Herit (Myrtaceae)***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2010.

PINHEIRO, P. F.; COSTA, A. V.; ALVES, T. A.; GALTER, I. N.; PINHEIRO, C. A.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. M. R.; PRAÇA-FONTES, M. M. 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, p. 8981-8990, 2015.

RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 261-262, 2002.

RASHER, D. B; HAY, M. E. Competition induces allelopathy but suppresses growth and anti-herbivore defence in a chemically rich seaweed. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, p. 1-9, 2014. In: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org>>.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 629-646, 2013.

RIGITANO, R. L. O.; BARBOSA, T. M. L. Influência da classe e profundidade do solo na degradação do inseticida-nematicida aldicarb. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.955-960, 1994.

SAMPAIO, A. N. História. In: ANDRADE, E. N. **O Eucalipto**. 2ª ed. São Paulo: Cia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. p. 58-64.

SANTANA, R. C.; BARROS, N. F. D.; NOVAIS, R. F.; LEITE, H. G.; COMERFORD, N. B. Alocação de nutrientes em plantios de eucalipto no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, 2008.

SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S. S.; SILVEIRA, G. L.; CORREA1, F. F.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, p. 1-11, 2018.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 231-233, 2007.

SBS, Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e números do Brasil Florestas**. Dez 2008. Disponível em:

<<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 19 out 2018.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva [online]**, v. 10, p. 891-903, 2005.

SILVA, L. O. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; ROCHA, P. R. R.; D'ANTONINO, L. Action of *Eleusine coracana* in the remediation of soils contaminated with picloram. **Planta Daninha**, v. 30, p. 627-632, 2012.

SILVA, R. C.; NERIS, M. A.; LOPES, M. A.; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Danos cromossômicos e alterações nucleares em células esfoliadas do epitélio gengival de indivíduos com periodontite crônica

moderada. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 16, n. 1, p. 19-24, 2017.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**. v. 178, p. 359–367, 2017.

SOARES, A. F. S. Uso de agrotóxicos, contaminação de mananciais e análise da legislação pertinente [manuscrito]: um estudo na região de Manhuaçu – MG. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 294 f. 2011.

SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica 2**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1989.

SOUZA, J.; Vidal, L. H. I.; Viani, R. A. G. Ação de extratos aquoso e etanólico de espécies vegetais na germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf. **Revista Semina**, v. 23, 2002.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

STURION, J. A.; BELLOTE, A. F. J. Implantação de povoamentos florestais com espécies de rápido crescimento. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**, 2000.

TEDESCO, S. B.; KUHN, A. W.; BOLIGON, A. A.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; ATHAYDE, M. L.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on the *Allium cepa* L. test system. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 1213-1221, 2015.

TINKEU, L. S. N.; GOUDOUM, S. N.; NGASSOUM, A.; MAPONGMETSEM, M.B.; KOUNINKI, P. M.; HANCE, T. Persistence of the insecticidal activity of five essential oils on the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.)

(Coleoptera: Curculionidae). **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 69, n. 3, p. 145-147, 2004.

TOKESHI, H. Doenças e pragas agrícolas geradas e multiplicadas pelos agrotóxicos. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, p. 264-271, 2000.

TUNC, I.; BERGER, B. M.; ERLER, F.; DAĞLI, F. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 2, p. 161-168, 2000.

WAICHMAN, A. V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M. O. A.; NINA, N. C. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, p. 423-428, 2002.

WAICHMAN, A. V.; EVE, E.; DA SILVA NINA, N. C. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. **Crop Protection**, v. 26, p. 576-583, 2007.

WERF, M.G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 60, p. 81-96, 1996.

XAVIER, A. **Variabilidade genética de óleo essencial e de crescimento em progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus citriodora* Hook.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 1993.

ZAMBOLIM, L.; JESUS, J. R. W.C. **O essencial dos fungicidas empregados no controle de doenças –parte básica.** pp. 77-148 In: ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. A.; FERREIRA, F. A.; JESUS JR., W. C. (Eds). **Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas).** Viçosa, MG: UFV/ DFP, 2008. 652p.