

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ARSANGELA DE JESUS BATISTA VASSELEK

ESTUDO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2020

ARSANGELA DE JESUS BATISTA VASSELEK

ESTUDO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan.

CAMPO MOURÃO

2020



TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS DA CLASSE
TRIAZENOS**

por

ARSANGELA DE JESUS BATISTA VASSELEK

Este trabalho foi apresentado em 06 de fevereiro de 2020 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química. A Candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Dra. Marcilene Ferrari Barriquello
Consolin (UTFPR)

Profa. Dra. Letícia Ledo, Marciniuk
(UTFPR)

Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan
(UTFPR)
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS que me oportunizou concluir um sonho, me ajudou dando-me graça e sabedoria durante toda a caminhada. Também não posso deixar de agradecer meus PAIS que sempre deram o melhor com muito esforço para me criar e me ensinar ser uma pessoa simples e determinada.

Dedico este trabalho a minhas filhas LU e SOFI lindas e amadas, como forma de exemplo de dedicação. Obrigada filhas por vocês terem paciência com a mamãe nos momentos de estresse e dificuldades, assim também, agradeço o marido LINDO que sempre me apoiou e me ajudou em tudo, um anjo em minha vida.

Agradeço muito meus professores que sempre me apoiaram e estiveram à disposição a todo momento do curso, e devo ressaltar que com muito carinho e amor. Em especial agradeço aos Profes ESTELA DOS REIS CRESPIAN e GUSTAVO PRICINOTTO que me aturaram e sempre me aconselharam em momentos difíceis. Vocês são um exemplo de profissionais e pessoas iluminadas.

RESUMO

O câncer é a segunda doença que mais mata no mundo inteiro, estimativas demonstram o aumento considerável da doença nos próximos anos, contudo existem várias pesquisas que envolvem novos fármacos e terapias em busca de inibir ou erradicar as células tumorais. Entre os compostos que vem sendo estudado destaca-se a classe triazenos, que possuem propriedade antibacteriana, antifúngica e antineoplásica, sendo que alguns já são comercializados, como a Dacabarzina® e Temozolomida ®. Portanto, o presente trabalho realizou a reprodução de síntese e análise de toxicidade em dois compostos triazenos 1,3-bis (2,4-dinitrofenil)triazeno e 1(4-nitrofenil) -3-(2,4 dinitrofenil)triazeno, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de um possível novo fármaco que seja seletivo às células tumorais. A análise de toxicidade ocorreu através do método *in vitro* com bioensaio envolvendo a espécie *Lactuca Sativa*, frente às concentrações de 25, 50 e 100% de ambos os compostos-alvo de análise. O ensaio foi desenvolvido por meio do protocolo 850.4200. Os dados de toxicidade foram obtidos a partir da determinação da toxicidade letal (DL50) e a toxicidade subletal (CI50) de ambos os compostos da classe triazenos, por meio do índice de germinação e comprimento radicular da plântula do bioensaio. Ambos compostos da classe triazenos não obtiveram toxicidade letal (DL50). Já para a análise subletal de forma qualitativa, os compostos apresentaram-se toxicidade para todas as concentrações, e quando comparados entre si o composto simétrico apresentou maior toxicidade em relação ao composto assimétrico.

Palavras-chave: Fármacos, triazenos, toxicidade.

ABSTRACT

Cancer is the second most deadly disease worldwide, estimates show the considerable increase in the disease in the coming years, however there is a lot of research that involves new drugs and therapies in order to inhibit or eradicate tumor cells. Among the compounds that have been studied, the triazene class stands out, which have antibacterial, antifungal and antineoplastic properties, some of which are already commercialized, such as Dacabazina® and Temozolomida ®. Therefore, the present work performed the reproduction of synthesis and toxicity analysis in two triazene compounds 1,3-bis (2,4-dinitrophenyl) triazene and 1 (4-nitrophenyl) -3- (2,4 dinitrophenyl) triazene, with in order to contribute to the development of a possible new drug that is selective to tumor cells. The toxicity analysis was carried out using the in vitro method with bioassay involving the species *Lactuca Sativa*, against the concentrations of 25, 50 and 100% of both target compounds of analysis. The test was developed using the 850.4200 protocol. Toxicity data were obtained from the determination of lethal toxicity (LD50) and sublethal toxicity (IC50) of both compounds of the triazene class, by means of the germination index and root length of the bioassay seedling. Both compounds of the class triazenes did not obtain lethal toxicity (LD50). For the qualitative sublethal analysis, the compounds showed toxicity for all concentrations, and when compared to each other the symmetrical compound showed greater toxicity in relation to the asymmetric compound.

Keyword: Farm, triazene, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das etapas de desenvolvimento de um novo fármaco até o comércio.....	14
Figura 2: Figura utilizada pelo INCA para enfatizar os fatores mais influenciar a ocorrência de câncer.....	16
Figura 3: Representação do esquema reacional da mostarda de azoto, acíclica e aromáticas com DNA.....	17
Figura 4: Figura representativa das fases do ciclo da divisão celular, mitose.....	8
Figura 5: Figura representativa das fases de mitose e a atuação dos diferentes antineoplásicos em cada ciclo em específico da mitose.....	19
Figura 6: Representação da estrutura química genérica dos compostos da classe triazenos.....	19
Figura 7: Representação estrutural das moléculas dos fármacos <i>Dacarbazina</i> e <i>Temozolomida</i> ambos da classe de triazenos já comercializadas.....	20
Figura 8: Representação estrutural dos novos compostos triazenos sintetizados e alvo de análise de toxicidade, 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno.....	26
Figura 9: Representação esquemática, em que, ocorre durante a reação de síntese no momento de diazotação em meio ácido com o nitrito de sódio.....	27
Figura 10: Representação esquemática da reação de síntese do íon diazônio com amina, formando compostos triazenos, quando $R = R$ - Triazeno Simétrico ou $R \neq R''$ - Triazeno Assimétrico.....	27
Figura 11: Representação esquemática da reação de desprotonação de um composto triazeno genérico.....	28
Figura 12: Imagem do teste de desprotonação da síntese do composto simétrico.....	29
Figura 13: Imagem do teste de desprotonação da síntese do composto assimétrico.....	29
Figura 14: Figura representativa do fluxograma do experimento de toxidade com bioensaio <i>Lactuca Sativa</i>	31
Figura 15: Imagem da germinação das sementes de <i>Lactuca Sativa</i> frente ao composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno simétrico a 25, 50 e 100%.....	32
Figura 16: Imagem da germinação das sementes de <i>Lactuca Sativa</i> frente ao composto	

1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno assimétrico a 25, 50 e 100%.....	32
Figura 17: Imagem do experimento da Germinação das sementes de <i>Lactuca Sativa</i> frente à H ₂ O destilada, controle negativo.....	32
Figura 18: Representação da plântula da <i>Lactuca Sativa</i> e suas peculiaridades.....	33
Figura 19: Imagem do experimento no momento de medição do comprimento radicular até o hipocótilo.....	33
Figura 20: Imagem da placa de Petri com as plântulas de <i>Lactuca Sativa</i> frente ao composto simétrico em observação visual direta de toxicidade.....	37
Figura 21: Imagem da placa de Petri com as plântulas de <i>Lactuca Sativa</i> frente ao composto assimétrico em observação visual direta de toxicidade.....	38
Figura 22: Gráfico 1- referente a toxicidade ao índice de germinação em comparação de ambos compostos em análise da classe triazenos.....	39
Figura 23: Gráfico 2- referente a toxicidade no índice de alongamento normalizado em comparação entre os compostos em análise.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de revisão bibliográfica, em que, mostra os parâmetros de análise de toxicidade na plântula de <i>Lactuca Sativa</i> , entre os anos de 1981 a 2010.....	22
Tabela 2: valores do Ponto de fusão das aminas e dos compostos da classe triazenos sintetizados, alvo de análise.....	28
Tabela 3: Principais bandas de absorção na região do infravermelho em cm^{-1} , para os compostos 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno (1) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno (2).....	30
Tabela 4: Condições de aceitabilidade para a análise de sementes germinadas para <i>Lactuca Sativa</i>	34
Tabela 5: Dados de porcentagem de germinação e comprimento radicular da Solução alcoólica e água destilada (controle negativo)	35
Tabela 6: Dados do experimento, referente ao composto simétrico 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno a diferentes concentrações.....	35
Tabela 7: parâmetros de análise do nível de toxidade segundo LELES, (2017), em que, verifica se o IGN% e IER%.....	36
Tabela 8: Parâmetros de análise para classificação qualitativa de fitotoxicidade segundo BELLO, (2011).....	36
Tabela 9: Dados do experimento, referente ao composto assimétrico 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno a diferentes concentrações.....	37
Tabela 11: Análise qualitativa de toxicidade aguda, seguindo a tabela 7 com parâmetro de toxicidade de LELES, (2017) referente aos compostos da classe triazenos.....	38

LISTA DE SIGLAS

- UICC:** International Union Against Cancer
- INCA:** Instituto Nacional de Câncer
- SUS:** Sistema Único de Saúde
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CONAMA:** Conselho Nacional de Meio Ambiente
- (DL50):** Dose letal 50%
- (CI50):** Concentração de inibitória média
- ONU:** Organização das nações unidas
- EPI:** Equipamento de proteção individual
- N° SGP:** Média aritmética do número de sementes germinadas no controle positivo
- N° SGN:** Média aritmética do número de sementes germinadas no controle negativo
- ICR%:** Porcentagem do índice do comprimento radicular
- ICR:** Índice do comprimento radicular
- CRA:** Comprimento da radícula na amostra.
- CRC:** Comprimento da radícula no controle negativo.
- IG:** Índice de germinação
- ICR:** Índice do comprimento radicular
- RSG%:** Porcentagem relativa de sementes germinadas
- IGN%:** Índice de porcentagem de germinação residual normalizado
- IER%:** Índice de porcentagem de alongamento residual normalizado
- Germ x:** Porcentagem média de sementes germinadas em cada amostra
- Germ controle:** Porcentagem de sementes germinadas no controle
- Along:** Comprimento médio da radícula das sementes germinadas em cada placa de análise
- Along controle:** Comprimento médio da radícula das sementes germinadas no controle
- S.A.:** Solução alcoólica 2%, álcool etílico absoluto 99,8% P.A.
- CMR:** Comprimento médio radicular
- FITO:** Fitotóxico
- MU. FITO:** Muito fitotóxico
- MO. FITO:** Moderadamente fitotóxico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO TEÓRICA	14
2.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS.....	16
2.2 COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS.....	19
2.3 ANÁLISE DA TOXICIDADE.....	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS.....	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS TRIAZENOS.....	28
4.2.1 Ponto de Fusão.....	28
4.2.2 Desprotonação dos Compostos da classe de Triazenos.....	28
4.2.3 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	29
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE TOXICIDADE.....	31
4.3.1 Teste de toxicidade Frente a <i>Lactuca Sativa</i>	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ANÁLISE DE TOXICIDADE.....	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

Com o estilo de vida dos brasileiros, o país vem passando por uma transição demográfica que indica que a população vive mais atualmente, no entanto, há um aumento considerável de muitas doenças crônicas, tais como o câncer. A estimativa do ministério da saúde é de que o câncer é a segunda causa de morte no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE) e segundo sua cartilha “o câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo: mais de 7 milhões de pessoas morrem anualmente da doença. Como a expectativa de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará mais de 15 milhões em 2020”, previsão foi feita em 2005 pela *International Union Against Cancer* (UICC).

O câncer é uma doença onde as células crescem e se multiplicam desordenadamente, prejudicando o funcionamento de tecidos e órgãos. O aumento considerável da doença ocorre por fatores ambientais e genéticos, assim como, pelo consumo de bebidas alcoólicas, inatividade física, tabagismo, obesidade, má alimentação, exposição a agrotóxicos, dentre outros fatores que podem influenciar o desencadeamento da mesma (SAÚDE, 2013).

Atualmente o tratamento do câncer envolve a utilização de inúmeros fármacos, antineoplásicos que têm o poder de destruir células malignas, inibir o crescimento ou a disseminação de tumores, entretanto tais tratamentos apresentam efeitos severos ao organismo, devido à falta de especificidade para as células tumorais. Portanto, entende-se que há a necessidade de estudos e pesquisas para o desenvolvimento de novos compostos com potencial propriedade antitumoral, que sejam mais eficientes e menos agressivos ao organismo do doente (ALMEIDA, 2011).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) indica que haverá um aumento de 50% da doença no país até 2020, portanto existe uma preocupação em motivar as pesquisas através de incentivos para proporcionar melhores condições de vida a população que sofre com a doença, desde o diagnóstico precoce até a intervenção no curso da mesma.

Considerando estes fatos, existem atualmente inúmeras pesquisas buscando combater os mais diferentes tipos de câncer, através do desenvolvimento de novos fármacos, como por exemplo, os compostos da classe triazenos que se apresentam como potenciais agentes antineoplásicos, apresentando também significativas propriedades antifúngicas e antibacterianas.

Dentre os compostos da classe triazenos já comercializados e que exercem ação nas paredes celulares de bactérias e células tumorais, pode-se destacar a Dacarbazina

comercializada como fármaco FAULDACAR® e Temozolomida comercializada como TEMODAL®, ambos os fármacos atuam como agentes antitumorais em pacientes com tumores cerebrais, mas também atuam como eficientes agentes antimicrobianos frente á bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos (KEMPER, 2013).

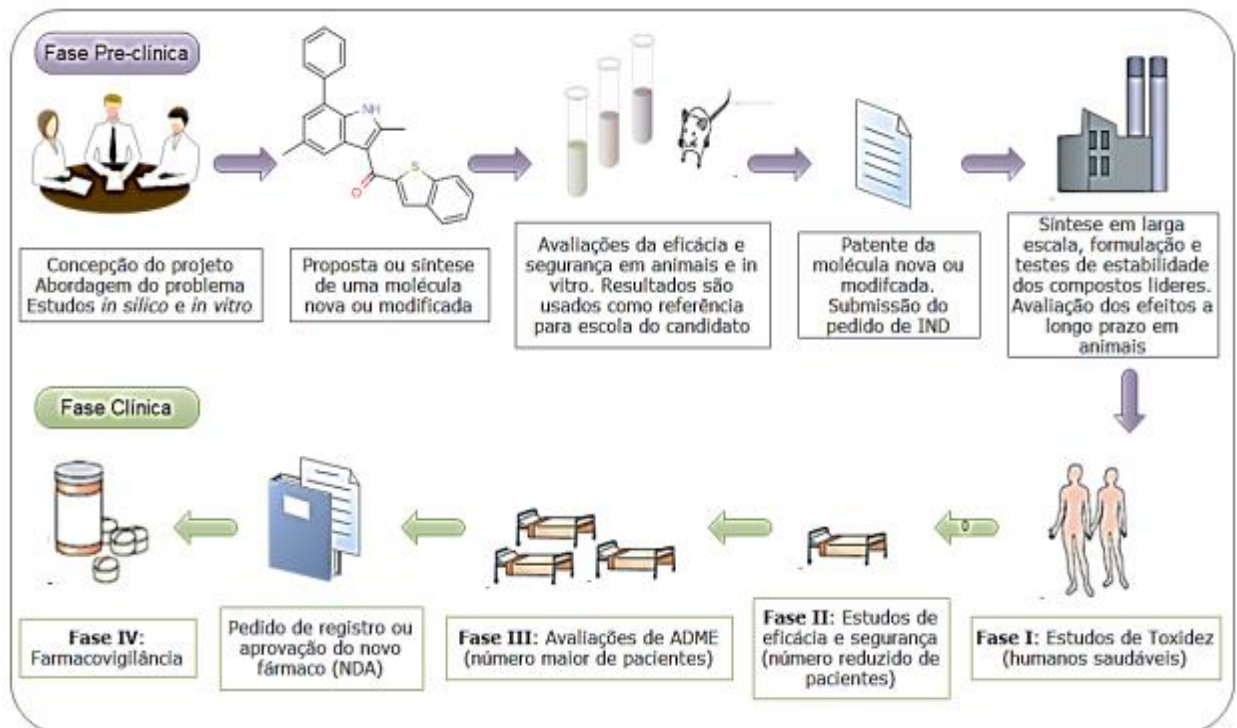
A busca pela obtenção de novos compostos com potenciais propriedades antineoplásicas, envolve o processo de desenvolvimento de um fármaco, algo complexo, no qual, através de conhecimento empírico sintetiza se uma molécula que obtém propriedades terapêuticas. Logo, o produto sintetizado, é caracterizado e só então, o fármaco passa a ser submetido a diferentes testes *in vitro* e posteriormente teste *in vivo*, em que, destaca-se o teste de análise de toxicidade (NASCIUTTI, 2012).

Estudar a toxicidade de compostos é um procedimento de análise pré-clínica da formulação de um novo fármaco, através da análise de toxidade que possibilita averiguar como um composto pode interagir frente ao um organismo. Segundo Lima et al., (2003):

Os princípios básicos para a realização de ensaios clínicos para novos medicamentos foram sugeridos por Ceiling e Cannon (1938), após acidente ocorrido nos Estados Unidos, onde 76 pessoas morreram após o uso de um tipo de sulfonamida. Após este acontecimento foi estabelecido o Código de Nuremberg, válido até hoje, cujo paradigma é: “toda pesquisa em seres humanos deve ter como principal preocupação o bem estar do sujeito da pesquisa”. Este código estabeleceu que antes de administrar ao ser humano qualquer novo fármaco, ele deveria apresentar: composição química, método de preparação e grau de pureza estabelecidos; testes de toxicidade aguda e crônica por doses repetidas (segurança) em diferentes espécies animais; completa análise patológica em diversos órgãos animais (especialmente rins e fígado); absorção, excreção e concentração nos tecidos conhecidas; e se ocorre interação com outros medicamentos e alimentos (LIMA et al., 2003, p.4-5).

A seguir, Figura 1 demonstra as etapas básicas em que um composto com propriedades farmacológicas passa até a formulação de um fármaco.

Figura 1—Etapas de descoberta e desenvolvimento de um fármaco



Fonte: LINARES, 2013.

Dentro deste contexto, o presente projeto busca analisar a toxicidade dos compostos 1,3-bis(2,4-dinitrofenil) triazeno e 1(4-nitrofenil) -3-(2,4 dinitrofenil)triazeno, frente ao método *in vitro* com bioensaio *Lactuca Sativa* de forma alternativa, no intuito de diminuir custos e resíduos químicos.

2 REVISÃO TEÓRICA

O câncer é uma doença que atinge as células do corpo, especificamente aquelas responsáveis por formar os tecidos e órgãos. As células têm a capacidade de se reproduzir segundo a demanda que o corpo necessita para repor tecidos, porém, quando isso não ocorre de forma regular, assim como, em uma mutação genética no núcleo das células, o DNA manda comandos errados para a atividade celular, promovendo a reprodução descontrolada de células ocasionando a formação de tumores (MINISTERIO DA SAÚDE, 2013).

Definição de forma mais detalhada de como ocorre o câncer segundo Capucha, (2010):

Quando ocorrem falhas nos mecanismos responsáveis pelo controle do crescimento e da proliferação celular podem gerar-se situações de cancro. O cancro pode definir-se como uma neoplasia maligna, em que se verifica um crescimento anormal, rápido e descontrolado das células. Este fenómeno de malignidade tem por base situações

como: a auto-suficiência dos fatores de crescimento; a ausência de sensibilidade a fatores inibitórios do crescimento; a angiogênese sustentada; ou uma falha no processo de apoptose. O processo de formação do cancro (oncogênese ou tumorigênese) resulta de uma interação entre mecanismos genéticos e o meio ambiente. Normalmente, provém de mutações que ocorreram durante um tempo de exposição a agentes cancerígenos, como são exemplo certos produtos químicos ou raios Ultra-Violeta (UV). No entanto, também pode resultar de mutações geneticamente herdadas. De uma forma mais destrutiva, o cancro pode resultar da combinação entre mutações somáticas e mutações hereditárias. Mesmo que os danos no DNA ocorram numa única célula somática, a sua divisão transmitirá esses danos às células-filhas, originando um clone de células modificadas que pode crescer sob a forma de tumor (CAPUCHA, 2010, p.2).

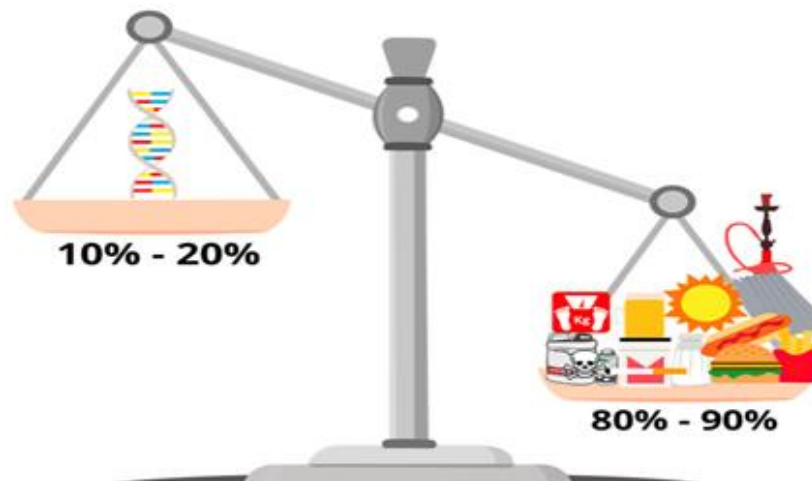
Os tumores podem ser benignos ou malignos, os tumores benignos são formados em áreas do corpo que não influenciam em nada o seu funcionamento, um exemplo de um tumor benigno é a verruga, que é apenas algo estético removido por meio de cirurgia. Já os tumores malignos são aqueles que podem se espalhar pelo corpo envolvendo-se ao redor dos órgãos e tecidos, as células cancerígenas também podem se infiltrar na corrente sanguínea ou entrar no sistema linfático, que é responsável por proteger o corpo de doenças infecciosas (SPEECHLEY & ROSENFELD, 2000).

Segundo o INCA existem cerca de mais de 200 tipos de câncer, cada um com sua peculiaridade, os tipos de câncer são classificados de acordo com a localização primária do tumor. Dentre os tipos mais incidentes na população brasileira são: câncer de mama, próstata, leucemia, câncer de pele, dentre outros. Segundo a estatística do câncer em homens, em 2018 houve a incidência de 68% de novos casos de câncer de próstata; já a incidência em mulheres da doença na mama foi de 59% também em 2018 (INCA, 2018).

Segundo o INCA e o Ministério da Saúde (2018), houve 600 mil novos casos da doença entre os anos de 2018 a 2019, e ainda segundo (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2017) nos Estados Unidos em 2017 estavam sendo esperados cerca de 1.688 milhões de novos casos da doença, em que, conseqüentemente mataria cerca de 577 mil pessoas.

O número elevado de casos de câncer, pode ser explicado devido ao modo de vida da população que pode influenciar na ocorrência da doença. Dentre as possíveis causas do câncer observa-se principalmente a genética, porém os principais fatores que mais influenciam para o desencadeamento da doença são: má alimentação, uso de drogas, bebidas alcoólicas, sedentarismo e exposição Química. No Brasil os diferentes tipos de câncer estão relacionados com a situação socioeconômica do país, com o tipo de classe social do cidadão, pois onde e como o indivíduo está inserido influência para provocar específicos tipos de câncer (INCA, 2006).

Figura 2—Principais fatores que podem provocar o câncer.



Fonte: INCA, 2006.

O Ministério da Saúde juntamente com o SUS (Sistema Único de Saúde) realizou um levantamento epidemiológico dos diferentes tipos de câncer relacionando com as classes sociais. Observou-se que em maior nível socioeconômico, há maior incidência de câncer de mama, próstata, colo e reto; já a menor nível socioeconômico, há incidência elevada de tumores no colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral (INCA, 2006).

Estes fatos decorrem porque o Brasil está em constantes mudanças sociais, demográficas e epidemiológicas. Em décadas passadas o Brasil tinha maior ocorrência de doenças que surgiam por falta de saneamento básico. Com os avanços industriais e desenvolvimento tecnológico, o país passou a ser predominantemente urbano, dando espaço para as pessoas consumirem produtos industrializados e fármacos, promovendo menor incidência de doenças transmissíveis e maior aumento de casos com doenças crônicas como: diabetes, hipertensão e neoplasia (SANTOS, 2017).

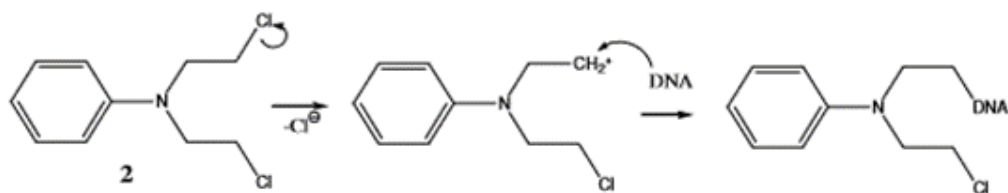
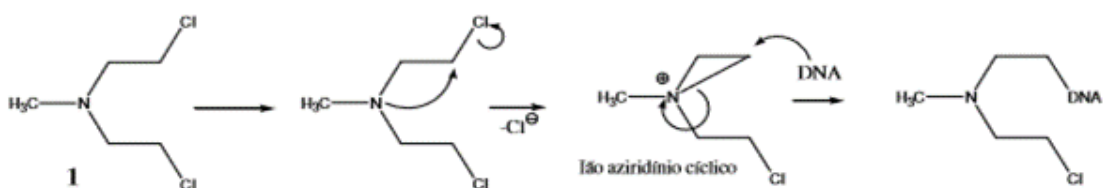
2.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

O tratamento do câncer nos dias de hoje envolve cirurgias, radioterapias e as quimioterapias, todos altamente agressivos ao organismo, pois não só atingem as células cancerígenas, mas também as células normais. Além desses tratamentos resultarem em efeitos tóxicos também não são eficientes a todos os tipos de cânceres existentes, pois existem alguns que não apresentam melhoras por esses tratamentos, como por exemplo o carcinoma de

pulmão um tipo de câncer que obtém modesta melhora diante de quimioterapias (COSTA-LOTUFO et. al. 2010).

A quimioterapia antineoplásica surgiu em 1940, quando descobriram que as mostardas de azoto tem efeito de regressão aos tumores. Pois apresentam agentes metilantes do DNA, desde então as mostardas são focos de pesquisas para a formulação de novos compostos terapêuticos. A toxicidade das mostardas de azoto está relacionada com seu poder de reatividade com grupos que são ricos em elétrons, assim como, o caso do fosfato dos ácidos nucleicos. Entretanto com os estudos medicinais descobriram que a estrutura molecular das mostardas de azoto acíclica é mais toxica para o organismo em relação a uma cadeia aromática de azoto que demonstrou ser menos tóxica, porque o anel atua como um atrator de elétrons, estabilizando os elétrons de azoto. Na Figura 3 demonstra a diferença da reação do DNA com ambas as cadeias mencionadas (CAPUCHA, 2010).

Figura 3—Esquemas reacional da mostarda de azoto, acíclica e aromáticas com DNA



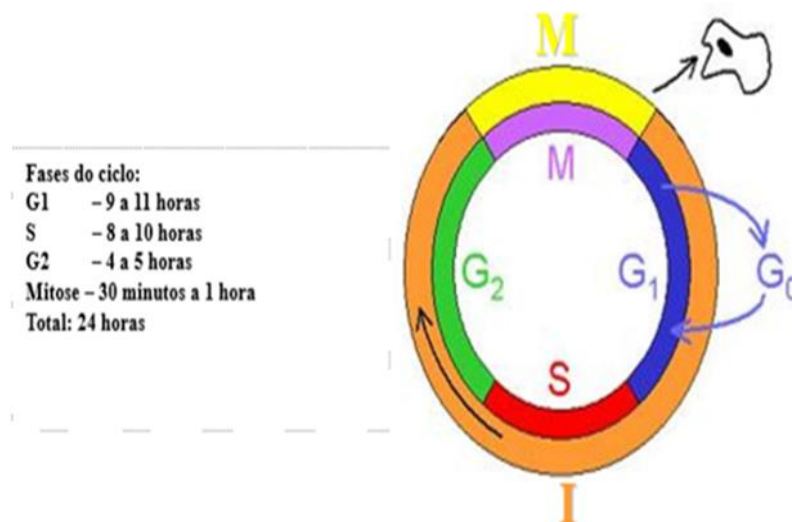
Fonte: CAPUCHA, 2010.

Segundo Capucha, (2010), as cadeias aromáticas têm vantagem na administração oral, podem alcançar os sítios alvos do DNA sem trazer degradação por reações com o nucleófilo. O anel aromático age atraindo os elétrons de nitrogênio e retirando elétrons do átomo. No entanto, os quimioterápicos têm seus os prós e contras, pois existe a dificuldade de diferenciar as células normais das tumorais, atacando então todas elas, ocasionando efeitos graves para o organismo.

Nos últimos anos, a quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas e alguns tipos de tumores sólidos, em especial os derivados de células germinais. Ao contrário, a melhora no tratamento sistêmico de tumores sólidos mais frequentes em adultos (pulmão, mama, cólon e pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em altos índices de mortalidade dentre os pacientes. Há, portanto, uma clara e urgente necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento desses cânceres (COSTA- LOTUFO et. al., 2010, p.50).

Os antineoplásicos agem no ciclo de divisão celular, mitose, A mitose, que é um processo que realiza a multiplicação das células através da divisão celular por meio de fases para produzir novas duas células “filhas” geneticamente idênticas. A seguir a Figura 4 ilustra o ciclo de mitose.

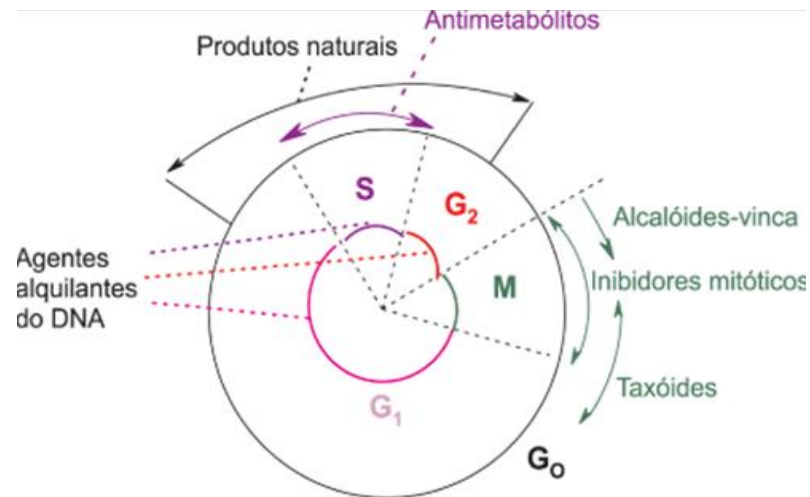
Figura 4—Ciclo da divisão celular, mitose



Fonte: BONASSA, 2005.

Os fármacos quimioterápicos podem atuar em uma fase específica do ciclo de mitose, geralmente na Profase, em que, ocorre a duplicação do DNA, tais fármacos que atuam nesta fase são chamados de antimetabólitos, como mostra a Figura 5. Também existem medicamentos que atuam na fase final da mitose, na qual há preparação para a separação da célula, como é o caso dos antineoplásicos alcalóides. Ainda existem fármacos quimioterápicos que atuam no ciclo de forma inespecífica e independem das fases de mitose (SANTOS, 2017).

Figura 5—Representação das fases de mitose e a atuação dos antineoplásicos

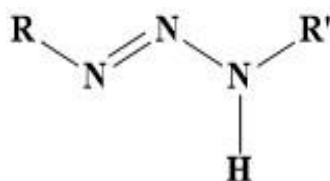


Fonte: BONASSA, 2005.

2.2 COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS

Os compostos da classe de triazenos vêm sendo estudados por apresentarem potenciais antineoplásico e significativas propriedades antifúngicas e antibacterianas. Esses compostos apresentam em sua estrutura molecular uma cadeia composta por três átomos de nitrogênio interligados, sendo que os terminais podem apresentar diferentes substituintes, assim como, a seguir na Figura 6 ilustra a forma genérica da característica dos compostos da classe triazenos (PARAGINSK, 2014).

Figura 6—Representação da estrutura genérica dos compostos da classe triazenos.

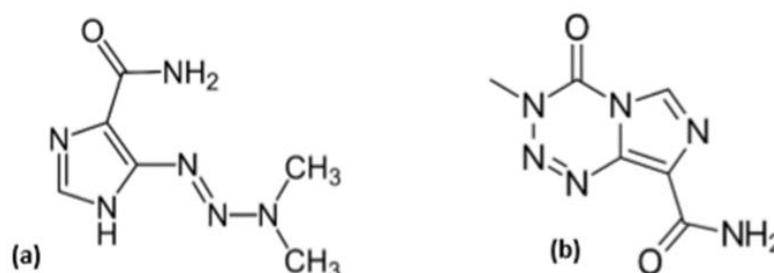


Fonte: SOUZA, 2018.

Onde R e R' podem ser grupos metílicos e fenilas (aromáticos), sendo os aromáticos os mais utilizados, pois diminuem a densidade eletrônica dos átomos de nitrogênio, uma vez que permitem a deslocação eletrônica, trazendo maior estabilidade à cadeia.

Conforme citado anteriormente, entre os fármacos já comercializados, segundo Katzung e Trevor, (2017) a Temozolomida e Dacarbazina são fármacos utilizados no tratamento de leucemia mieloide crônica e diversos tipos de câncer sólidos ou hematológicos e agem por meio de uma reação de desmetilação, na qual, libera o componente alquilante. Entretanto ambos possuem o mesmo problema que os demais quimioterápicos, a ação desses medicamentos não distingue as células normais das tumorais. Outro fato a se ressaltar é que os medicamentos alquilantes apresentam limitações por serem tóxicos, desta forma, a quantidade a ser administrada deve ser abaixo da dosagem máxima tóxica, o que muitas vezes não é eficaz contra a doença por não atingir a quantidade necessária e suficiente para atuar em todas as células cancerígenas. A Figura 7 apresenta a estrutura molecular da Dacarbazina e da Temozolomida.

Figura 7— Representação estrutural das moléculas, Dacarbazina (a) e Temozolomida (b).



Fonte: SOUZA, 2018.

Aproveitando o potencial da classe de triazenos, existe a necessidade de se obter novos compostos, já que tais podem apresentar propriedades significativas com maior seletividade e efetividade frente às células tumorais, de forma que sejam menos tóxicos ao organismo.

2.3 ANÁLISE DE TOXICIDADE

Segundo CASTRO, (2013) a toxicidade é uma propriedade inerente de substâncias químicas, em que, pode exercer algum dano a organismos. A toxicidade pode ser expressa em função da concentração e tempo de exposição de determinada substância frente a um organismo.

Os testes de toxicidade estão sendo utilizados para diversos fins, assim como: determinar a toxicidade de compostos químicos, efluentes líquidos, descartes de contaminantes e monitoramento ambiental. (FERREIRA, 2015).

Dentre os organismos teste as plantas vêm sendo largamente utilizadas em análise de toxicidade, averiguando-se principalmente o índice de germinação e comprimento radicular, sendo os limites máximos de toxicidade aceitáveis de acordo com os parâmetros dos órgãos competentes. Segundo a ANVISA os futuros fármacos passam por análises pré-clínicas que possibilitam observar principalmente a toxicidade letal de uma substância, em que, determina dose-resposta, por meio, do parâmetro (DL50) dose letal média, que é observada quando ocorre no experimento 50% de inibição ou morte de organismo teste.

Para a análise de toxicidade existe dois tipos: a toxicidade aguda que ocorre no período de um a cinco dias, e a toxicidade crônica que pode ocorrer em uma exposição maior de dias e até mesmo anos. A avaliação da toxicidade em plantas, segundo o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) é avaliada por termologias como (CI50), que determina a imobilidade a 50% dos organismos teste com o aumento do tempo de exposição (FERREIRA, 2015).

Contudo para a análise de toxicidade pode se realizar análise *in vitro* em organismos testes, que também apresentam características físicas semelhantes ao organismo humano, assim como, as células, para analisar novos compostos químicos que possuem propriedades farmacológicas, possibilitando inovar os fármacos já existentes.

Os testes *in vitro* vêm revolucionando as análises laboratoriais, já que teste *in vivo* está sendo cada vez menos utilizado, pois os profissionais estão se conscientizando em proteger os animais contra os maus tratos e sacrifícios, em análises laboratoriais. Petroianu (1996), descreve a respeito da mobilização em favor dos animais contra os testes *in vivo*.

A primeira manifestação social a cerca de uma nova visão sobre as pesquisas que utilizam e provocam dor em animais vertebrados denominou-se Cruelty to Animals Act e foi redigida em 1876 (PETROIANU, 1996). Anos após essa manifestação, alguns autores afirmaram que as boas pesquisas devem respeitar o programa 3R's. Este programa é assim denominado devido às três palavras em inglês que regem o programa - Reduction, Refine, Replace – que em português significa - Reduzir, Refinar e Substituir. Este programa tem como principal objetivo reduzir o número de animais empregados em pesquisas, buscar o refinamento de técnicas que permitam diminuir o sofrimento dos animais e substituir animais por outras formas de vidas, como os estudos *in vitro* (PETROIANO, 1996, p.4)

Rogero et. al., (2003) e Bednarczuk et. al. (2010), defendem que os testes *in vitro* permite uma ampla variedade de testes frente a bactérias, fungos, enzimas, proteínas e culturas celulares, podendo ser utilizado um estudo precedente ao teste *in vivo*. Não o bastante

os testes *in vitro* podem ser analisados também frente as plantas chamadas de bioensaios proporcionando análises eficientes e de baixo custo. Os testes de fitotoxicidade são simples e possuem rápido período de análise, além de serem efetivos para verificar a toxicidade de substâncias inorgânicas e orgânicas. A variável analisada no bioensaio é o crescimento radicular, na qual, pode determinar a inibição do alongamento radicular, morte celular e dentre outros. (GRYCZA et. al., 2018).

Segundo Lima et. al., (2017) e ANVISA os bioensaios vegetais já são aceitos internacionalmente por agências de pesquisas como um instrumento de avaliação com sensibilidade para análise de fitotoxicidade e genotoxicidade de substâncias ou compostos que são de interesse à população como medicamentos, cosméticos dentre outros.

Dentre os organismos teste pertinentes para análise de toxicidade encontra-se a *Lactuca Sativa* (alface) que apresenta em sua germinação as células meristemáticas, que realizam o mesmo processo de multiplicação das células humanas, a mitose. Através da análise *in vitro* com o bioensaio *Lactuca Sativa* pode-se determinar a toxicidade e observar em que etapa da mitose o composto alvo de análise atua.

A *Lactuca Sativa* é utilizada em teste *in vitro*, por ter fácil cultivação em um tempo pequeno, baixo custo e sensibilidade em estudo, além de ser algo atóxico, que pode evitar possíveis acidentes laboratoriais. A metodologia para avaliar o grau de toxicidade em *Lactuca Sativa* ocorre por meio do índice da germinação de suas sementes e da medição radicular de suas raízes meristemáticas (GRYCZAK et al., 2018). A Tabela 1 apresenta diferentes parâmetros utilizados para quantificar a sua fitotoxicidade, por diferentes autores.

Tabela 1—Tabela que relaciona os autores com os diferentes parâmetros de toxicidade em teste com plântula de *Lactuca Sativa*.

Referência	GI (%)	Classificação
Trautmann e Krasny, 2009	80-100	Não inibe o crescimento da planta
	60-80	Inibição moderada
	40-60	Inibição forte
	<40	Inibição severa
Batista e Batista, 2007 (cit.Woods End, 2000)	>85	V-não tóxico
	70-80	IV-moderadamente tóxico
	50-70	III-Tóxico
	30-50	II-Muito tóxico
Batista e Batista, 2007	>90	Bastante maturado
	80-90	Maturado
	<80	Imaturo
Bernal et al, 2009	>50	Maturado
Wong et al, 2001	>50	Composto livre de fitotoxinas
Ortega et al, 1996	<60	Produto Orgânico considerado fitotóxico

Cabãnas-Vargas et al, 2005 (cit Zucconi e de Bertoldi, 1987)	>60	Maturado
Gómez-Brandón et al, 2008 (cit Zucconi e de Bertoldi, 1987)	>60	Limite que reduz a fitotoxicidade para níveis aceitáveis para aplicação segura no solo
Helfrich et al, 1998	≥70	Baixo nível de fitotoxinas
Fang e Hong, 1999 (cit Rifaldi, 1986)	>80	Não fitotóxico
He et al, 2009 (cit Zucconi, 1981)	>80	Composto livre de fitotoxinas
Tuiquia et al, 2011 (cit Zucconi, 1981); (Tiquia e Tam, 1998)	>80	Composto livre de fitotoxinas
Geo et al, 2010 (cit Zucconi, 1981); (Tiquia e Tam, 1998)	>80	Composto livre de fitotoxinas. Maturado
Delgado, 2010	>100	Estimula as propriedades do solo

Fonte: BELO, 2011.

A toxicidade dos compostos está relacionada com a estrutura molecular. Quando administrado um fármaco, a forma de transporte pelo organismo pode ocorrer de duas formas: passiva ou ativo. O transporte passivo é aquele que depende apenas das propriedades físico-químicas do medicamento, já o transporte ativo ocorre por meio de agentes biológicos, como por exemplo, as enzimas que são receptoras de substratos e possuem seletividade a estrutura molecular. Desta forma no caso do transporte ativo, quando não ocorre a metabolização do composto no organismo, por falta de preferência estrutural de enzimas, o fármaco não é metabolizado, sendo então, absorvido nas vias sanguíneas trazendo diferentes efeitos colaterais, a toxicidade (LIMA, p. 659, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a toxicidade dos compostos 1,3-bis (2,4-dinitrofenil)triazeno e 1(4-nitrofenil)-3-(2,4 dinitrofenil)triazeno, frente a *Lactuca Sativa* em métodos *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntetizar os compostos da classe triazenos 1,3-bis (2,4-dinitrofenil)triazeno e 1(4-nitrofenil)-3-(2,4 dinitrofenil)triazeno conforme descrito por Souza (2018);
- Caracterizar os compostos da classe triazenos por meio de ponto de fusão e espectroscopia de absorção no infravermelho;
- Analisar a toxicidade de ambos compostos frente a *Lactuca Sativa*.

4 METODOLOGIA

Diante dos reagentes que foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, o Quadro 1 no Anexo 1, mostra os riscos que cada um deles podem apresentar ao organismo humano, assim como também, os equipamentos de proteção individual (EPI) e tratamento para possíveis acidentes. Vale ressaltar que todos os reagentes foram manuseados nas capelas de exaustão. Todas as informações que foram apresentadas no Quadro 1 seguem o M.S.D.S (Ficha de Informação de Produto Químico) segundo a ONU.

4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS

A realização das sínteses de ambos compostos da classe triazenos utilizou-se reagentes da marca Sigma- Aldrich e solventes da Dinâmica e Alphatec, listados a seguir.

- Ácido acético;
- Acetato de sódio;
- Ácido clorídrico;
- Nitrito de sódio;
- 2,4- Dinitroanilina;
- 4- Nitroanilina.

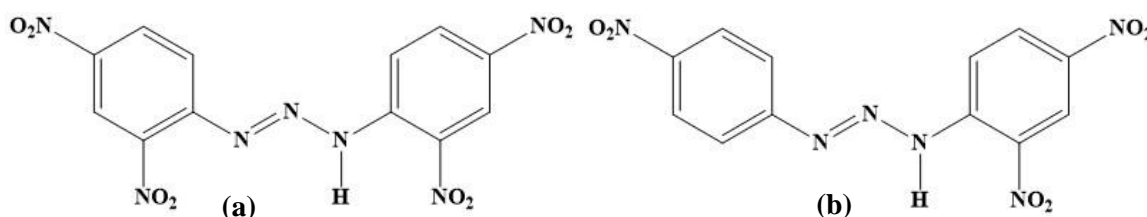
Os resíduos das sínteses, sólidos e líquidos, foram descartados de maneira adequada no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Campo Mourão, para então posteriormente serem recolhidos por uma empresa responsável.

Para sintetizar os compostos utilizou-se a metodologia descrita por Souza (2018), na qual a síntese do composto simétrico (Figura 8a) 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno, foi realizada a partir da adição de 10 mmol de 2,4-dinitroanilina em uma solução de ácido acético 1:1 (40 mL), mantendo a solução em constante agitação e resfriamento até chegar em, no mínimo, 0°C. Em seguida adicionou-se lentamente uma solução de 5 mmol de nitrito de sódio em 5mL de água deionizada, deixando em agitação e resfriamento durante uma hora. Posteriormente neutralizou-se o meio com uma solução de acetato de sódio 25 %, através da adição de 50 mL a cada 10 min (pH 6 -7). Por fim para obter o produto realizou-se uma filtração à vácuo com lavagem com água destilada gelada.

Já a síntese do composto assimétrico 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno, (Figura 8b), envolveu a dissolução de 10,4 mmol de 4- nitroanilina em 40 mL ácido clorídrico 1:1, mantendo a solução próxima a 0°C e em agitação constante. Na sequência adicionou-se lentamente, e sob forte agitação, 10,4 mmol de nitrito de sódio, mantendo a agitação e o

resfriamento por uma hora. Posteriormente depois de uma hora adicionou-se 10,4 mmol 2,4-dinitroanilina dissolvido em ácido acético 1:1 (40 mL), no qual deixou-se por mais uma hora em constante agitação e resfriamento a 0°C, em seguida neutralizou-se a mistura com solução de acetato de sódio 25%, assim como, a primeira síntese, filtrou-se a vácuo lavando com água destilada gelada para obter o produto da síntese. Ambos os produtos obtidos pela síntese dos compostos foram colocados a presença de dessecador.

Figura 8 — Representação estrutural dos compostos triazenos sintetizados, (a) 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno e (b) 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno.

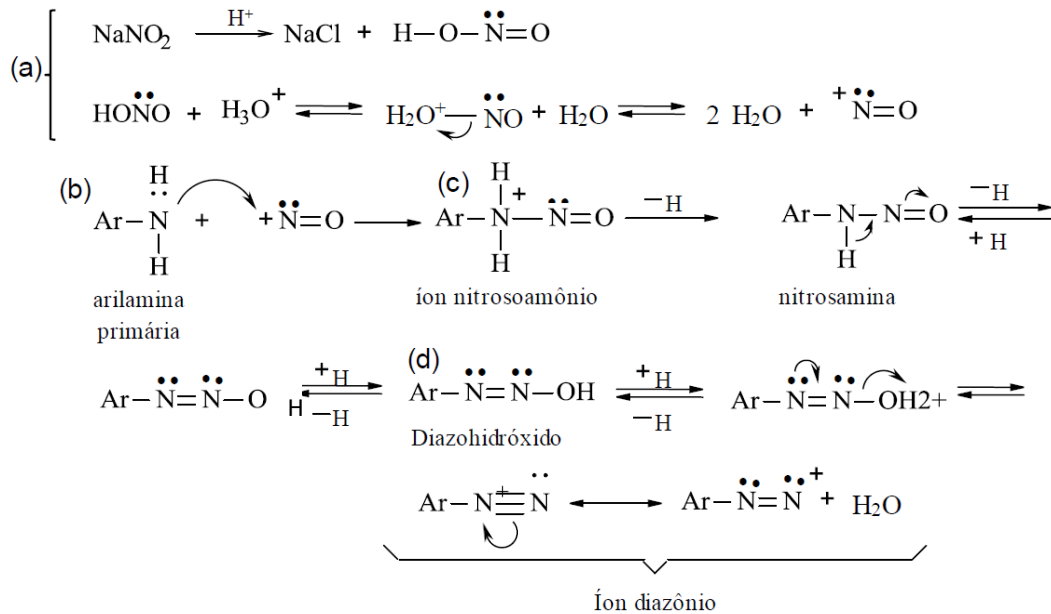


Fonte: Autoria própria, 2020.

Obteve-se os compostos sintetizados para análise de toxicidade se através do método de Hartman et. al., (1943). Em princípio em processo de síntese a baixa temperatura (0° a -5°) em forte agitação partindo de uma amina primária ou secundária em meio ácido e com nitrito de sódio ocorre à formação do íon diazônio. Neste processo se deve ter cuidado com a temperatura e o pH da solução para evitar possível hidrólise do íon diazônio, que é extremamente instável e evitar a total protonação da amina.

O processo de formação do íon diazônio ocorre sob a reação de nitrito de sódio com um ácido forte, formando-se o ácido nitroso que se dissocia se produzindo o íon NO^+ . Esse reage com o nitrogênio da amina em solução formando *N-nitrosoamônio* que é um intermediário instável. Logo *N-nitrosoamônio* perde um próton e forma *N-nitrosamina* que se tautomeriza em um diazohidróxido, e por fim o diazohidróxido em meio ácido elimina uma molécula de água formando o diazônio, de acordo com o mecanismo representado na Figura 9 (Souza, 2018).

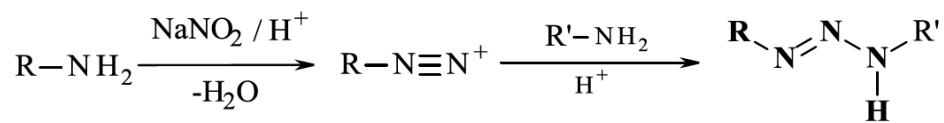
Figura 9 — Representação do mecanismo de diazotação em meio ácido com o nitrito de sódio.



Fonte: GIGLIO, 2011.

Após a formação do íon diazônio ocorre o acoplamento de aminas, quando a amina é a mesma de princípio tal se acopla consigo mesmo, formando um composto simétrico, porém quando em meio é adicionado outra amina diferente da de princípio, forma-se um composto assimétrico. Logo, por fim, a amina reage com o íon diazônio formando um composto da classe triazeno, como mostra a Figura 10.

Figura 10 — Representação esquemática da reação de síntese dos compostos triazenos



Onde: R = R' - Triazeno Simétrico
R ≠ R' - Triazeno Assimétrico

Fonte: GIGLIO, 2011.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTOS TRIAZENOS

4.2.1 Ponto de Fusão

Após as sínteses realizou-se o teste do ponto de fusão dos produtos obtidos e comparou-se com os pontos de fusão das aminas de partida, observou-se valores bem diferentes o que evidencia que ocorreu reação de síntese. Os valores dos pontos de fusão estão dispostos a seguir na Tabela 2.

Tabela 2 — Ponto de fusão dos produtos obtidos pela sínteses e as aminas de partida

Aminas / produtos obtidos	Ponto de Fusão (°C)
4-nitroanilina	147 °C
2,4-dinitroanilina	176 °C
Produto simétrico	186 °C
Produto assimétrico	164 °C

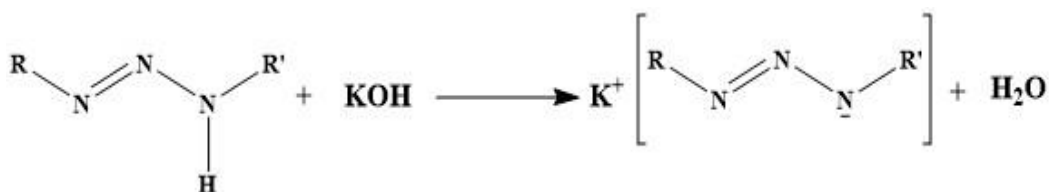
Fonte: Autória própria, 2020.

A análise do ponto de fusão dos compostos foi realizada utilizando um aparelho do modelo PF1500 FARMA da marca GEHAKA, localizado no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Campo Mourão.

4.2.2 Desprotonação dos Compostos da classe Triazenos

Logo para obter-se maior confiabilidade da formação dos compostos da classe triazenos, realizou-se o teste de desprotonação dos produtos obtidos em síntese. O processo ocorre, por meio, de dissolver os possíveis compostos com um reagente e posteriormente colocar em meio fortemente básico. Se ocorrer a mudança de coloração do meio é um indicio de que ocorreu a formação do composto desejado. Na Figura 11, mostra o mecanismo de reação que representa o teste de desprotonação.

Figura 11 — Representação esquemática da reação de desprotonação de um composto da classe triazeno.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Para o teste utilizou-se 1mL de etanol para solubilizar os compostos sintetizados, 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno (1) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno (2) e para a

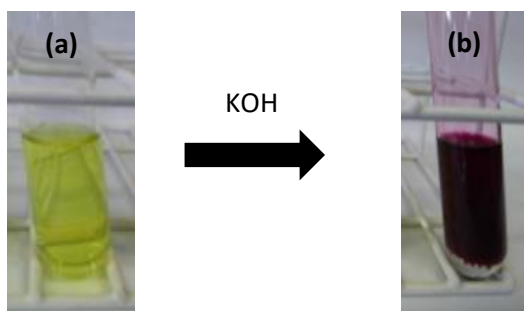
desprotonação utilizou-se 4 gotas de uma solução de hidróxido de potássio 0,1M onde foi possível observar uma mudança significativa da coloração da solução após a adição do hidróxido de potássio.

Figura 12— Imagens do teste de desprotonação para o composto simétrico, em que, Figura (a) referente apenas ao composto de sintetizado e Figura (b) composto sintetizado mais a base



Fonte: SOUZA, 2018.

Figura 13— Imagens do teste de desprotonação para o composto assimétrico, em que, Figura (a) referente apenas ao composto de sintetizado e Figura (b) composto sintetizado mais a base



Fonte: SOUZA, 2018.

4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos a partir de pastilhas das amostras com KBr. As análises foram realizadas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, utilizando para as análises o Espectrofotômetro Bruker Tensor – 27, com uma janela espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} .

As bandas de absorção na região do infravermelho características para os compostos da classe triazenos são as que envolvem a cadeia diazoamínica como os estiramentos N-H, N=N e N-N e podem ser observadas na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Dentre os compostos que possuem duplas ligações entre átomos de nitrogênio os triazenos são os que exibem os valores mais baixos para as frequências de estiramento, em função da alta deslocalização eletrônica da cadeia diazoamínica, levando sempre em consideração que as informações apresentadas

pelos substituintes dos anéis ligados à cadeia diazoamínica também são importantes para a caracterização dos compostos.

Considerando os 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno (b) as principais bandas de absorção são consequência de estiramentos simétricos e antissimétricos, além das deformações apresentadas pelos grupos N=N, N-N, N-H, NO₂, C=C e C-H (SOUZA, 2018); (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL,1991) (NAKAMOTO, 1986) (BARBOSA, 2007). A Tabela 3 apresenta as principais bandas para os dois compostos, onde é possível observar que as bandas se assemelham com a análise realizada por Souza (2018), que realizou a síntese de ambos compostos alvo de análise deste trabalho.

As bandas de absorção na região do infravermelho características para os compostos da classe triazenos são as que envolvem a cadeia diazoamínica como os estiramentos N-H, N=N e N-N e podem ser observadas na região de 4000 a 400 cm⁻¹, considerando que para os compostos que possuem duplas ligações entre átomos de nitrogênio os triazenos são os compostos que exibem os valores mais baixos para as frequências de estiramento, em função à alta deslocalização eletrônica da cadeia diazoamínica, levando sempre em consideração que as informações apresentadas pelos substituintes dos anéis ligados a cadeia diazoamínica também são importantes para a caracterização dos compostos.

Considerando os 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno (b) as principais bandas de absorção são consequência de estiramentos simétricos e antissimétricos, além das deformações apresentadas pelos grupos N=N, N-N, N-H, NO₂, C=C e C-H (SOUZA, 2018); (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL,1991) (NAKAMOTO, 1986) (BARBOSA, 2007).

Tabela 3 —Principais bandas de absorção na região do infravermelho em cm⁻¹, para os compostos 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno (b).

Composto	$\nu_{as}N=N$	$\nu N-N$	$\nu N-H$	$\delta N-H$	$\nu_s NO_2$	$\nu_s C-N$	$\nu C=C$
(a)	1407	1190	3405	1486	1524	1260	1597
(b)	1400	1195	3362	1515	1520	1278	1585

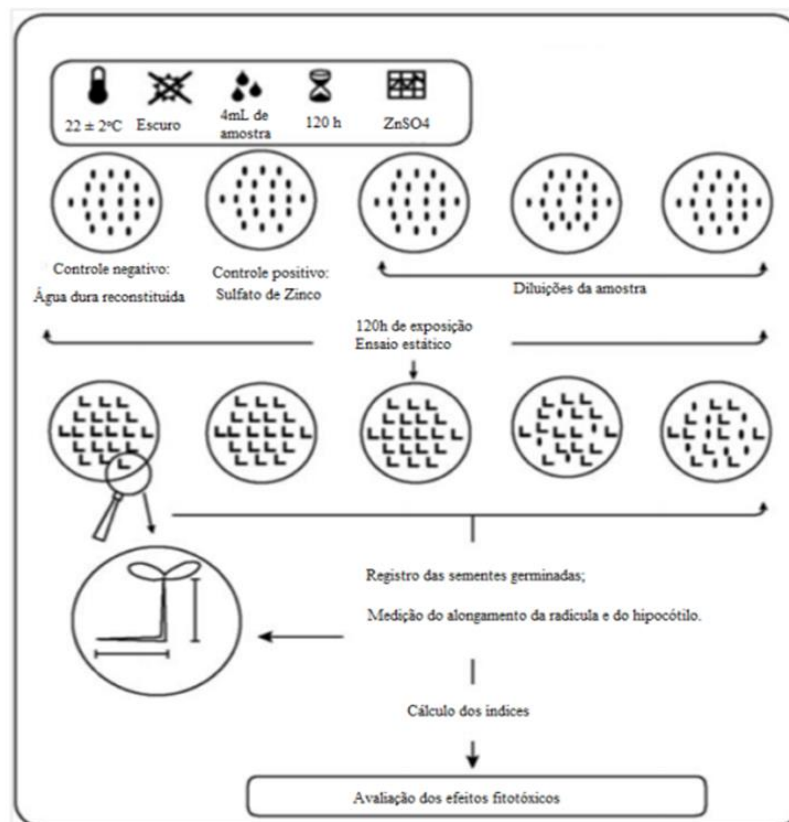
Fonte: Autoria própria, 2020.

4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE TOXICIDADE

4.3.1 Teste de toxicidade frente a *Lactuca Sativa*

O ensaio com a *Lactuca Sativa* baseou-se no protocolo 850.4200 (USEPA,1996), realizado por Oliveira (2012), que ocorre por meio da armazenagem em resfriamento das sementes que foi adquirida comercialmente na cidade de Campo Mourão- Pr, lote: 0002601730053040, validade:06/2021, safra: 2017/2017, Para o controle positivo, em placas de Petri adicionam-se dez sementes sobre um papel filtro embebido com 3 mL da solução dos compostos em concentrações de 0,25, 0,5 e 100%. Da mesma forma, sementes expostas a água destilada e solução alcoólica a 2% constituem o controle negativo. Envolvendo-se as placas em filme plástico para evitar evaporação das soluções, logo incubaram-se a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 120 horas frente ao controle positivo e negativo, para a validação do ensaio. Na Figura 14 um fluxograma para representar o método do experimento.

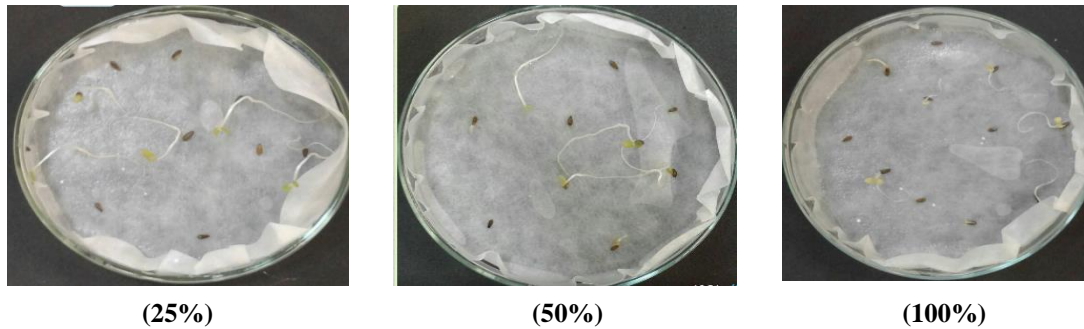
Figura 14 — Fluxograma do experimento de toxicidade com *Lactuca*



Fonte: LELES, 2017.

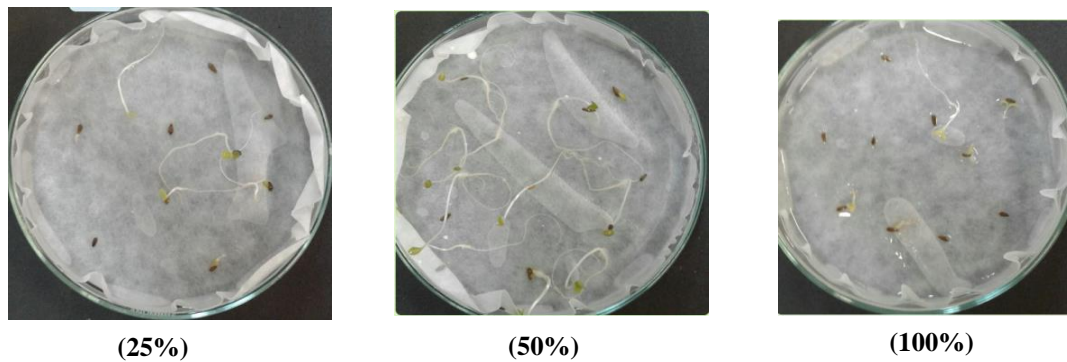
As Figuras 15 e 16 apresentam a germinação das sementes de *Lactuca Sativa* frente ao composto 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno e 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno à 25, 50 e 100%. Já a Figura 17 apresenta a germinação das sementes frente ao controle (H₂O).

Figura 15 — Germinação das sementes de *Lactuca Sativa* frente ao composto 1,3-bis(2,4-dinitrofenil)triazeno a 25, 50 e 100%.



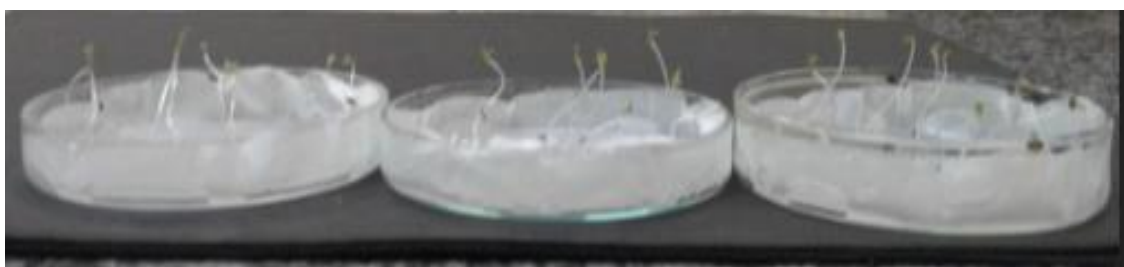
Fonte: Autoria própria, 2020.

Figura 16 — Germinação das sementes de *Lactuca Sativa* frente ao composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno a 25, 50 e 100%.



Fonte: Autoria própria, 2020.

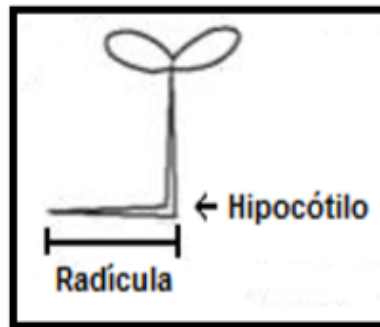
Figura 17 — Germinação das sementes de *Lactuca Sativa* frente à H₂O destilada.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Por fim analisaram-se a germinação das sementes de *Lactuca Sativa* em ambas às placas de Petri dos controles positivo e negativo, observando as germinações e o comprimento radicular dos controles. Após transcorrido as 120 h, observou-se quantas sementes germinaram em cada placa de petri e logo mediu-se o comprimento das radículas de cada plântula. A Figura 18 apresenta como foi realizada a distinção da raiz, a fim de mostrar como foram feitas as medições.

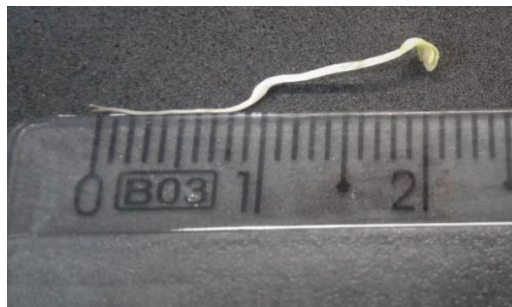
Figura 18 — Representação da plântula da *Lactuca*.



Fonte: SOBRERO et. al, 2004.

A Figura 19 apresenta a medição de uma plântula da raiz até o hipocótilo buscando exemplificar como foi realizada a medição radicular.

Figura 19 — Foto da medição da raiz até o hipocótilo.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Para realizar o cálculo da porcentagem relativa de germinação (RSG%), segundo Belo, (2011) utilizou-se a Equação 1:

$$\text{RSG\%} = \text{N}^\circ \text{ SGP} / \text{N}^\circ \text{ SGN} \quad (1)$$

Onde, N° SGP é a média aritmética do número de sementes germinadas no controle positivo e N° SGN é a média aritmética do número de sementes germinadas no controle negativo.

A partir da medição do comprimento radicular, realizaram-se os cálculos para encontrar a porcentagem relativa do comprimento relativo radicular (ICR%), de cada amostra em análise, utilizar-se a Equação 2:

$$\text{ICR\%} = \text{CRA} * 100 / \text{CRC} \quad (2)$$

Onde, ICR%: Índice do comprimento radicular; CRA: Comprimento da radícula na amostra e CRC: Comprimento da radícula no controle negativo.

Finalmente para encontrar o índice de germinação descrito por Young et al., (2012), dos compostos da classe triazenos às células de *Lactuca sativa*, utilizou -se a Equação 3:

$$\text{IG} = \text{RSG}\% * \text{ICR} / 100 \quad (3)$$

Onde, IG: Índice de germinação; ICR: Índice do comprimento radicular e RSG%: porcentagem relativa de sementes germinadas.

Segundo Leles (2017), pode ser calcular da mesma forma que as Equações anteriores (2 e 3) o índice de porcentagem de germinação residual normalizado (IGN%) através da Equação 4 e o índice de porcentagem de alongamento residual normalizado (IER%), por meio, da Equação 5.

$$\text{IGN}\% = \text{Germ x} - \text{Germ} / \text{Germ controle} \quad (4)$$

Onde, Germ x: porcentagem média de sementes germinadas em cada amostra e Germ controle: porcentagem de sementes germinadas no controle.

$$\text{IER} (\%) = \text{Along x} - \text{Along controle} / \text{Along controle} \quad (5)$$

Onde, Along: comprimento médio da radícula das sementes germinadas em cada amostra e Along controle: comprimento médio da radícula das sementes germinadas no controle.

Para ser aceito o experimento frente a *Lactuca Sativa* deve-se conter os seguintes critérios de acordo com Castro (2013), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 — Condições de aceitabilidade no ensaio de germinação de sementes.

Condições do Teste de Germinação de Sementes	
Tipo de teste	Estático
Pré-tratamento	Não
Temperatura	25-26°C
Luz	Não
Recipiente do ensaio	Placas de Petri d = 9cm
Papel filtro	Análise qualitativa
Volume do teste	3ml
Espécie planta	<i>Lepidium sativum</i> (agrião de jardim)
Nº de sementes	10
Réplicas	3-5
Controle	Água destilada
Duração do teste	48h (registro do nº de sementes germinadas e medição do comprimento das raízes)

Fonte: CASTRO, 2013.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE TOXICIDADE

Depois de desenvolver as sínteses, caracterizar os compostos da classe triazenos, realizou-se a análise de toxicidade, conforme descrito anteriormente na metodologia e representado no fluxograma que se encontra-se na Figura 14. Partindo da medição do comprimento radicular de cada plântula dos controles negativos determinou-se a toxicidade letal de germinação. Os dados encontram-se reunidos na Tabela 5.

Tabela 5—Dados de germinação e comprimento radicular na Solução alcóolica e na água.

Amostra	CMR	G. p/30 sementes	RSG%
Água	3,7 cm	29	96,6
Solução alcóolica	3,4 cm	26	86,6

Obs: S.A (solução alcóolica 2%); CMR (cumprimento médio radicular); RSG% porcentagem relativa de sementes germinadas(germinação para 30 sementes).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Ao observar a toxicidade entre os controles negativos, a solução alcoólica apresenta uma toxicidade de 0,3 cm no CMR em relação a água. Portanto para cada CMR frente aos compostos simétricos e assimétricos será somado 0,3 cm, assim como, será acrescentado 10% no índice de germinação, para tirar a toxicidade da S.A. A solução alcóolica foi utilizada para diluir os compostos da classe triazenos, pois são compostos com propriedades físicas (forças intermoleculares) que dificultam a dissolução apenas em água.

Contudo, para os cálculos relaciona-se com o controle negativo de água. A Tabela 6 apresenta os dados referentes aos cálculos do os ICR% (índice do comprimento radicular), RSG% (percentual de índice de germinação relativa) e IG% (índice de germinação) do composto simétrico 1,3bis(2,4 dinitrofenil)triazeno. Para os cálculos utilizou-se as Equações 1, 2 e 3, já para os cálculos de o índice de porcentagem residual normalizado (IGN%) e índice de porcentagem de alongamento residual normalizado (IRE%), utilizou-se as Equações 4 e 5, apresentadas anteriormente neste trabalho.

Tabela 6—Dados do experimento frente ao composto simétrico 1,3bis(2,4dinitrofenil)triazeno em diferentes concentrações.

1,3bis(2,4dinitrofenil)triazeno						
[%]	CMR (cm)	ICR%	RSG%	IG%	IGN	IER %
25	1,9	51	82	41	-0,14	-0,48
50	2,3	62	68	42	-0,29	-0,37
100	1,8	48	75	36	-0,21	-0,51

[%] (concentração das soluções do controle positivo); CMR (comprimento médio radicular); ICR% (índice do comprimento radicular); IG% (índice de germinação); IGN (índice de porcentagem de germinação residual normalizado) e IRE% (índice de porcentagem de alongamento residual normalizado).

Fonte: Autoria própria, 2020.

Os testes de toxicidade foram analisados de duas formas: toxicidade letal (DL50), seguindo o parâmetro da ANVISA e toxicidade subletal seguindo a Tabela 7 de Leles, (2017) e a Tabela 8 de Belo, (2011).

Segundo Leles,(2017) os índices IGN% e IER% indicam o nível de toxicidade, seguindo as categorias que se encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7—Parâmetros de análise do nível de toxidade para IGN e IER segundo LELES (2017)

IGN/IER	Toxicidade	Onde: Hormes e seria um
0 a -0,25	toxidade baixa (TB)	
-0,25 a -0,5	toxidade moderada (TM)	
-0,5 a -0,75	Toxicidade alta (TA)	
-0,75 a -1,0	Toxicidade muito alta (TMA)	
maior que 0	Hormese (H)	

efeito estimulante causado por baixas doses do contaminante, o que não significa que o contaminante seja benéfico para o organismo-teste (JACOB, 2014).

Fonte: LELES, 2017.

Também para avaliar o efeito tóxico nas células meristemáticas da *Lactuca Sativa* frente a um composto químico, utilizou-se a Tabela 8 apresentada por Belo (2011), que utiliza o índice de germinação para classificar a fitotoxicidade (análise que verifica a toxicidade em bioensaio), como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 — Classificação qualitativa de fitotoxicidade.

GI (%)	Classificação do material em análise	Fonte: Belo, 2011.
>100	A material potência a germinação e o crescimento da raiz das plantas	
80-100	Não fitotóxico; composto maturado	
60-80	Moderadamente fitotóxico	
30-60	Fitotóxico	
<30	Muito fitotóxico	

Seguindo o Parâmetro da ANVISA em que determina a toxicidade letal (DL50), sendo considerada se houver menos que 50% de inibição de germinação da amostra em relação ao controle negativo. Analisando-se os resultados de percentual de sementes germinadas do composto simétrico de triazenos, observa-se a Tabela 6 o RSG% que não houve toxicidade letal, já que o composto simétrico apresentou mais que 48,5% de RSG% para todas as concentrações (48,5% é referente a metade de 96,6% de germinação do controle negativo).

Já para análise subletal, os índices de germinação (IG%) segundo Belo (2011) Tabela 8 o composto simétrico apresentou fitotoxicidade para todas as concentrações, em que, variou de 36% a 41%, indicando que quanto maior porcentagem de germinação, menos toxicidade.

Os parâmetros de Leles (2017), que se encontra na Tabela 7, verifica-se que o composto simétrico a concentração de 50 e 100% apresentou toxicidade moderada e para 25%

toxicidade baixa para o IGN%. Já para o IER% apresentou-se toxicidade moderada para as concentrações de 25 e 50%, e toxicidade alta para a concentração de 100% que indica 1 mg do composto.

As plântulas germinadas frente ao composto simétrico apresentaram-se indícios de morte, com coloração marrom no comprimento radicular e folhagem amarelada, o que indica que, há uma grande concentração de átomos de nitrogênio ao meio. O nitrogênio é um nutriente que mais influência a morfo-fisiológicas das plantas, possibilitando alterar a quantidade de fruto, peso e qualidade (MARSCHNER, 1995). Portanto o que indica mais uma vez que, a síntese foi reproduzida com sucesso, pois os compostos da classe triazenos possuem vários átomos de nitrogênio.

Figura 20— Imagem da plântula de *Lactuca Sativa* frente ao composto simétrico



Fonte: autoria própria, 2020.

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos a partir dos cálculos citados anteriormente, porém para o composto assimétrico 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno

Tabela 9— Dados do experimento frente ao composto assimétrico 1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno em diferentes concentrações.

1-(4-nitrofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)triazeno						
[%]	CMR (cm)	ICR%	RSG%	IG%	IGN	IER %
25	3,3	89	78	70	-0,18	-0,10
50	2,6	71	82	58	-0,15	-0,29
100	1,9	51	65	33	-0,32	-0,48

[%] (concentração das soluções do controle positivo); CMR (comprimento médio radicular); ICR% (índice do comprimento radicular); IG% (índice de germinação); IGN (índice de porcentagem de germinação residual normalizado) e IER% (índice de porcentagem de alongamento residual normalizado).

Fonte: Autoria própria, 2020.

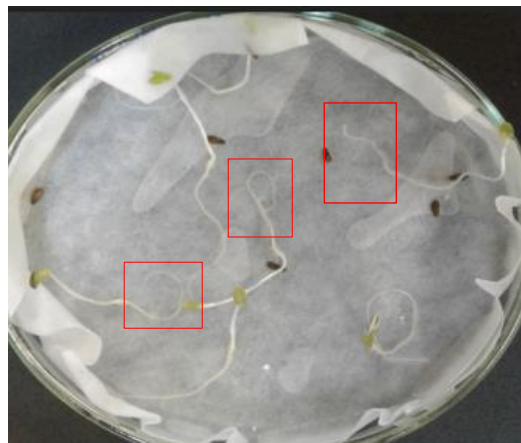
O composto assimétrico segundo referência da ANVISA para (DL50) também não apresentou toxicidade aguda (DL50) para as sementes de *Lactuca Sativa*, pois houve a germinação de mais que 50% das sementes em relação ao controle negativo, na qual, observa-se o valor de RSG% na Tabela 9 anterior.

Já para análise de toxicidade subletal, utilizando-se os parâmetros de BELO, (2011) que se encontra na Tabela 8, em que, classifica o índice de germinação com a fitotoxicidade o composto assimétrico mostrou-se fitotóxico para a concentração de 50% e 100% e moderadamente fitotóxico para a concentração de 25%.

Com os parâmetros de LELES (2017) que se encontra se na Tabela 7, o composto assimétrico mostrou-se toxicidade baixa para as concentrações de 25 e 50% e toxicidade moderada para a concentração de 100% em relação ao IGN%. Já para o IER% a maior concentração apresentou-se maior toxicidade e para 100% toxicidade alta.

As plântulas germinadas frente ao composto assimétrico apresentaram-se mais finas no comprimento radicular, em relação a germinação frente ao composto simétrico. Cultura com outras plantas, indicam que quando utilizado o nitrogênio em excesso em adubações, pode causar redução nas raízes e interferir no crescimento (RODRIGUES et. al., (2016).

Figura 21— Imagem da placa de Petri com plântulas germinadas frente ao composto assimétrico



Fonte: autoria própria,2020.

A Tabela 10 apresenta um comparativo para a toxicidade subletal entre os compostos simétrico e assimétrico.

Tabela 10—Resultado de toxicidade subletal em bioensaio frente aos compostos triazenos, seguindo os parâmetros de Belo (2011).

[%]	Simétrico	Assimétrico
25	FITO	MO/FITO
50	FITO	FITO
100	FITO	FITO

OBS: FITO: fitotóxico; MO. FITO: moderadamente fitotóxico.

Fonte: autoria própria, 2020.

Partindo dos parâmetros da análise de LELES (2017), nos quais, pode-se obter resultados um pouco mais específicos, observou-se onde os compostos foram mais tóxicos para a plântula das sementes de *Lactuca Sativa*. Esses resultados estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11— Resultado de toxicidade aguda em bioensaio frente aos compostos da classe triazenos, seguindo Leles (2017).

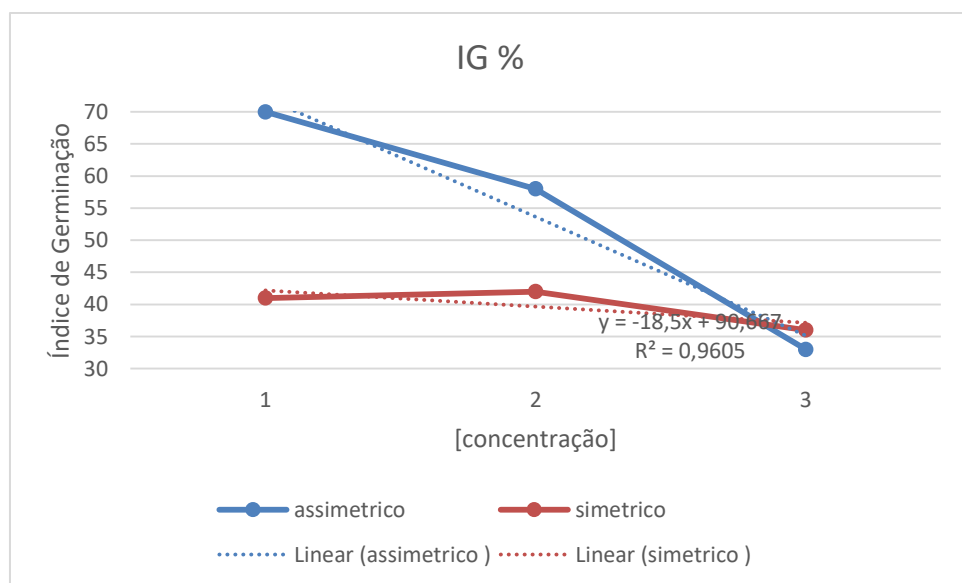
[%]	Simétrico IGN / IER %	Assimétrico IGN / IER%	OBS: TB: toxicidade baixa
25	TB/TM	TB/TA	
50	TM/TM	TB/TM	
100	TB/TA	TM/TA	

; TA: toxicidade alta; TM: toxicidade moderada.

Fonte: autoria própria, 2020

Ao analisar os dois compostos pelos parâmetros de toxicidade, verifica-se que o composto simétrico apresentou ser mais tóxico em relação ao composto assimétrico no índice de germinação, como mostra o Gráfico 1 na Figura 22.

Figura 22— Resultado do índice de germinação dos compostos da classe triazenos

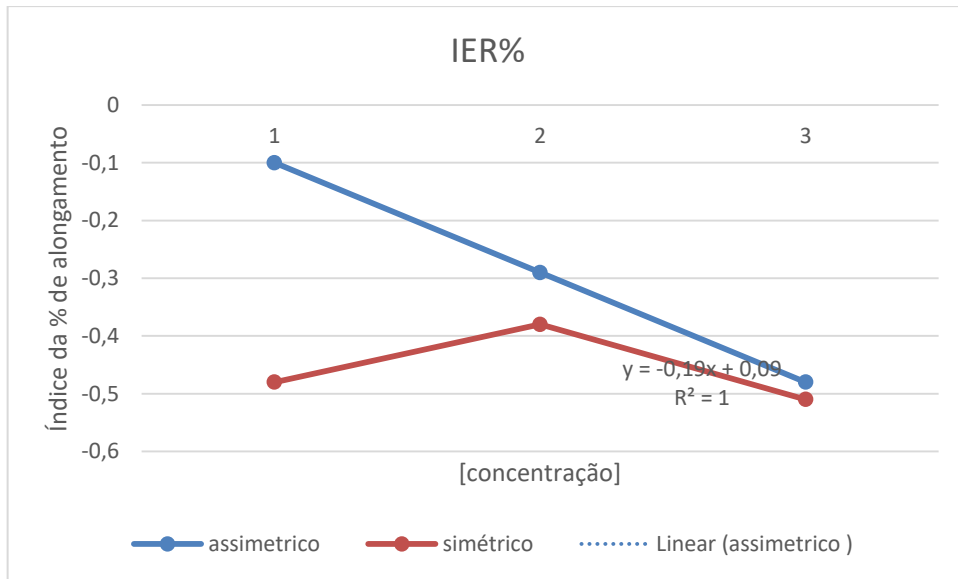


Fonte: Autoria própria, 2020.

A toxicidade do composto simétrico 1,3-bis(2,4-dinitrofenil) triazeno apresentou-se semelhante ao resultado de análise de toxicidade de Paraginsk et. al., (2014), que analisou a toxicidade de alguns compostos da classe triazenos, em que, em suas análises frente a teste *in vitro* com *Artemia Salina* mostraram-se que o composto 1,3-bis(2-bromofenil)triazeno simétrico apresentou-se maior toxicidade, semelhantemente a análise do composto simétrico deste trabalho.

Para a análise do composto simétrico deste, mostrou-se semelhante ao resultado de Paraginsk et. al., (2014), pois o composto simétrico apresentou ser mais tóxico em relação ao composto assimétrico.

Já na análise de porcentagem de alongamento radicular (IER%), observa-se que o composto simétrico também apresentou maior toxicidade em relação ao composto assimétrico, a seguir a comparação no Gráfico 2 na Figura 23.

Figura 23 — Dados da porcentagem de alongamento radicular de ambos os compostos

Fonte: Autoria própria, 2020.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises de toxicidade dos compostos da classe triazenos frente a *Lactuca Sativa* pode-se constatar que, ambos os compostos da classe triazenos não apresentaram toxicidade letal (DL50) para a germinação da *Lactuca Sativa* em relação ao controle negativo, Porém observou-se a toxicidade em relação a concentração ambos os compostos que apresentaram-se maior toxicidade referente a concentração de 100% que equivale a 1 mg.

O composto simétrico demonstrou maior toxicidade no índice de germinação das sementes e no índice de comprimento radicular. Se analisarmos o efeito tóxico do composto simétrico que apresentou toxicidade nas células meristemáticas da *Lactuca Sativa* e relacionarmos com as células do corpo que obtêm o mesmo procedimento de multiplicação a mitose, pode-se concluir que, o composto simétrico apresentou maior toxicidade em relação ao composto assimétrico. Contudo vale realizar outras análises em diferentes métodos *in vitro* e testes de citotoxicidade, já que se trata de compostos que possuem propriedades relevantes para ser um possível fármaco, em que, deve passar por todas as análises pré-clínicas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. F.; **Estudo do Efeito Anti-Tumoral Pró- Fármacos de Triazenos em Linha celulares Melanoma**, (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Farmácia- Universidade de Lisboa. Lisboa 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY; **Cancer facts & figures 2017**. Published in the American Cancer Society journal, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2017.
- BARBOSA, L.C.de A.; **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**, Viçosa: Ed. UFV, 2007.
- BELO. R. S. R.; **Avaliação de fitotoxicidade através de *Lepidium sativum* no âmbito de processos de compostagem** (Dissertação mestrado) departamento de engenharia mecânica; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Coimbra, setembro, 2011.
- BERDNARCZUK, V. O., et. al., **Testes in vitro e teste in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais**; Visão Acadêmica; Curitiba, V. 11, n.2, jul-dez, 2010.
- BORGHETTI. R. L. **Avaliação In Vitro Da Citotoxicidade, Genotoxicidade E Mutagenicidade De Materiais Estéticos De Preenchimento Facial-** (Tese de Doutorado) - área de concentração em Estomatologia Clínica-Faculdade de Odontologia-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2015.
- BONASSA, E. M. A; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3 ed - São Paulo. Editora Atheneu, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE- **A situação do câncer no Brasil-** Rio de Janeiro, INCA, 2006. Acesso em: 04/04/2019.
- CAPUCHA. A. T. V.; **Desenvolvimento De Pró-Fármacos De Triazenos Anti-Tumorais Para Aplicação Em Estratégias ADEPT: Activação Pela Carboxipeptidase G2 –** (Dissertação de Mestrado) - Subgrupo de Química Farmacêutica e Fitoquímica-Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Lisboa, 2010.

COSTA-LUTUFO et. Al.; A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**. 2010, V.2, n.1, p.47-58. Data de publicação na Web: 30 de agosto de 2010. Acesso em: 18/05/2019.

CASTRO. J. A.; **Avaliação ecotoxicológica dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinzas de carvão utilizando Lactuca Sativa e Daphnia similis como organismo teste** (Dissertação Mestrado), Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FERREIRA, P. A, **degradação do fármaco cloridrato de tetraciclina via processos oxidativos avançados**, (tese doutorado), Attena repositório digital, 2015. Acesso em: 21/08/2019.

GIGLIO, V.F., **Síntese e caracterização de triazenos e complexos de Hg(II) incluindo arranjos supramoleculares**. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Naturais e Exatas – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011. Acesso em: 04/09/2019.

GRYCZAK. Et. Al. Sementes De Lactuca Sativa Como Bioindicador De Toxicidade Em Resíduos De Construção Civil. (Dissertação de mestrado) - **Revista Tecnológica e Ambiente**-Santa Catarina, V. 24, 2018. Acesso em: 26/05/2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA- O câncer e seus fatores de risco - **Revista e atualizada**- 2 ed., Rio de Janeiro, 2013. Acesso em: 11/04/2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA- ABC do Câncer – **Revista e atualizada**- 3ed., Rio de Janeiro, 2017. Acesso em: 28/03/2019.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J.; **Farmacologia básica e clínica**. 13^a ed. McGraw-Hill Education – Lange – Artmed – Porto Alegre :AMGH Editora Ltda., 2017

KERSUL. P. A. **Enfrentamento Do Câncer: Riscos E Agravos**-(Trabalho de Conclusão de Curso)- Curso de Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família-Universidade Federal de Minas Gerais.

KEMPER, C. B.; **Avaliação da Atividade Biológica de Triazenos Inéditos Complexados Com Au(I)**. (Dissertação de Mestrado). Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013. Acesso em: 25 mar 2019.

LAVANDEDEIRA. F.M. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos-** (Dissertação Mestrado) - Ciências Biológicas- Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2014.

LELES D. **Avaliação ecotoxicológica de efluente têxtil com corante utilizando sementes de Lactuca sativa e Allium cepa**, (Monografia, trabalho de conclusão de curso), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

LIMA, E. L. V., **Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem**, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Quím. Nova vol.20 n°.6 São Paulo Nov./Dec. 1997. Acesso em: 10 jan. 2020.

LIMA et al. **Análise da citotoxicidade e genotoxicidade de Hibiscus sabdariffa L. in natura e industrializado, e comparação da toxicidade entre as formas analisadas da planta**. Multitemas, Campo Grande, MS, v. 23, n. 55, p. 121-132, set./dez. 2017. Acesso em: 20 abr. 2018.

LINARES. P.A.I.; **Estudo citotóxicos de Moléculas Antitumorais e Antiparasitárias em Células de Câncer de Fígado (Hep G2) e de Fibroblasto de Hamster (V79-4)**. (dissertação Mestrado) - Química Orgânica Biológica- Instituto de Química- Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p. MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Bern, International Potash Institute, 1987. p.687.

MOURA. S. N. et al.; **Ensaio Toxicológicos: Um Estudo Sobre A Utilização De Testes In Vivo E In Vitro**. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Revista Enciclopédia Biosfera- Centro Científico Conhecer, v.8, n.15; p. 1945, Goiânia 2012.

NASCIMENTO. S. n. et. al.; Biomarcadores como instrumento preventivo de poluição In Zagatto, P. A. Bertolotti, E.; **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p.413-429.

NASCIUTTI, R. P., **desenvolvimento de novos fármacos**, (mestrado), UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, Goiânia, 2012.

NAKAMOTO K., **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, 4a ed., John Wiley & Sons, New York, 1986.

OLIVEIRA. S. L. G.; **Avaliação Da Toxicidade De Efluente Kraft Após Tratamento Por Processos Oxidativos Avançado**. (Trabalho de Conclusão de Curso) -Departamento de Química e Biologia- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PARAGINSKI et al., **Atividade antibacteriana in vitro e toxicidade frente à Artemia salina Leach. de alguns compostos triazenos**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Química nova, vol. 37 n7. São Paulo, 2014.

PETROIANU, A. **Aspectos Éticos na Pesquisa em Animais**. Belo Horizonte, 1996.

RODRIGUES. N. A. A. et al.; **Nitrogênio no crescimento da planta e na qualidade de raízes da mandioquinha-salsa**; Ciência Rural, Santa Maria, v.46, n. 2, p. 242-247, fev, 2016. Acesso em: 10/02/ 2020.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. **Testes in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias**. Materials Reserach, Vol.6, N.3, p.317-320, 2003.

SANTOS. O. V.; **Incidentes Relacionados A Medicamentos Antineoplásicos No Contexto Hospitalar**. (Tese de Doutorado) - Centro De Ciências Biológicas E Da Saúde- Universidade Federal Do Estado Do Rio De Janeiro. Rio de Janeiro, 2017.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L) In: MORALES, G. C. (Ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. 1. ed. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2004.

SOLANO, D. J. et al.; Avaliação do Efeito Mutagênico da Solução Aquosa de Hymenea Coubaril L. Com Uso dos Biotestes Allium Cepa e Lactuca Sativa- **Revista Enciclopédia Biosfera**-centro científico do conhecer- Goiânia. V.11, n 21, p. 314,2015.






SOUZA. P. S. **análise do potencial antibacteriano de novos compostos da classe triazenos**-Trabalho de Conclusão de curso. (Graduação) Licenciatura em Química- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão 2018.

SPEECHLEY. V., ROSENFELD. M.; **Tudo Sobre o Câncer**- Ed. Andrei, 1ª ed. p.148. 2000.

VITORINO. A. H; **Compostos de Ferro de Interesse Farmacológico: Avaliação da Estabilidade, Toxicidade em Organismos Aquáticos, Transporte em Células e Capacidade de Gerar Reservatório de Ferro Lábil.** (Tese Doutorado) - Universidade de São Paulo- Instituto de Química. São Paulo, 2015.

ANEXO 1

Quadro 1: Reagentes perigosos.

Reagente/ Estado físico	Rotulo de Risco	EPI	Síndrome Toxicidade	Tratamento
2,4- Dinitroanilina (sólido)		Usar roupa de encapsulamento de borracha butílica ou polietileno clorado, máscara de respiração autônoma e óculos	Venenoso, se exposto a pele. irritante aos olhos. venenoso se ingerido.	Remover roupas e sapatos contaminados e enxaguar com muita água. manter as pálpebras abertas e enxaguar com muita água. manter a vítima aquecida.
4- Nitroanilina (sólido)		Usar luvas, botas e roupas de borracha butílica ou nitrílica ou pvc e máscara de respiração autônoma.	Irritante para a pele. irritante para os olhos. se ingerido causará dor de cabeça, tosse ou perda da consciência.	Remover roupas e sapatos contaminados e enxaguar com muita água. manter as pálpebras abertas e enxaguar com muita água. manter a vítima aquecida.
Ácido Acético (líquido)		Usar luvas, botas e roupas de borracha butílica, pvc e viton e máscara facial panorama com filtro contra vapores orgânicos.	Prejudicial, se ingerido. queimará os olhos. queimará a pele.	Não provocar o vômito. manter as pálpebras abertas e enxaguar com muita água. remover roupas e sapatos contaminados e enxaguar com muita água.
Ácido Clorídrico (líquido)		Usar luvas, botas e roupas de borracha butílica, pvc ou polietileno clorado e máscara de respiração de autônoma.	Queimará a pele. queimará os olhos. prejudicial, se ingerido.	Remover roupas e sapatos contaminados e enxaguar com muita água. manter as pálpebras abertas e enxaguar com muita água. não provocar o vômito.
Nitrito de Sódio (sólido)		Usar luvas, botas e roupas de proteção, máscara contra pó e óculos de acrílico com proteção lateral.	Irritante para a pele. irritante para os olhos. se ingerido causará dor de cabeça, náusea ou perda da consciência.	Remover roupas e sapatos contaminados e enxaguar com muita água. manter as pálpebras abertas e enxaguar com muita água. manter a vítima aquecida.

Fonte: autoria própria, 2019.