



Efeito citogenotóxico do α -terpineol em células meristemáticas de *Allium cepa* L.

Cytogenotoxic effect of α -terpineol in meristem cells of *Allium cepa* L.

R. E. A. R. da Costa^{1*}; C. N. de Melo¹; L. F. R. Camboim¹; M. G. Amorim¹; G. S. Rodrigues¹; R. B. Marques¹; F. A. Martins²; P. M. de Almeida¹

¹Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Piauí (CCS/UESPI), 64001-280, Teresina-Piauí, Brasil

²Centro de Ciências da Natureza, Universidade Estadual do Piauí (CCN/UESPI), 64002-150, Teresina-Piauí, Brasil

*rafaelearcosta@gmail.com

(Recebido em 15 de novembro de 2021; aceito em 01 de abril de 2022)

O α -terpineol é uma molécula utilizada na indústria alimentícia como aromatizante e apresenta atividade antioxidante, antitumoral e antiulcerativa. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito citogenotóxico do α -terpineol em células meristemáticas de *Allium cepa*. Raízes de *A. cepa* foram expostas ao controle negativo (Tween 80 a 1%), solvente (água destilada) e positivo (metilmetanosulfonato, 10 $\mu\text{g/mL}$) e nas concentrações nominais do α -terpineol (4,25; 8,5; 17; 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$) por 48 e 72h. O efeito tóxico foi avaliado pelo tamanho médio de 30 raízes e a citogenotoxicidade pela quantificação do índice mitótico e alterações cromossômicas em 5.000 células de *A. cepa* em microscópio óptico (400x). A Análise estatística foi realizada pelo teste Tukey ($p < 0,05$) para avaliar a toxicidade e pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) na citogenotoxicidade. O α -terpineol não apresentou efeito tóxico em *A. cepa* por 48 e 72h, mas foi citotóxico nas concentrações de 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$ por 48h e genotóxico nas maiores concentrações de 34 (72h) e 68 $\mu\text{g/mL}$ (48h). A análise individual das alterações cromossômicas mostrou aumento significativo apenas de micronúcleos em 34 $\mu\text{g/mL}$ por 72h de exposição. O α -terpineol não foi tóxico, mas teve ação citogenotóxica nas maiores concentrações, com possibilidade de contaminação ambiental e riscos para a saúde humana e animal, uma vez que o composto é muito utilizado na indústria.

Palavras-chave: alterações cromossômicas, índice mitótico, terpenos.

Alpha-terpineol is a molecule used in the food industry as a flavor enhancer that has antioxidant, anticancer and antiulcer activities. The aim of the current study was to evaluate the cytogenotoxic effect of α -terpineol in meristem cells of the *Allium cepa*. *A. cepa* roots were exposed to a negative control (1% of Tween 80), solvent (distilled water) and a positive control (methyl methanesulfonate, 10 $\mu\text{g/mL}$) and nominal concentrations of α -terpineol (4.25; 8.5; 17; 34 and 68 $\mu\text{g/mL}$) for 48 and 72h. Toxic effects were evaluated by the average length of 30 roots. Cytogenotoxicity was assessed quantifying the mitotic index and chromosomal alterations in 5,000 *A. cepa* cells under optic microscopy (400x). The statistical analysis was conducted by the Tukey test ($p < 0.05$) to evaluate toxicity and the Kruskal-Wallis nonparametric test ($p < 0.05$) to assess cytogenotoxicity. Alpha-terpineol did not have toxic effects on the *A. cepa* for 48 and 72h, although it had cytotoxic effects at concentrations of 34 and 68 $\mu\text{g/mL}$ for 48h and genotoxic effects at higher concentrations of 34 (72h) and 68 $\mu\text{g/mL}$ (48h). Individual analysis of chromosomal alterations only showed a significant increase in micronuclei at 34 $\mu\text{g/mL}$ over a 72h-exposure. Alpha-terpineol was not toxic. However, it had cytogenotoxic activity at higher concentrations, with potential environmental contamination and risks to human and animal health, since the compound is widely used in the industry.

Keywords: chromosomal alterations, mitotic index, terpenes.

1. INTRODUÇÃO

Os terpineóis ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$) são álcoois monoterpênicos monocíclicos que se apresentam em quatro isômeros: α -, β -, γ -, e δ -terpineol, sendo o α - o mais abundante na natureza e muito utilizado na indústria como aromatizante. O α -terpineol é formado por dois enantiômeros: S-(-)- α -terpineol e R-(+)- α -terpineol, com baixo ponto de ebulição (entre 35 e 41 °C), sendo responsável por sua propriedade aromatizante [1-4], com odor floral ou de coníferas [2].

O α -terpineol pode ser encontrado em folhas, flores, frutos e óleos essenciais e pode ser obtido a partir da biotransformação de outros monoterpenos, como o limoneno, α - e β -pinenos [2, 3, 5]. Estudos na literatura tem associado o α -terpineol a diversos efeitos biológicos, como ação antioxidante [6, 7], anti-inflamatória [8-10], anticonvulsivante e antimicrobiana [11-16], anticarcinogênica [17-21] e antimutagênica [7] que estão associados a estrutura química da molécula, que possui grande potencial de ligação tanto as espécies reativas de oxigênio (ERO), como a alvos terapêuticos (receptores e/ou enzimas) [2, 22, 23].

Embora já tenham demonstrado que o α -terpineol não foi tóxico para animais, a partir da sua ingestão em uma margem de segurança entre 1,2 e 12 mg/Kg, outros estudos relataram citotoxicidade do α -terpineol *in vitro*, sendo um indício de possíveis efeitos toxicológicos [2, 18, 24-26]. Além disso, compostos isolados, como o α -terpineol, podem gerar instabilidade genética, por meio de danos genotóxicos e/ou mutagênicos, que podem promover quebras cromossômicas e/ou alterações no fuso mitótico, representando os eventos clastogênicos e aneugênicos, respectivamente [27, 28]. Nesse sentido, avaliar o perfil citogenotóxico de moléculas com as quais a população possa ter contato é importante para prevenir doenças que possam estar associadas à instabilidade genética, como o câncer [29].

O sistema teste de alterações cromossômicas em *Allium cepa* (cebola) é amplamente citado na literatura como bioindicador para avaliação da citogenotoxicidade de compostos químicos e isolados, pois possui rápida multiplicação celular e apresenta ainda cromossomos relativamente grandes e em número reduzido, o que permite uma melhor análise de alterações estruturais e numéricas [1, 30-32]. O teste é reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um bioensaio confiável para essa finalidade [33, 34]. Além disso, apresenta boa correlação com ensaios de citogenotoxicidade *in vitro* ou *in vivo* [33-35].

Considerando a presença do α -terpineol na natureza, seu potencial terapêutico e sua ampla aplicação na indústria, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citogenotóxico do α -terpineol em células meristemáticas de *A. cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Compostos testados

O α -terpineol (CAS: 98-55-5) e o metilmetanosulfonato (MMS, CAS: 66-27-3) foram obtidos da *Sigma-Aldrich Corporation* (St. Louis, MO, USA).

2.2 Bioensaio *Allium cepa*

Cem sementes de *A. cepa* por placa de Petri (15x15x1,5 cm) com água destilada foram germinadas em incubadora (BOD SL-224®), com fotoperíodo de 12h e temperatura de 24 °C, por quatro dias no Laboratório de Genética do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Estadual do Piauí (LABGEN-CCN/UESPI), Teresina-Piauí, Brasil.

Após a germinação, 30 sementes com raízes entre 1-2 cm por placa de Petri foram transferidas para o controle negativo (CN) (solução de água destilada com o surfactante Tween 80 a 1%), solvente (CS) (água destilada) e positivo MMS (metilmetanosulfonato, 10 μ g/mL) e para o α -terpineol nas concentrações nominais de 4,25; 8,5; 17; 34 e 68 μ g/mL dissolvidos em solução de água destilada com o Tween 80 a 1% por 48 e 72h. A concentração do α -terpineol de 68 μ g/mL foi pré-estabelecida por ser o valor limite para exposição a curto-prazo (exposição única) em água doce sem efeitos toxicológicos [36]. As demais concentrações nominais utilizadas foram obtidas por diluição seriada.

Após 48 e 72h, o comprimento médio das raízes foi medido em régua milimétrica e registrado para avaliar o efeito tóxico. Em seguida, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) por 6-8h e estocadas a -20 °C. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada por 5 minutos cada e hidrolisadas a 60 °C por 10 minutos em HCl 1N.

Depois da hidrólise, foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o reativo de Schiff, nos quais permaneceram em local escuro por 2h. As raízes foram então lavadas, até a total retirada do reativo, e transferidas para lâminas, nas quais foram esmagadas em uma gota de carmim acético a 2% e montadas com Entellan® (107960; Merck Millipore) [37].

A citogenotoxicidade foi avaliada pela contagem de 5.000 células meristemáticas por tratamento (500 células/lâmina, com um total de 10 lâminas analisadas por tratamento) em microscópio de luz (Zeiss Primo Star com câmera AxioCam 105 color), com aumento de 400x. Para cada tratamento, foram avaliados o índice mitótico (IM, citotoxicidade) e a média de alterações cromossômicas (genotoxicidade). As alterações cromossômicas podem ser resultantes de ação aneugênica (metáfase com aderência cromossômica, c-metáfase, perda cromossômica, anáfase multipolar, células binucleadas e metáfases poliploides, dentre outras) e/ou clastogênica (fragmentos cromossômicos em metáfase ou anáfase, pontes cromossômicas e outras alterações) [38]. Os micronúcleos também foram avaliados e podem ter origem aneugênica e/ou clastogênica [30, 39]. Para determinar o IM, o número de células em diferentes fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) foi dividido pelo número total de células e multiplicado por 100. Para alterações cromossômicas, o número de alterações foi dividido pelo número total de células.

2.3 Análise estatística

Os dados de toxidade foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), pois apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Enquanto a citogenotoxicidade foi analisada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste a posteriori de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Os testes citados foram analisados no programa BioEstat 5.3 para realizar a comparação entre as médias dos controles e das concentrações utilizadas [40].

3. RESULTADOS

O α -terpineol não foi tóxico, pois não houve redução significativa do comprimento médio das raízes de *A. cepa* em relação ao controle negativo após 48 e 72h (Tabela 1), mas foi citotóxico nas concentrações de 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$ após 48h de exposição, uma vez que houve redução significativa do IM nas células meristemáticas de *A. cepa* em relação ao controle negativo, o que não ocorreu nas menores concentrações. Após 72h, nenhuma das concentrações utilizadas (4,25-68 $\mu\text{g/mL}$) foram citotóxicas (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito tóxico e citotóxico do α -terpineol em *Allium cepa*, após exposição por 48 e 72h.

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Comprimento médio da raiz (cm)		Índice mitótico (%)	
	48h	72h	48h	72h
CN	1,82 \pm 0,82	2,27 \pm 0,65	26,21 \pm 8,43	17,83 \pm 8,14
CS	2,12 \pm 0,76	2,69 \pm 1,01	23,57 \pm 7,38	18,28 \pm 6,78
CP	1,19 \pm 0,71**	1,44 \pm 0,83**	12,78 \pm 4,84 ⁺	13,81 \pm 8,47 ⁺
4,25	1,75 \pm 0,61	2,51 \pm 0,82	17,16 \pm 9,58	17,32 \pm 6,03
8,5	1,51 \pm 0,65	2,62 \pm 0,90	20,55 \pm 6,05	16,62 \pm 5,84
17	1,75 \pm 0,61	2,50 \pm 1,04	16,12 \pm 5,97	18,92 \pm 7,84
34	1,22 \pm 0,54	2,76 \pm 0,37	15,08 \pm 6,94*	17,60 \pm 6,08
68	1,60 \pm 0,58	2,73 \pm 0,61	14,27 \pm 6,05*	14,44 \pm 7,12

Dados: Média \pm desvio-padrão. CN: Controle negativo (Tween 80 a 1%). CS: Controle do solvente (água destilada). CP: Controle positivo (MMS: Metilmetanossulfonato, 10 $\mu\text{g/mL}$). *Significativo no teste de Tukey ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$). ⁺Significativo no teste de Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls a posteriori ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. Os resultados referem-se à análise de 30 raízes (tóxico) e 5.000 células meristemáticas (citotóxico) por tratamento.

O α -terpineol não apresentou efeito genotóxico nas concentrações entre 4,25 e 34 $\mu\text{g/mL}$ nas células de *A. cepa* por 48h de exposição, pois a média total das alterações cromossômicas não foram significativas quando comparadas com o CN. Já na maior concentração (68 $\mu\text{g/mL}$), houve um aumento significativo, sendo genotóxica (Tabela 2). Os resultados referentes à 72h mostram genotoxicidade do isolado apenas em 34 $\mu\text{g/mL}$. Quando as alterações cromossômicas foram analisadas individualmente, o α -terpineol resultou apenas no aumento significativo da média de micronúcleos (MN) em células de *A. cepa* após 72h (Tabela 2), o que evidenciou também a sua ação mutagênica em 34 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 1 ilustra todas as alterações cromossômicas identificadas individualmente nas células de *A. cepa*, após a exposição do α -terpineol por 48 e/ou 72h. Figura 1A: Micronúcleo. Figura 1B: Broto nuclear. Figura 1C: Quebra cromossômica. Figura 1D: C-metáfase. Figura 1E: Ponte cromossômica. Figura 1F: Célula binucleada. Figura 1G: Metáfase poliploide. Figura 1H: Aderência cromossômica.

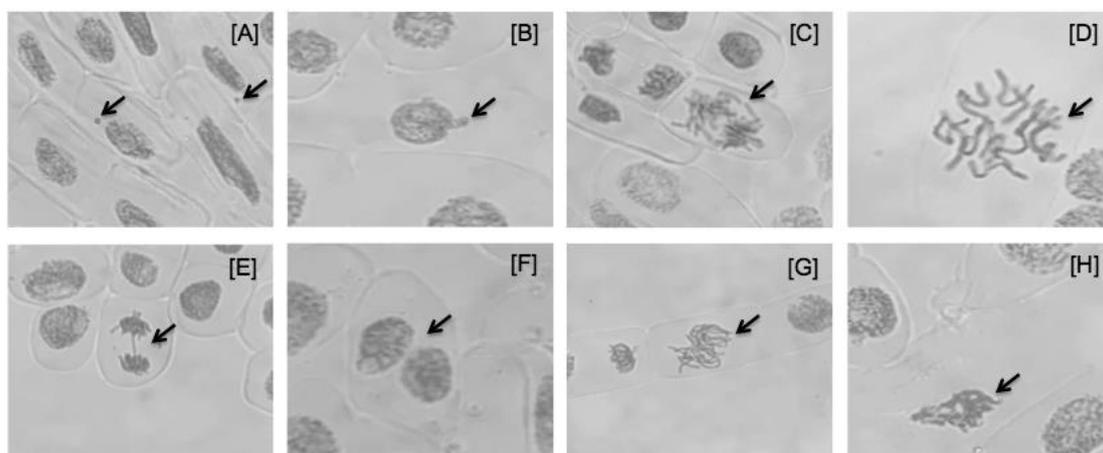


Figura 1: Alterações cromossômicas em *Allium cepa*, após exposição por 48 e/ou 72h ao α -terpineol.

Tabela 2: Efeito genotóxico do *α*-terpineol em *Allium cepa*, após exposição por 48 e 72h.

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Alterações cromossômicas (48h)								Média total
	MN	BN	QC	C-MET	PT	CB	CP	AC	
CN	0,69 \pm 0,84	0,72 \pm 1,13	0,0 \pm 0,0	0,74 \pm 1,72	0,0 \pm 0,0	2,94 \pm 4,31	0,28 \pm 0,45	0,09 \pm 0,27	5,39 \pm 5,65
CS	0,48 \pm 0,88	1,07 \pm 1,83	0,0 \pm 0,0	1,86 \pm 2,91	0,0 \pm 0,0	0,70 \pm 1,40	0,0 \pm 0,0	0,69 \pm 1,44	5,04 \pm 3,47
CP	24,73 \pm 14,91***	12,46 \pm 13,94***	0,0 \pm 0,0	2,86 \pm 3,53*	0,0 \pm 0,0	0,85 \pm 0,97	0,19 \pm 0,61	1,11 \pm 1,83*	42,33 \pm 17,71**
4,25	0,20 \pm 0,42	0,09 \pm 0,28	0,0 \pm 0,0	0,19 \pm 0,41	0,08 \pm 0,26	1,44 \pm 2,31	0,0 \pm 0,0	0,62 \pm 1,30	2,62 \pm 3,75
8,5	0,17 \pm 0,54	0,25 \pm 0,57	0,0 \pm 0,0	0,34 \pm 0,58	0,17 \pm 0,35	0,24 \pm 0,39	0,16 \pm 0,50	0,33 \pm 0,78	1,66 \pm 2,01
17	0,74 \pm 1,11	1,47 \pm 1,62	0,08 \pm 0,25	0,08 \pm 0,24	0,0 \pm 0,0	1,30 \pm 2,58	0,53 \pm 0,94	0,67 \pm 1,00	4,87 \pm 5,30
34	2,14 \pm 2,51	1,89 \pm 2,34	0,0 \pm 0,0	0,20 \pm 0,41	0,0 \pm 0,0	1,20 \pm 1,66	0,0 \pm 0,0	0,16 \pm 0,34	5,59 \pm 3,33
68	2,93 \pm 2,69	7,55 \pm 8,19	0,0 \pm 0,0	1,25 \pm 1,49	0,09 \pm 0,29	1,02 \pm 1,62	0,28 \pm 0,64	0,81 \pm 1,20	13,94 \pm 9,24*
Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Alterações cromossômicas (72h)								Média total
	MN	BN	C-MET	PT	CB	CP	AC		
CN	3,00 \pm 2,51	3,22 \pm 3,48	0,29 \pm 0,65	0,00 \pm 0,00	0,42 \pm 0,80	0,16 \pm 0,52	0,78 \pm 1,22	7,87 \pm 4,56	
CS	4,13 \pm 3,81	4,83 \pm 5,67	0,42 \pm 0,58	0,09 \pm 0,27	0,16 \pm 0,52	0,08 \pm 0,25	0,51 \pm 0,89	10,21 \pm 5,08	
CP	30,96 \pm 19,24***	13,86 \pm 15,41*	0,33 \pm 0,69	0,27 \pm 0,43	0,09 \pm 0,28	0,40 \pm 1,26	0,83 \pm 1,25	46,73 \pm 10,47**	
4,25	6,84 \pm 5,13	4,52 \pm 5,87	0,71 \pm 1,33	0,08 \pm 0,27	0,07 \pm 0,24	0,07 \pm 0,24	0,17 \pm 0,53	12,47 \pm 4,34	
8,5	6,37 \pm 5,41	5,46 \pm 7,56	0,18 \pm 0,39	0,00 \pm 0,00	0,19 \pm 0,39	0,00 \pm 0,00	0,27 \pm 0,60	12,47 \pm 6,72	
17	10,75 \pm 9,56	5,07 \pm 5,58	0,09 \pm 0,27	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,07 \pm 0,22	15,98 \pm 6,75	
34	11,48 \pm 9,04**	5,80 \pm 6,67	0,09 \pm 0,29	0,00 \pm 0,00	0,19 \pm 0,59	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	17,57 \pm 5,95*	
68	10,50 \pm 10,69	3,71 \pm 4,79	0,09 \pm 0,29	0,00 \pm 0,00	0,52 \pm 0,74	0,08 \pm 0,24	0,10 \pm 0,31	14,99 \pm 7,09	

Dados: Média \pm desvio-padrão. CN: Controle negativo (Tween 80 a 1%). CS: Controle do solvente (água destilada). CP: Controle positivo (MMS: Metilmetanossulfonato, 10 $\mu\text{g/mL}$). MN: Micronúcleo. BN: Broto nuclear. QC: Quebra cromossômica. C-MET: C-metáfase. PT: Ponte cromossômica. CB: Célula binucleada. CP: Célula poliploide. AC: Aderência cromossômica. *Comparado estatisticamente ao controle negativo para avaliar a genotoxicidade. *Significativo no teste de Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

4. DISCUSSÃO

A alta sensibilidade da análise tóxica, citotóxica e genotóxica em *A. cepa* e sua correspondência com outros modelos de análise *in vitro* e *in vivo* torna esse sistema teste ideal para avaliar possíveis danos citogenotóxicos [35, 41-43]. Levando em consideração a aplicação do α -terpineol na indústria, o que também torna possível a ocorrência de danos ao meio ambiente, como contaminação de fontes naturais de água, o conhecimento deste perfil em doses menores se torna uma importante ferramenta de proteção ambiental [44].

Segundo dados da *European Chemicals Agency* – ECHA, o α -terpineol não apresenta efeitos toxicológicos graves em animais, não sendo classificado como mutagênico para as células germinativas, cancerígeno ou mesmo tóxico reprodutivo [36] e não está relacionado a riscos significativos para a saúde humana [45]. Além disso, o α -terpineol também não se mostra tóxico para órgãos-alvo específicos, após exposição única ou repetida, e pode provocar irritação cutânea e ocular. Em ratos, a dose letal média (DL₅₀) foi de 4.300 mg/kg para exposição por via oral e de 2.000 mg/kg para exposição por via cutânea [36]. A ECHA também indica que o α -terpineol não é perigoso para o ambiente aquático e não se acumula significativamente nos organismos aquáticos, além de ser facilmente biodegradável. Em peixes, a concentração letal média (CL₅₀) foi de 70 mg/l após exposição por 96h. Já em invertebrados aquáticos, a concentração efetiva média (CE₅₀) foi de 73 mg/l após exposição por 48h. Em algas, por sua vez, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento (EC₅₀) após 72h de exposição foi de 68 mg/l. Enquanto a concentração de 68 μ g/mL no presente estudo foi pré-estabelecida por ser o valor limite para exposição a curto-prazo (exposição única) em água doce sem efeitos toxicológicos [36].

No presente estudo, não foram evidenciados efeitos tóxicos em relação ao crescimento das raízes nas concentrações testadas do α -terpineol. O α -terpineol foi citotóxico nas maiores concentrações (34 e 68 μ g/mL em 48h) em *A. cepa*, o que mostra que provavelmente o mesmo interferiu no processo de síntese do DNA e/ou no bloqueio do ciclo celular na fase G2, diminuindo a quantidade de células em divisão celular [46, 47]. Outros estudos também já mostraram a citotoxicidade do α -terpineol em *Geotrichum citri-aurantii* [2], em linhagens celulares de melanoma de camundongos (B16-F10) e seres humanos (SK-MEL-28) [18], HeLa [24], B16-F10 e de sarcoma 180 [48]. Além disso, Sobral et al. (2014) demonstraram que a associação de acetato de linalila, α -terpineol e cânfora apresentaram atividade citotóxica contra linhagens celulares de HCT-116 (p53^{+/+} e p53^{-/-}), Hep G2, HeLa, MOLT-4, K-562 e CTVR-1 [26]. Enquanto nas menores concentrações (4,25 a 17 μ g/mL) em 48h e em todas após 72h de exposição, não houve efeito significativo da redução do IM pelo α -terpineol, ou seja, o isolado provavelmente não interferiu com a fase S do DNA e/ou no bloqueio de G2, permitindo as células entrarem em divisão [46, 47].

O α -terpineol foi genotóxico neste estudo, pois resultou no aumento significativo na média total de alterações cromossômicas em *A. cepa* em 68 μ g/mL (48h) e 34 μ g/mL (72h). Na maioria das concentrações após 48 e 72h, o α -terpineol não interferiu com as fibras do fuso, o padrão de condensação cromossômica, citocinese das células de *A. cepa*, o que resultou em alterações cromossômicas não significativas, como C-metáfase, aderência cromossômica, célula poliploide, célula binucleada [46, 49]. Além disso, o isolado também não provocou efeitos clastogênicos significativos, como as quebras cromossômicas e pontes cromossômicas [49, 50].

O efeito genotóxico observado pode estar relacionado, principalmente, com a presença de MN e BN, que foram as alterações cromossômicas evidenciadas em maior quantidade. Os MN são originados a partir de danos clastogênicos e/ou aneugênicos não reparados ou erroneamente reparados nas células parentais, sendo facilmente observados nas células filhas como uma estrutura semelhante ao núcleo principal, mas em tamanho reduzido [49, 50]. O BN pode estar relacionado à formação de MN, por meio da eliminação de material genético extra no núcleo principal da célula, ou pode ser devido à agregação de um cromossomo retardado pelo envelope nuclear, antes de ser totalmente reincorporado ao núcleo principal [51]. O aumento significativo de MN em 34 μ g/mL por 72h de exposição indica também o efeito mutagênico [52].

De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA), o α -terpineol é seguro para o meio ambiente, uma vez que é frequente em componentes vegetais. Apesar disso, o α -terpineol apresenta um risco potencial para o compartimento aquático, sendo necessários ainda mais estudos, como este, que ajudem a estabelecer os seus valores de segurança [53]. O presente estudo estima uma janela de genotoxicidade do α -terpineol no intervalo entre 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$, o que mostra um risco potencial do uso do α -terpineol para o meio ambiente, pois há possibilidade de acidentes e descarte inadequado, comprometendo a saúde ambiental, humana e animal [44].

5. CONCLUSÃO

O α -terpineol não mostrou toxicidade em relação ao crescimento das raízes de *A. cepa*, foi citotóxico em 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$ por 48h e genotóxico em 68 e 34 $\mu\text{g/mL}$ em 48 e 72h, respectivamente, destacando-se a presença de MN e BN, que foram as alterações cromossômicas evidenciadas em maior quantidade. A genotoxicidade apresentada pelo α -terpineol em 34 e 68 $\mu\text{g/mL}$ mostra a necessidade de mais estudos toxicológicos para estimar os impactos do seu uso na saúde ambiental, humana e animal.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Estadual do Piauí (UESPI) por fornecer a infraestrutura laboratorial necessária para a realização deste estudo e pelo apoio institucional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Api AM, Belsito D, Bhatia S, Botelho D, Browne D, Bruze M, et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, terpineol, CAS Registry Number 8000-41-7. *Food Chem Toxicol.* 2017 Dez;110(Supl 1):S392-402. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.042
2. Sales A, Felipe LO, Bicas JL. Production, properties, and applications of α -terpineol. *Food Bioproc Tech.* 2020 Mai;13:1261-79. doi: 10.1007/s11947-020-02461-6
3. Surburg H, Panten J. common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses. 5. ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc.; 2006. doi: 10.1002/3527608214
4. Ravid U, Putievsky E, Katzir I. Determination of the enantiomeric composition of alpha-terpineol in essential oils. *Flavour Fragr J.* 1995 Jul;10(4):281-4. doi: 10.1002/ffj.2730100409
5. Molina G, Pessôa MG, Bicas JL, Fontanille P, Larroche C, Pastore GM. Optimization of limonene biotransformation for the production of bulk amounts of α -terpineol. *Bioresour Technol.* 2019 Dez;294:122180. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122180
6. Maróstica Júnior MR, Silva TAAR, Franchi GC, Nowill A, Pastore GM, Hyslop S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chem.* 2009 Set;116(1):8-12. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.084
7. Di Sotto A, Durazzi F, Sarpietro MG, Mazzanti G. Antimutagenic and antioxidant activities of some bioflavours from wine. *Food Chem Toxicol.* 2013 Out;60:141-6. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.042
8. Held S, Schieberle P, Somoza V. Characterization of alphaterpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by *in vitro* studies using oral buccal cells. *J Agric Food Chem.* 2007 Out;55(20):8040-6. doi: 10.1021/jf071691m
9. Nogueira MNM, Aquino SG, Rossa C, Spolidorio DMP. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res.* 2014 Set;63(9):769-78. doi: 10.1007/s00011-014-0749-x
10. Sousa GM, Cazarin CBB, Maróstica Júnior MR, Lamas CA, Quitete VHAC, Pastore GM, et al. The effect of α -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high fat-diet. *Heliyon.* 2020 Abr;6(4):e03752. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03752
11. Gouveia DN, Costa JS, Oliveira MA, Rabelo TK, Silva AMOE, Carvalho AA, et al. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. *Biomed Pharmacother.* 2018 Set;105:652-61. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.027
12. Sousa DP, Quintans Jr. L, Almeida RN. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol. *Pharm Biol.* 2007 Out;45(1):69-70. doi: 10.1080/13880200601028388

13. Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*. 2014 Mar;37:277-83. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.057
14. An P, Yang X, Yu J, Qi J, Ren X, Kong Q. α -Terpineol and terpen-4ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities *in vitro* and *in vivo* against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control*. 2019 Abr;98:42-53. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.013
15. Kumar Chaudhari A, Singh A, Kumar Singh V, Kumar Dwivedy A, Das S, Grace Ramsdam M, et al. Assessment of chitosan biopolymer encapsulated α -Terpineol against fungal, aflatoxin B1 (AFB1) and free radicals mediated deterioration of stored maize and possible mode of action. *Food Chem*. 2020 Mai;311:126010. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126010
16. Dasgupta A, Gu Q, Hermanson KD, Moaddel T, Salgaonkar N, Shen B, et al., inventores; Unilever N.V., depositante. An antimicrobial composition comprising thymol, terpineol and a cationic phospholipid. NL patente 17714740.2. 2019 Dez 18.
17. Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz AL, Carvalho JE, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol*. 2011 Jul;49(7):1610-5. doi: 10.1016/j.fct.2011.04.012
18. Batista FA, Fontele SBC, Santos LKB, Filgueiras LA, Nascimento SQ, Castro e Sousa JM, et al. Synthesis, characterization of α -terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. *Mater Today Commun*. 2020 Mar;22:100762. doi: 10.1016/j.mtcomm.2019.100762
19. Hassan SB, Gali-Muhtasib H, Göransson H, Larsson R. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling. *Anticancer Res*. 2010 Jun;30(6):1911-9.
20. Zhang Y, Li D, Wang Z, Zang W, Rao P, Liang Y, et al. Alpha-terpineol affects synthesis and antitumor activity of triterpenoids from *Antrodia cinnamomea* mycelia in solid-state culture. *Food Funct*. 2018 Dez;9(12):6517-25. doi: 10.1039/c8fo02079e
21. Negreiros HA, Moura KG, Barreto do Nascimento MLL, Nascimento Rodrigues DC, Ferreira PMP, Braz DC, et al. Alpha-terpineol as antitumor candidate in pre-clinical studies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2021 Jan;21(15):2023-31. doi: 10.2174/1871520621999210104195820
22. Felipe LO, Bicas JL. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Quím Nova Esc*. 2017 Mai;39(2):120-30. doi: 10.21577/0104-8899.20160068
23. Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem*. 2018 Abr;16:349-61. doi: 10.1515/chem-2018-0040
24. Noor R, Astuti, I, Mustofa. Cytotoxicity of α -terpineol in HeLa cell line and its effects to apoptosis and cell cycle. *J Med Sci*. 2014 Mar;46(1):1-9. doi: 10.19106/JMedScie004601201401
25. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. 2012 Jun;18(3):369-72. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.001
26. Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, Sousa DP. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *ScientificWorldJournal*. 2014 Out;2014:953451. doi: 10.1155/2014/953451
27. Singh S, Chattopadhyay P, Borthakur SK, Policegoudra R. Safety profile investigations of *Meyna spinosa* (Roxb.) and *Oroxylum indicum* (Linn.) extracts collected from Northeast India. *Pharmacogn Mag*. 2018 Jan;13(Supl 4):S762-8. doi: 10.4103/pm.pm_62_15
28. Kahaliw W, Hellman B, Engidawork E. Genotoxicity study of Ethiopian medicinal plant extracts on HepG2 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018 Fev;18(1):45. doi: 10.1186/s12906-017-2056-x
29. Reddenna L, Venkatesh P, Kumar KS, Reddy ASK. Genotoxicity. *PharmaTutor*. 2017 Set;5(9):23-34.
30. Bonciu E, Firbas P, Fontanetti CS, Wusheng J, Karaismailoğlu MC, Liu D, et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*. 2018 Set;71(3):191-209. doi: 10.1080/00087114.2018.1503496
31. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res*. 2009 Jul-Ago;682(1):71-81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
32. Nantes CI, Pesarini JR, Mauro MO, Monreal AC, Ramires AD, Oliveira RJ. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of carrageenan fiber in cultured meristematic cells of *Allium cepa*. *Genet Mol Res*. 2014 Nov;13(4):9523-32. doi: 10.4238/2014.November.12.1
33. Fachinnetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn*. 2007 Mar;17(1):49-54. doi: 10.1590/S0102-695X2007000100011
34. Maity S, Chatterjee A, Guchhait R, De S, Pramanick K. Cytogenotoxic potential of a hazardous material, polystyrene microparticles on *Allium cepa* L. *J Hazard Mater*. 2020 Mar;385:121560. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121560

35. Eren Y, Özata A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. *Rev Bras Farmacogn.* 2014 Jan-Fev;24(1):51-9. doi: 10.1590/0102-695X20142413322
36. Carl Roth. Ficha de dados de segurança: alfa-terpineol Rotichrom® GC - Carl Roth. Karlsruhe (BW): Carl Roth; 2019. Carl Roth GmbH & Co KG. Report, 5152 (version 2.1. pt).
37. Santos Freire J, Santos Fernandes BC, Silva JAC, Silva Araújo JR, Almeida PM, Costa Júnior JS, et al. Phytochemical and antioxidant characterization, cytogenotoxicity and antigenotoxicity of the fractions of the ethanolic extract of in *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz. *J Toxicol Environ Health A.* 2020 Dez;83(23-24):730-47. doi: 10.1080/15287394.2020.1824136
38. Pereira ML, Monteiro CN, Siqueira C, Ribeiro MS, Lopes AP, Sousa R, et al. Evaluation of effects of *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz leaves in *Allium cepa* and *Mus musculus*. *Biotech Histochem.* 2020 Ago;95(6):464-73. doi: 10.1080/10520295.2020.1719197
39. Couto ACF, Araújo IKP, Lopes AP, Couto LMFMCB, Santos PIB, Sousa RMS, et al. Actividad antimutagénica e identificación de compuestos antioxidantes en la planta *Poincianella bracteosa* (Fabaceae). *Rev Biol Trop.* 2019 Dez; 67(6):1103-13. doi: 10.15517/rbt.v67i6.33883
40. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AS, Ayres LL. *BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas.* 5. ed. Belém (PA): Publicações Avulsas do Mamirauá; 2007.
41. Rocha RS, Kassuya CA, Formagio AS, Mauro MO, Andrade-Silva M, Monreal AC, et al. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. *Pharm Biol.* 2016 Abr;54(1):35-47. doi: 10.3109/13880209.2015.1014567
42. Silva de Sá I, Peron AP, Leimann FV, Bressan GN, Krum BN, Fachineto R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. *Food Chem Toxicol.* 2019 Mar;125:29-37. doi: 10.1016/j.fct.2018.12.037
43. Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2007 Set;17(3):444-7. doi: 10.1590/S0102-695X2007000300019
44. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório: acidentes ambientais: 2008. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; 2009. IBAMA–MMA. Report, 2.
45. Marnett LJ, Cohen SM, Fukushima S, Gooderham NJ, Hecht SS, Rietjens IM, et al. GRASr2 evaluation of aliphatic acyclic and alicyclic terpenoid tertiary alcohols and structurally related substances used as flavoring ingredients. *J Food Sci.* 2014 Abr;79(4):R428-41. doi: 10.1111/1750-3841.12407
46. Dias MS, do Vale Junior EP, Santos BCD, Martins FA, Almeida PM, Peron AP. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* L. *An Acad Bras Cienc.* 2021 Set;93(supl 3):e20201772. doi: 10.1590/0001-3765202120201772
47. Chakraborty R, Mukherjee AK, Mukherjee A. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the Allium test. *Environ Monit Assess.* 2009 Jun;153(1-4):351-7. doi: 10.1007/s10661-008-0361-z
48. Negreiros HA, de Moura KG, Barreto do Nascimento MLL, do Nascimento Rodrigues DC, Ferreir PMP, Braz DC, et al. Alpha-Terpineol as Antitumor Candidate in Pre-Clinical Studies. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021 Out;21(15):2023-31. doi: 10.2174/1871520621999210104195820
49. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic Biochem Physiol.* 2007 Jul;88(3):252-9. doi: 10.1016/j.pestbp.2006.12.003
50. Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.* 2009 Jul-Ago;682(1):71-81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
51. Bianchi J, Mantovani MS, Marin-Morales MA. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *J Environ Sci (China).* 2015 Out;36:102-11. doi: 10.1016/j.jes.2015.03.034
52. Almeida PM, Araújo SS, Santos IR, Marin-Morales MA, Benko-Iseppon AM, Santos AV, et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. *Genet Mol Res.* 2016 Fev;15(1):gmr7415. doi: 10.4238/gmr.15017415
53. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on the safety and efficacy of aliphatic, alicyclic and aromatic saturated and unsaturated tertiary alcohols and esters with esters containing tertiary alcohols ethers (chemical group 6) when used as flavourings for all animal species. *EFSA Journal.* 2012 Nov;10(11):2966. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2966