

Encontro anual de
INICIAÇÃO 
CIENTÍFICA DA UNESPAR

Estudo da citotoxicidade de extratos de folhas de mandioca em amendoim-bravo e soja.

Dieison André Moi (PIBIC-Fundação Araucária)
Unespar/Paranavaí, dieisonandrebv@outlook.com
Franciele Mara Lucca Zanardo Bohm (Orientador),
Unespar/Paranavaí, fzanardobohm@gmail.com

RESUMO: A mandioca e a soja tem grande importância econômica para a região de Paranavaí. Estudos prévios mostraram que extratos de folhas de mandioca inibem a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de tomate. Os objetivos deste trabalho foram identificar o potencial citotóxico de folhas de mandioca, através do teste Allium Cepa e identificar se extrato aquoso de folhas de mandioca pode interferir na germinação, no crescimento, na biomassa e na viabilidade celular de sementes de soja e amendoim-bravo. Amendoim-bravo é uma planta considerada indesejável em plantações, pois compete com as plantas cultivadas por espaço, luz, água e nutrientes, provocando perdas na produção vegetal. Extrato de folhas de mandioca foram preparados utilizando-se 10g de folhas secas maceradas em 100mL de água destilada, este constituiu o extrato 100% e depois este extrato foi diluído nas concentrações de 50% e 25%. Foi determinada a viabilidade celular utilizando corante azul de Evans e a leitura feita em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados do teste Allium cepa mostraram que o extrato de folha de mandioca foi citotóxico na concentração de 50%. Quanto à germinação as sementes de amendoim-bravo submetidas ao tratamento com extrato na concentração de 50% apresentou uma redução de 19%, e o tratamento na concentração 100% apresentou uma redução de 20% na germinação quando comparado ao controle, na concentração de 25% a redução foi de 5%, em soja ocorreu redução de 9% nas concentrações 25% e 100%. O extrato comprometeu o crescimento das radículas de amendoim-bravo nas concentrações de 50% e 100%, nas sementes de soja afetou o crescimento das radículas em todas as concentrações. O extrato comprometeu a biomassa fresca e seca das sementes de amendoim-bravo e soja. As sementes de amendoim-bravo submetidas aos tratamentos de 25% e 100% apresentaram maior morte celular. Nas sementes de soja a morte celular foi elevada no tratamento 100%. Portanto o extrato foliar de mandioca comprometeu a germinação, crescimento inicial e biomassa das plântulas, apresentando uma citotoxicidade maior na concentração de 50%. O extrato causa morte celular mais elevada nos tratamentos, quando comparados ao controle, principalmente na concentração de 100%.

Palavras-chave: Alelopatia. Citotóxico. Germinação.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade já se sabia que as plantas poderiam interferir no desenvolvimento de outras plantas. No século III a.C. Teofrasto recomendava que não se cultivasse a couve junto com a videira, pois os “odores” da primeira prejudicavam o desenvolvimento da segunda. Escritos da renascença já mencionavam a antipatia entre as plantas, autores da época afirmavam que o pepino cresce mal junto com a oliveira.

Na natureza, as plantas estão expostas aos diversos fatores bióticos e abióticos. A pressão exercida por estes fatores permitiu que, ao longo do processo evolutivo, elas

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

desenvolvessem numerosas rotas metabólicas de biossíntese. Isto as possibilitou desenvolver a capacidade de acumular e excretar uma variedade de compostos conhecidos como secundários. Primordialmente a denominação de composto secundário foi proposta quando ainda eram desconhecidas suas funções específicas.

Os mecanismos de ação dos aleloquímicos estão relacionados a processos fisiológicos na planta. No entanto, os efeitos desses compostos ainda não estão completamente esclarecidos. Uma das grandes dificuldades que se apresenta é que essas substâncias afetam mais de uma função e provocam efeitos secundários difíceis de distinguir dos principais. O efeito visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização retardada de mudanças anteriores que ocorreram a nível molecular e celular.

Atualmente mais de 45000 compostos secundários são conhecidos e o mecanismo de ação destes compostos ainda não foi todo elucidado, pois não existe um mecanismo de ação padrão para a atuação destes compostos. A literatura tem mostrado que os aleloquímicos atuam em nível de metabolismo celular, podendo ativar ou inibir enzimas ou interferir alterando a permeabilidade da membrana plasmática.

Para se estabelecer uma possível relação de alelopatia uma das principais variáveis analisadas nos testes com aleloquímicos é a germinação. Ela é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém a sua quantificação é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto germina ou não germina. Os testes de germinação são simples de serem realizados, no entanto há uma série de cuidados que devem ser tomados para que se possam ter respostas reproduzíveis.

Muitos estudos que envolvem a alelopatia são desenvolvidos baseando-se no tipo de plantas encontradas em determinada região, seja de ocorrência natural ou obtidas em culturas praticadas pelo homem. Segundo Souza (2003) na região de Botucatu, SP foi constatada uma redução no desenvolvimento inicial de mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) plantadas em antigas pastagens de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), experimentos conduzidos em casa de vegetação mostraram que houve redução na matéria seca, altura das plantas, teor de clorofila e área foliar.

Foi encontrado na Espanha que *Quercus robur* L. e *Acacia melanoxylon* geravam inibição de crescimento e desenvolvimento de alface, sendo o efeito alelopático devido principalmente a compostos fenólicos (Souto et al., 1994). A resteva (restos da cultura

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unesp

anterior) de trigo retardou o crescimento de plantas de algodão (Hicks et al., 1989) ou de arroz na rotação de culturas.

O aleloquímico cumárico, derivado da via dos fenilpropenoides inibe o crescimento e reduz o peso fresco e seco de plantas de milho, canola (Baleroni et al., 2000) e pepino (Politycka e Mielzarz, 2007).

Utilizando-se de células meristemáticas de *Allium cepa*, Chauan et al. (1999), estudaram o potencial clastogênico de Cypermethrim e Fenvalerate (pesticidas), sendo que os resultados obtidos pelo sistema teste de *Allium cepa* teve boa correlação com o sistema teste de mamíferos, indicando o uso deste sistema como uma alternativa para o monitoramento do potencial genotóxico de vários compostos químicos (Bagatini et al. 2007).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS,OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento in situ da genotoxicidade de substâncias ambientais (Cabrera; Rodriguez, 1999).

Fiskesjo (1993, 1994), ressaltou a importância e a utilidade de sistemas testes vegetal na avaliação de riscos de genotoxicidade e enfatizou que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos.

Entre todas as culturas, a mandioca (*Manihot esculenta*) é considerada a de mais alta produtividade de calorias e a de maior eficiência biológica como fonte de energia, além de apresentar boa adaptação a solos deficientes em nutrientes (Nassar, 2006). É uma planta nativa do Brasil e sua cadeia produtiva emprega cerca de dois milhões de pessoas (Silva, et al, 2012). Apesar de apresentar alto potencial produtivo, ocorre uma grande perda na produção devido à infestação desta cultura por plantas daninhas que são controladas de forma inadequada e assim comprometem o número de raízes e o peso destas. De acordo com Peressin & Carvalho (2002), os gastos com controle das plantas daninhas nos mandiocais representam aproximadamente 40% do custo de produção. Entre os efeitos decorrentes da presença de plantas daninhas, o sombreamento promovido pelas espécies que se desenvolvem mais rapidamente na fase inicial do crescimento da cultura parece ser o mais relevante (Cruz & Pelacani, 1993).

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

. O amendoim bravo encontrado com frequência em plantações no Paraná é uma das plantas daninhas que mais causa prejuízo para a agricultura. É uma das invasoras mais temidas pelos produtores, em função da dificuldade de controle, sendo frequente em todo o país. Ele compromete o desenvolvimento de culturas como de citros, mandioca, soja, milho, algodão, arroz, trigo entre outras. Suas sementes germinam durante o período quente do ano, emergindo de até 12 cm de profundidade e mantendo a viabilidade germinativa por vários anos, mesmo quando enterradas. Na região de Paranavaí o cultivo de mandioca constitui uma fonte de renda importante para muitos agricultores e tanto o capim braquiária como o amendoim bravo são plantas daninhas que interferem nesta cultura.

Estudos feitos na Bahia, utilizando cultivo de laranja *Citrus sinensis* (L), mostraram que plantas silvestres produzem substâncias que podem ser utilizadas como herbicidas naturais no controle de plantas daninhas que interferem nesta cultura (Dias e Carvalho, 2010). Silva e Áquila (2006) demonstraram que extratos foliares de *Cecropia pachystachya* Trec. (Urticaceae), *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Fabaceae), *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltldl (Rubiaceae), *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax (Euphorbiaceae) e *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg., Lanj. & Boer (Moraceae), atrasaram a germinação de aquênios e crescimento das plântulas de alface, demonstrando o potencial alelopático.

No Brasil, assim como em outros países a utilização de herbicidas é muito grande o que gera altos custos na produção além da permanência de resíduos destas substâncias no ambiente e nas plantas, contaminando os alimentos e comprometendo sua qualidade. Estudos recentes mostram que agrotóxicos podem permanecer nos alimentos e seu consumo pode desencadear doenças como neoplasias (Ribeiro; Salvadori; Marques, 2003).

A necessidade crescente de substituição de insumos químicos sintéticos nos agroecossistemas por materiais produzidos naturalmente motiva pesquisas aplicadas à alelopatia, uma vez que os benefícios da pesquisa alelopática podem contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção e a conservação da vegetação natural ou seminatural (Smith & Martin 1994, Macías et al. 1998, Chou 1999, Olofsdotter & Mallik 2001, Chou 2006). Por outro lado, substâncias vegetais com atividade alelopática representam futuro promissor para a obtenção de novos materiais, cuja molécula possa ser sintetizada e comercializada em larga escala.

Os compostos alelopáticos surgem como uma alternativa para o controle de plantas

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

daninhas e mais estudos são necessários para que estes compostos possam ser empregados na agricultura.

Sabendo-se que as folhas de mandioca não são utilizadas comercialmente e são consideradas muitas vezes restos da produção surge à possibilidade da realização de testes de germinação, crescimento e citotoxicidade de extratos obtidos destas folhas para controlar espécies de plantas daninhas que interferem no desenvolvimento de culturas do noroeste do Paraná.

OBJETIVOS

Estudar os efeitos dos tratamentos com extratos de folhas de mandioca em sementes de soja, braquiária e amendoim-bravo e determinar se estes extratos podem comprometer a germinação e crescimento inicial das plântulas, visando uma possível utilização destes extratos como herbicidas naturais. Este estudo foi feito através da análise de:

Porcentagem de germinação das espécies testadas;

Crescimento inicial das plântulas;

Determinação da viabilidade celular;

Avaliação do potencial citotóxico através da aplicação do teste do *Allium cepa*.

METODOLOGIA

Sementes de soja e amendoim-bravo foram obtidas comercialmente e esterilizadas em hipoclorito de sódio a 2% durante dois minutos e lavadas em seguida em água destilada. Separadamente de acordo com a espécie as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo duas folhas de papel de germinação umedecidas em água destilada, que representou o grupo controle. Os extratos de folhas utilizados foram preparados a partir do método de maceração no qual foram adicionados 50 mL de água destilada para cada 10 g de biomassa seca de folhas de mandioca (Silva e Áquila, 2006). Posteriormente, os extratos foram filtrados, seguindo-se centrifugação à 1308xg por 10 minutos, sendo os sobrenadantes utilizados diretamente nos bioensaios, que corresponderá ao extrato 100%, este extrato também foi diluído para testes nas concentrações de 50% e 25%. Para avaliar o efeito dos extratos sobre a germinação das sementes a exposição foi de 96 horas para a soja e de 10 dias para a braquiária e amendoim-bravo, com contagem de sementes germinadas a cada 24 horas. Considera-se a ocorrência de germinação a protrusão da radícula (Ferreira e Áquila, 2000).

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

Após o experimento de germinação com auxílio de régua milimetrada, foram medidos os comprimentos das raízes de todas as plântulas, de cada repetição e os resultados foram expressos em centímetros. Raízes de plântulas germinadas nas condições já descritas foram colocadas em solução de Azul de Evans 0,25% durante 15 minutos. Em seguida as raízes foram colocadas em placas de Petri contendo água destilada durante 30 minutos. Foi cortado 1 cm da extremidade e transferido para ependorff contendo 1ml de dimetilformamida durante 50 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 600 nm. Bulbos de cebola de tamanho médio foram obtidos comercialmente e submetidos ao teste do *Allium cepa*. Os bulbos foram lavados em água corrente e escarificados. Os bulbos controles permaneceram em água destilada em temperatura ambiente, enquanto os bulbos tratados ficaram inicialmente cinco dias em água e depois foram separados em dois grupos, o primeiro permaneceu 48h em contato com o extrato de mandioca e mais 24h em água destilada para recuperação. O segundo grupo permaneceu no extrato sem a recuperação. Após este período as raízes foram lavadas, cortadas e medidas para a avaliação da toxicidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho é possível verificar que o extrato de folha de mandioca nas concentrações de 25%, 50% e 100% foram capazes de comprometer o desenvolvimento inicial de amendoim-bravo e soja. Nas sementes de amendoim-bravo o extrato nas concentrações de 50% e 100% apresentou redução considerável no número de sementes germinadas, afetando também o comprimento das radículas e as biomassas fresca e seca. Já nas sementes de soja os extratos nas concentrações de 25%, 50% e 100% afetaram o comprimento das radículas. Quanto à citotoxicidade das folhas de mandioca verificou-se que o extrato é mais tóxico na concentração de 50% apresentando uma redução no comprimento da radícula da cebola de 39% quando comparado ao controle, e na recuperação não obteve melhora, já nas concentrações de 25% e 100% não houve redução significativa, na concentração 25% a redução foi de 13% e na concentração de 100% não houve redução do comprimento quando comparados ao controle. A análise de viabilidade celular mostrou que o extrato na concentração 100% apresentou morte celular significativa quando comparado ao controle e foi maior para o amendoim-bravo. Bazimarakenga et al. (1995) relataram que ácidos fenólicos diminuíram o número de grupos sulfidril em raízes de soja, sugerindo que

**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

tal depleção pode inativar enzimas (ATPases) como as proteínas de transporte. Tais alterações comprometeriam a permeabilidade das membranas plasmáticas. Sabe-se que compostos químicos da folha de mandioca é capaz de inibir a germinação e o crescimento inicial de amendoim bravo e soja como mostrado neste trabalho, entretanto os compostos químicos presentes na folha de mandioca são pouco estudados.

Tabela 1- Comprimento, biomassas fresca, biomassa seca e viabilidade celular de sementes de amendoim-bravo e soja submetidas ao tratamento com extratos de folhas de mandioca, nas concentrações de 25%, 50% e 100% extrato.

Soja	Comprimento em (cm)	Biomassa Fresca (g)	Biomassa Seca (g)	Viabilidade Celular
Controle	4,86±0,45 a n=15	1,8216 n=20	0,1879 n=20	0,340nm
Folhas 25%	2,91±0,15 b n=15	1,0521 n=20	0,1308 n=20	0,311nm
Folhas 50%	2,98±0,20 b n=15	0,7650 n=20	0,0822 n=20	0,333nm
Folhas 100%	1,92±0,16 c n=15	0,7370 n=20	0,0938 n= 20	1,960nm
Amendoim-bravo				
Controle	10,70±0,14 a n=20	1,076 n=20	0,033 n=20	0,353nm
Folhas 25%	11,4±0,16 a n=20	1,076 n=20	0,0139 n=12	0,429nm
Folhas 50%	5,62±0,61 b n=20	0,447 n=20	0,024 n=20	0,304nm
Folhas 100%	2,91±0,18 c n=20	0,176 n=20	0,015 n=20	0,811nm

*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Bonferroni. As comparações foram feitas entre indivíduos de mesma espécie.

Encontro Anual de Iniciação Científica da Unespar

Figura 1- Gráfico de porcentagem de germinação de sementes de amendoim-bravo e soja submetidos aos tratamentos com extratos de folhas de mandioca.

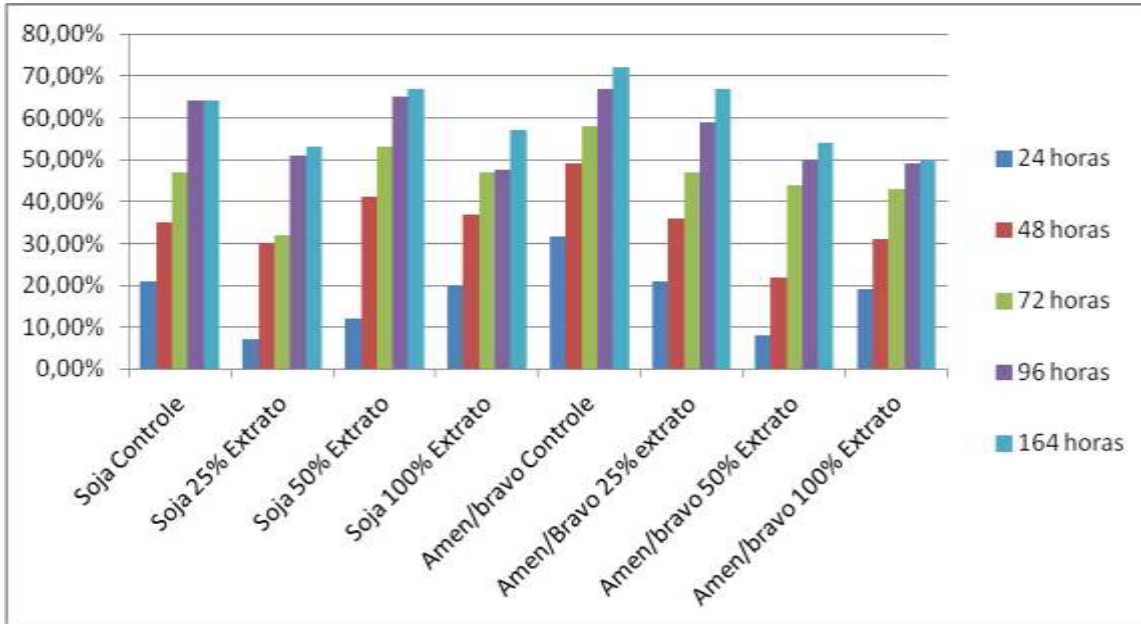
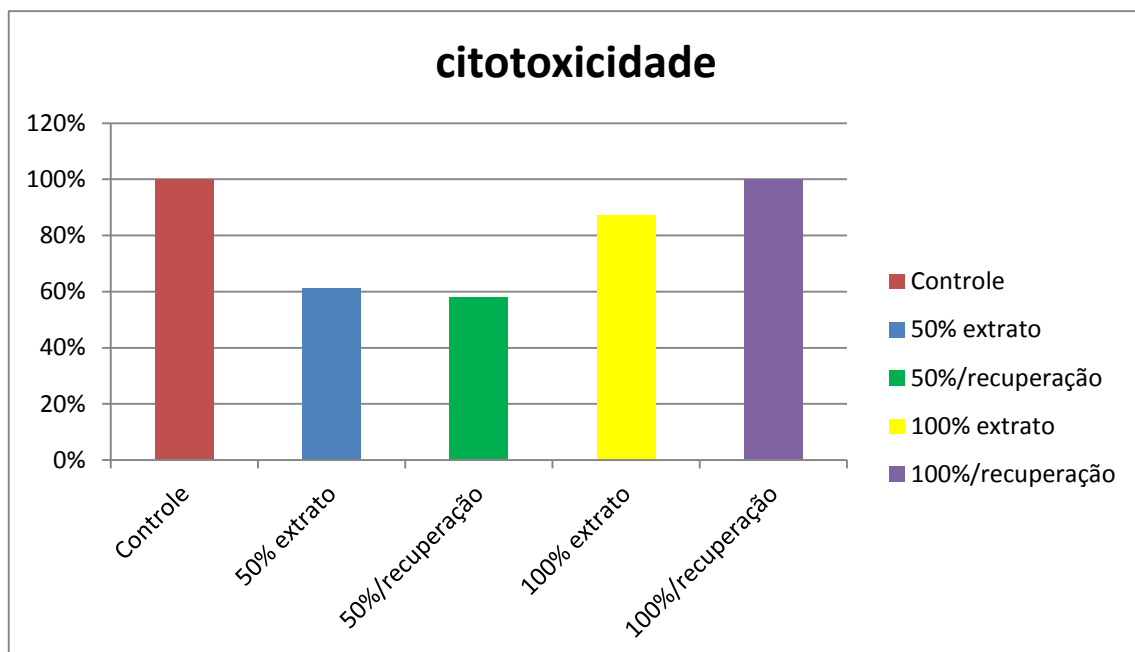


Figura 2- Gráfico de citotoxicidade de extrato de folhas de mandioca nas concentrações de 50% e 100% ambos com recuperação, sobre raízes de cebola. O comprimento das raízes de controle é considerado 100% para a construção do gráfico.



**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de folhas de mandioca comprometeu a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de amendoim-bravo e soja, principalmente na concentração de 100% apresentando diminuição no número de sementes germinadas, diminuição na média de crescimento das radículas, diminuição na biomassa fresca e na biomassa seca, e morte celular elevada, quando em comparação com o controle. Quanto à citotoxicidade do extrato, esta foi maior na concentração de 50%, não apresentando melhora na recuperação. Portanto extratos de folhas de mandioca podem ser testados no campo para estudo como potencial herbicida natural.

REFERÊNCIAS

- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. P.; TEDESCO, S. B. The use of *Allium cepa* test as a bioindicator of genotoxicity of medicinal plants infusions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BALERONI, C. R. S. FERRARESE, M. L. L. BRACCINI, A. L. SCAPIM, C. A., FERRARESE-FILHO, O. Effects of ferulic and p-coumaric acids on canola (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401) seed germination. **Seed Science and Technology**, 28:201-207, 2000.
- CABRERA G.L, RODRIGUEZ D.M.G.Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Res** 426: 211-214, 1999
- CHAUHAN LKS, SAXENA PN, Gupta SK 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *Allium cepa*. **Environ Exp Bot** 42: 181-189.
- CRUZ, J. L.; PELACANI, R. Fisiologia da mandioca. In: **CURSO NACIONAL DE MANDIOCA**, 8, Cruz das Almas. Anais... Cruz das Almas: Embrapa/CNPMF, 1993. 38p.
- DIAS, C. B.; CARVALHO, E. B. Uso da alelopatia como método de controle de plantas infestantes na cultura dos citros em substituição a herbicidas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado técnico, 97), 6p. 2010.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 175-204, 2000. Edição especial.
- FISKESJO, G. The *Allium* test. In: wastewater monitoring. **Environ Toxicol Water Qual** 8: 291-298, 1993
- FISKESJO, G. 1994. The *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Toxicol Water Qual** 9: 234-241, 1994.

**Encontro Anual de Iniciação Científica
da Unespar**

HICKS, S.K.; WENDT, C.W.; GANNAWAY, J.R. & BAKER, R.B. Allelopathic effects of wheat straw on cotton germination, emergence and yield. **Crop Science**, 29:1057-1061, 1989.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: opção contra a fome. Estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ci. Hoje**, v. 39, n. 231, p. 30-36, 2006.

PERESSIN, V. A.; CARVALHO, J. E. B. Manejo integrado de plantas daninhas em mandioca. In: Marney Pascoli Cereda. (Org.). **Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill. v. 2, p. 302-349, 2002.

PERON, A. P; Marcos, M.C; Cardoso, S.C.; Vicentini, V.E.P. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* vahl em sistema teste vegetal . [Arq. ciências saúde UNIPAR](#);12(1):51-54, jan.-abr. 2008.

POLITYCKA, B. MIELCARZ, B. Involvement of othylene in growth inhibition of cucumber roots by ferulic and p-coumaric acids. **Allelopathy Journal**. 19, 451-460, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Genética do Câncer humano. In: _____ **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. Cap. 2, p. 29-48.

SILVA, D.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; FRANÇA, A.C.; SEDIYAMA, T. Manejo de plantas daninhas da cultura de mandioca. **Planta Daninha**. vol.30 no.4 Viçosa Oct./Dec. 2012.

SOUTO, X.C.; GONZALEZ, L. & REIGOSA, M.J. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (NW. Spain). **Journal of Chemical Ecology**, 20:3005-3015, 1994.

SOUZA, L. S. VELINI, E.D. MAIOMONE-RODELLA, R.C.S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.3, p. 343-354, 2003.