

EFEITO DO ÓLEO DE PINHÃO - MANSO (*Jatropha curcas*) NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR DE *Lactuca sativa*

Carolina Mastella Botelho¹, Milene Miranda Praça Fontes², Marcel José Palmieri³, Bruno Galvêa Laviola⁴, Larissa Fonseca Andrade Vieira⁵

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Alegre – ES, Brasil, carol-cmb@hotmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal, Alegre – ES, Brasil, milenemiranda@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras – MG, Brasil, marcelpalmieri@yahoo.com.br

⁴Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, bruno.laviola@embrapa.br

⁵Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal, Alegre – ES, Brasil, larissa_lavras@yahoo.com.br

Resumo- *Jatropha curcas* L. tem ganhado notável atenção devido ao grande potencial como matéria-prima para produção de biodiesel. Contudo, o óleo extraído das sementes apresenta componentes tóxicos, como curcina e ésteres de forbol, o que compromete o aproveitamento da torta como ração animal ou adubo orgânico. Logo, o trabalho, teve por objetivo avaliar o efeito do óleo de pinhão manso na germinação e crescimento radicular de *Lactuca sativa* (alface) – modelo de vegetal para bioensaios citogenéticos. Verificaram-se as germinações das sementes em intervalos de 8h, até um total de 48 h de exposição. Depois de decorridas estas horas, o crescimento das raízes foi medido. Os dados obtidos confirmaram a toxicidade do óleo de pinhão manso da variedade estudada, uma vez que se observou o decréscimo das médias de germinação e crescimento radicular com o aumento da concentração das emulsões preparadas para tratamento das sementes.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L., bioensaio vegetal,
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Óleos vegetais, além de serem um produto alimentar, são importantes como recurso renovável para o combustível e indústrias químicas (DYER; MULLEN, 2008; ANDREW, 2009). Durante os últimos anos, *Jatropha curcas* L., popularmente conhecido como pinhão-manso, ganhou atenção considerável como matéria-prima potencial de biodiesel e muitas plantações de pinhão-manso foram estabelecidas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (LI et al., 2010). O pinhão-manso é considerado como uma “fábrica” de óleo com vários atributos, usos e potencial considerável (OPENSHAW, 2000). Possui características peculiares como tolerância à seca, crescimento rápido, fácil propagação (HELLER, 1996), maior teor de óleo do que outras culturas (ACHTEN et al., 2008), pequeno período de gestação, adaptação para uma ampla gama de condições ambientais, tamanho ideal da planta e sua arquitetura (que fazem a coleta de sementes mais conveniente) (SUJATHA et al., 2008).

Muitos trabalhos têm sugerido que a torta de sementes de pinhão-manso pode ser usada como

ração animal, o que geraria importante renda e viabilizaria economicamente a cultura. A torta, no entanto, possui diversos compostos tóxicos, como a curcina e ésteres de forbol, sendo este considerado o principal componente tóxico. Tal a sua importância, que quando não estão presentes nas sementes, a “variedade” passa a ser chamada de não-tóxica, embora os outros fatores tóxicos continuem presentes (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Outra aplicação para a torta seria como fertilizante orgânico, porém, pesquisas sobre o destino de ésteres de forbol no ambiente e seu impacto na ecologia do solo ainda são necessárias (KING et al., 2009).

Não há relatos da existência de variedades não-tóxicas no Brasil, havendo registros em apenas uma região do México (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Diversos estudos vêm sendo realizados diretamente em animais, com intuito de verificar variedades tóxicas, suas respectivas doses tóxicas e a eficiência da destoxificação (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Neste contexto, considerando diferentes técnicas para investigação de toxicidade, o bioensaio citogenético mostra-se como uma importante ferramenta para identificar os efeitos de

substâncias em nível de cromossomo e também sobre o ciclo celular (CAMPOS et al., 2008; DRAGOEVA et al., 2008). Dentre os vários métodos de avaliação, testes que usam raízes de plantas são extremamente úteis em ensaios biológicos, sendo relativamente baratos e de fácil manuseio. Em adição, ensaios citotóxicos em plantas têm uma boa correlação com testes em sistemas de mamíferos (SOUSA, SILVA E VICCINI, 2009). Ainda, de acordo com Campos et al. (2008), um bom número de sementes, uma boa superfície de contato com o extrato, a alta sensibilidade e cromossomos grandes de *Lactuca sativa* (alface) faz desta planta muito útil para análises citogenéticas.

Diante do exposto, este trabalho faz parte de uma iniciativa da UFES em parceria com a Embrapa Agroenergia, que objetiva verificar a eficiência de bioensaios vegetais para avaliar a toxicidade do óleo de diferentes variedades do pinhão-mansão. Neste sentido, o intuito do trabalho foi verificar a ação do óleo de pinhão-mansão na germinação e no crescimento radicular do modelo vegetal *Lactuca sativa*.

Metodologia

Para determinar as concentrações com efeito tóxico do óleo de pinhão-mansão, fornecido pela Embrapa Agroenergia, foram realizadas avaliações de germinação e crescimento radicular em raízes de *Lactuca sativa* (alface), variedade comercial Grandes Lagos Americana (Isla Sementes). Esta avaliação macroscópica consistiu no teste de germinação e crescimento radicular, com finalidade de obter uma curva de crescimento radicular em função da concentração de óleo aplicado. Para tanto, as sementes de alface foram tratadas com sete emulsões de água e óleo (veementemente agitadas) em diferentes concentrações (5%, 20%, 35%, 50%, 65%, 80% e 100%) e com água destilada (controle negativo – 0%), perfazendo um total de oito tratamentos. O experimento foi montado em DBC, sendo composto por três blocos. Cada bloco composto por 3 placas de Petri de cada tratamento. As placas continham papel de germinação, com 50 sementes e estas foram tratadas com aproximadamente 5 mL de emulsão cada, cobertas com papel alumínio e mantidas em câmara de germinação (B.O.D.) a 24 ± 2 °C durante 48 h. Cada prateleira da B.O.D. representou um bloco experimental. O índice de germinação foi obtido após 8, 16, 24, 32, 40 e 48h de tratamento. Após estas 48 h, o comprimento das raízes emitidas por cada semente de cada placa de Petri de cada tratamento foi avaliada com auxílio de um paquímetro digital. A média de crescimento das raízes submetidas a cada

tratamento foi obtida e o gráfico da curva de crescimento x concentração de óleo foi plotado.

Para todos os parâmetros avaliados foi feita análise de variância e teste de média (Skott Knott a 5% de probabilidade) a fim de comparar os tratamentos avaliados com o controle.

Resultados

As médias da porcentagem de sementes germinadas e do crescimento radicular observadas em cada tratamento estão apresentadas na Tabela 1. A porcentagem de germinação decresceu à medida que a concentração do óleo de pinhão-mansão na emulsão aumentou. Os tratamentos de 35%, 50%, 65%, 80% e 100% apresentaram diferença significativa do controle (0%), sendo que o tratamento de concentração igual a 100% de óleo inibiu totalmente a germinação.

De modo geral, um comportamento similar foi observado na média de crescimento das raízes, tendo ocorrido diminuição nesta, de acordo com o aumento das concentrações de óleo. Contudo, na análise de crescimento radicular, os tratamentos demonstraram uma redução significativa já a partir da menor concentração aplicada, 5%, se comparados ao controle.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação e crescimento radicular de sementes de alface após tratamentos com diferentes concentrações de óleo de pinhão-mansão

| Tratamento | Germinação (%) | Crescimento (mm) |
|------------|----------------|------------------|
| Controle | 96,13 | 9,23 |
| 5% óleo | 93,3 | 7,60* |
| 20% óleo | 86,27 | 5,96* |
| 35% óleo | 69,13* | 5,57* |
| 50% óleo | 68,67* | 5,11* |
| 65% óleo | 31,13* | 1,95* |
| 80% óleo | 19,17* | 1,76* |
| 100% óleo | 0,00* | 0,00* |

As médias seguidas de (*) são significativamente diferentes do controle ($p < 0.05$) de acordo com o teste Skott Knott.

A relação entre concentração e inibição do crescimento radicular pode ser observada na Figura 1.

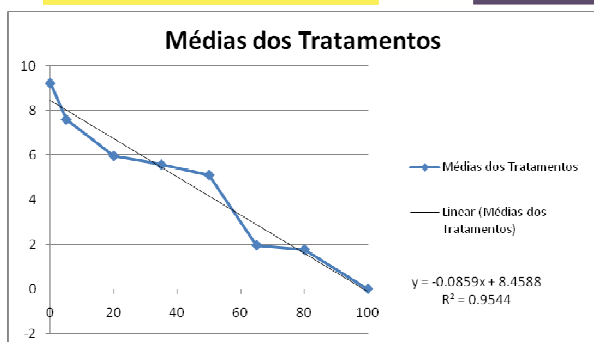


Figura 1 – Curva de crescimento radicular e regressão linear obtidas a partir do tratamento de sementes de alface com óleo de pinhão-mansão. O eixo x representa as concentrações de óleo e o y o tamanho das raízes.

A curva ilustra parâmetros importantes que podem ser estimados, como por exemplo, o limiar de inibição, que é a menor concentração necessária para se ter uma inibição observável. Como citada, tal concentração foi a de 5%. Outro parâmetro importante que pode ser observado é a determinação do IC_{50} , que é a menor concentração necessária para obter 50% de inibição. Através da equação de regressão ($y = -0,0859x + 8,4588$), calculada a partir das observações apresentadas na tabela 1, observa-se que a concentração IC_{50} é 44,57%.

Discussão

Os bioensaios realizados neste estudo mostraram que o óleo extraído das sementes de pinhão-mansão afeta o desenvolvimento radicular e a germinação de sementes de alface. A inibição da germinação e redução da taxa de crescimento das raízes podem ser atribuídas às atividades biológicas tóxicas desencadeadas pelos ésteres de forbol.

Ésteres de forbol são produzidos por outras espécies vegetais dentro da Euphorbiaceae, especialmente espécies pertencentes a as subfamílias Crotonoideae e Euphorbioideae (BEUTLER et al., 1989) e são considerados os principais componentes tóxicos presentes no pinhão-mansão, uma vez que quando ausentes a variedade é dita não tóxica (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Os ésteres de forbol são lipossolúveis e extraídos juntamente com o óleo na dose de 0,3 a 0,6 mL. Assim, tanto a inibição e redução da germinação como a redução no tamanho das raízes pode ser explicada pela toxicidade do éster de forbol observada nas altas concentrações de óleo nas emulsões preparadas para tratamento. Além disso, a diminuição do crescimento radicular está intimamente relacionada com a redução do índice mitótico

(CAMPOS et al. 2008; ANDRADE et al., 2010). O índice mitótico reflete o percentual de células em divisão e sabe-se que os ésteres de forbol são análogos ao diacilglicerol, um ativador das muitas isoformas da proteína quinase - C (PKC) (ZHANG, et al., 1995; ANDREW et al., 2009). PKCs atuam como reguladoras de muitos processos celulares, incluindo a transição de fases dentro do ciclo celular. Como o diacilglicerol tem uma meia-vida curta na célula, a ativação da PKC normalmente só é transitória. Ativação da PKC por ésteres de forbol, no entanto, é muito mais prolongada (GRINER; KAZANIETZ, 2007; ANDREW et al., 2009), e isso leva a uma série de atividades biológicas, podendo estar associado a redução do índice mitótico (efeito mitodepressivo).

A atividade tóxica do óleo e da torta do pinhão-mansão é devido à presença da curcuma e dos ésteres de forbol nos grãos (MACIEL; MACHADO, 2007; MACIEL et al., 2009). Os testes de toxicidade são realizados com diversos animais como bovinos, caprinos, peixes, entre outros. A toxidez da torta é comprovada uma vez que as doses fornecidas aos animais os levou a morte. Neste sentido este é o primeiro trabalho que utiliza bioensaio vegetal para testar a toxicidade do óleo de pinhão-mansão. Os resultados apresentados mostraram de forma bastante satisfatória, que este tipo de ensaio pode ser empregado como uma ferramenta útil e barata para testar a toxicidade do óleo extraído das sementes de pinhão-mansão e ainda a eficiência de processos de destruição de componentes tóxicos na torta.

Ensaios citogenéticos estão sendo conduzidos para verificar alterações no DNA e explicar os mecanismos citotóxicos e genotóxicos de ação desses compostos presentes no óleo.

Conclusão

Neste estudo, a toxicidade do óleo de pinhão-mansão foi comprovada. O teste com *Lactuca sativa* provou ser sensível para a análise proposta, o que representa um modelo eficiente para detectar toxicidade do óleo de pinhão-mansão gerado na produção de biodiesel. Os testes aplicados mostraram-se recorrentes, sendo importantes, inclusive na comprovação de qualidade da destoxificação e determinação de doses tóxicas, evitando que animais sejam diretamente expostos a esse tipo de teste, levando-os à morte.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e a FAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- ABHILASH, P.C., et al. Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environ Sci Pollut Res.** 18, p.127-131, 2010.
- ACHTEN, W.M.J., et al. *Jatropha* biodiesel production and use. **Biomass Bioenergy.** 32, p. 1063-1084, 2008.
- ANDRADE, L.F.; DAVIDE, L.C.; GEDRAITE, L.S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, p. 706-710, 2010.
- ANDREW, J.K., et al. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **J. of Exp. Environ. Botany** 60, p.1-9, 2009.
- BEUTLER J.A., et al. Distribution of phorbol ester bioactivity in the **Euphorbiaceae**. **Phytotherapy Research** 3, p. 188-192, 1989.
- CAMPOS, J.M.S., et al. Mutagenic effects due allelopathic action of fern (*Gleicheniaceae*) extracts. **Allelopath J.** 22, p. 143-152, 2008.
- DRAGOEVA, A.P.; NANOVA, Z.D.; KALCHEVA, V.K. Allelopathic activity of micropropagated *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* and its effect on mitotic activity. **Allelopath J.** 22, p. 131-142, 2008.
- DYER, J.M.; MULLEN, R.T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. **Physiologia Plantarum** 132, p. 11-22, 2008
- FELIX, S. P., et al. Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. **Peptides**, New York, v. 29, p. 497-504, 2008.
- GRINER E.M., Kazanietz M.G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature Reviews Cancer** 7, p. 281-294, 2007.
- HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservations and use of underutilized and neglected crops. Dissertação (PhD) – Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. p. 66, 1996.
- KING, A.J., et al. Potential of *Jatropha curcas* as source of renewable oil and animal feed. **J. Exp. Environ. Botany** 60, p. 2897-2905, 2009.
- LI, Z., et al. System approach for evaluating the potential yield and plantation of *Jatropha curcas* L. on a global scale. **Environ Sci Technol.** 44, p. 2204-2209, 2010.
- MACIEL, F. M., et al. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seed and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, New York, v. 30, n.12, p. 2103-2107, 2009.
- MACIEL, F. M.; MACHADO, O. L. T. Avaliação do potencial alergênico de sementes de *Jatropha curcas* L., pinhão-mansão. In: II CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. Livro de resumos. Brasília, DF: MCT: ABIPTI, 2007.
- MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso Potencial e Toxidez da Torta de Pinhão-mansão. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 1). Disponível em: <http://www.cnpae.embrapa.br/publicacoes-para-download/ct_01.pdf/view>. Acesso em: 15 jun. 2011.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass Bioenergy.** 19, p.1-15, 2000.
- SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; VICCINI, L.F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82(2): p. 305-311, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aabc/v82n2/06.pdf>> Acesso em: 9 jan. 2011.
- STIRPE, F., et al. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas* toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochemistry Journal**, v. 156, n. 1, p. 1-6, 1976.
- SUJATHA M.; REDDY, T.P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnol Adv.** 26, p. 424-435, 2008.
- ZHANG G., et al. Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase Cd in complex with phorbol ester. **Cell** 81, p. 917-924, 1995.