

MORFOMETRIA DIGITAL COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DA EMBEBIÇÃO DE SEMENTES EM BIOENSAIO DE FITOTOXICIDADE

Arthur Arnoni Occhiutto¹
Marina de Lima Nogueira²
Andressa Alice Paulino de Góis³
Thaina Menegheti Nehme⁴
Geraldo Alves da Silva⁵
Sandro Barbosa⁶

Tecnologia Ambiental

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito de extratos aquosos obtidos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* na germinação de sementes de *Bidens pilosa* L. por meio de análises morfométricas de sua expansão por embebição, introduzindo as ferramentas digitais como instrumento adicional de análise. Os bioensaios foram conduzidos em placas de Petri contendo duas folhas de papel Germitest umedecidos com 3mL de solução, nas concentrações 5, 10, 20, 40 mg/ mL⁻¹ e água destilada como controle (0%). Foram utilizadas 30 sementes de *B. pilosa* por tratamento, sendo o delineamento experimento inteiramente casualizado com 3 repetições. As placas foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas. No 8º dia de condução experimental as placas contendo as sementes foram fotografadas e as imagens digitalizadas. A morfometria das sementes foi realizada utilizando-se o software ImageJ por via relativa, comparando item previamente dimensionado com as sementes nas imagens digitalizadas. De modo geral, as sementes de *B. pilosa* têm seu pico de germinação 5 dias após a embebição, e isso foi observado no controle negativo, contudo aquelas expostas aos tratamentos não germinaram com a mesma eficiência. Porém, o processo de embebição foi congruente a literatura. Conclui-se que a expansão das sementes por embebição expostas aos extratos aquosos de *Campomanesia* é concentração dependente, e que as ferramentas digitais de avaliação utilizadas foram adequadas para avaliar esse processo, demonstrando dessa forma o potencial de ação desses extratos sobre a morfometria do bioteste.

Palavras-chave: Bioensaio vegetal; Extrato vegetal; Alelopatia.

¹Graduando em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Alfenas, arthur.occhiutto@sou.unifal-mg.edu.br

²Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), marinanogueira@usp.br

³Graduando em Farmácia - Universidade Federal de Alfenas, andressa.gois@sou.unifal-mg.edu.br

⁴Graduanda em Biotecnologia - Universidade Federal de Alfenas, thaina.nehme@sou.unifal-mg.edu.br

⁵Professor da Universidade Federal de Alfenas - ICN, geraldo.silva@unifal-mg.edu.br

⁶Professor da Universidade Federal de Alfenas - ICN, sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br



INTRODUÇÃO

Em tempos onde as pautas ambientais e de conservação dos ecossistemas tem palco internacional e trazem consigo a urgência na descoberta de alternativas, há um crescente interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos e tecnologias que mantenham a eficiência de seus propósitos e possam ter impactos ambientais diminutos em comparação aos atualmente utilizados. Nesse contexto os produtores agrícolas enfrentam uma dificuldade ainda maior pois a intoxicação crônica do solo pela aplicação de herbicidas (GEIGER, 2010) pode acarretar consequências indesejadas tanto para a produção agrícola em si, quanto para a manutenção da área cultivável sendo enfática a necessidade de pesquisa em herbicidas naturais menos danosos ao ecossistema local em especial ao solo de plantio.

A espécie *Bidens pilosa* L. pertence à família Asteraceae de acordo com a classificação do Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV), é conhecida por mais de 15 nomes populares no território brasileiro e na literatura especializada é reconhecida por mais de 10 sinonímias (BRASIL, 2017). As sementes possuem tamanho variável de cor escura fosca e são bastante reconhecidas por suas duas ou três aristas na parte apical que facilitam a dispersão epizoocórica característica da planta. Entretanto, ainda há lacunas em estudos acadêmicos sobre a utilização de suas sementes, tanto em programas que utilizam a espécie como planta medicinal quanto naqueles que a usam como planta-teste para ensaios de inibição de germinação e crescimento de plantas daninhas, por aleloquímicos. *B. pilosa* tem sido amplamente utilizado em experimentos de estudos de alelopatia e fitotoxicidade como os trabalhos realizados por Barbosa *et al.* (2018), Gindri *et al.* (2020), Ribeiro *et al.* (2020) e tantos outros. Contudo, nestes trabalhos não há uma abordagem sobre o uso de ferramentas digitais que possam corroborar com a avaliação da embebição das sementes expostas às soluções toxicantes em bioensaios de fitotoxicidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos aquosos obtidos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* na germinação de sementes de *Bidens pilosa* L. por meio de análises morfométricas de sua expansão por embebição utilizando o software de distribuição livre ImageJ para a mensuração relativa.

METODOLOGIA

A obtenção dos extratos secos foi feita a partir de matéria-prima vegetal submetida à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (Solab® SL 102) à 45-50°C até peso constante. Em seguida a droga vegetal passou por divisão grosseira, pulverização em moinho de facas (Cienlab® CE 430). Com a granulometria determinada através do agitador de tamis (Bertel B) o material foi submetido a decocção, utilizando água como solvente em proporção de 20% (m/v) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 2008). A solução resultante foi congelada em ultrafreezer e através da secagem por liofilização (LIOTOP® Liofilizador L101) em condições de pressão a 380 mmHg e temperatura de -50°C por 72 horas até a obtenção do extrato seco, que foi acondicionado até o momento do experimento em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração de até 10°C.

A análise morfométrica da variação da área média de sementes de *Bidens pilosa* L. foram feitas a partir de câmera digital fixada com fundo neutro e sucederam do bioteste conduzido em placas de Petri contendo duas folhas de papel germitest com 3 mL de solução em 4 diferentes concentrações de extratos aquosos de *Campomanesia xanthocarpa* (5, 10, 20, 40 mg/mL⁻¹) e água destilada foi usada como controle negativo. Em cada placa foram utilizadas 30 sementes de *B. pilosa* L. que foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (ADEGAS; VOLL, 2003; com adaptações). As placas foram distribuídas aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado variando as repetições e concentrações.

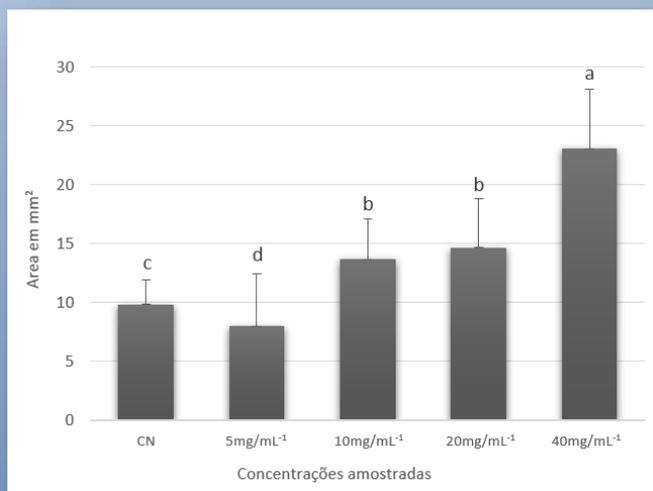
Para a análise das imagens foi utilizado a distribuição Fiji do software ImageJ tomando como referência relativa o tamanho das etiquetas e da placa de petri para determinar o valor de calibração (1cm-200px) utilizados para aferir os eixos (comprimento e largura) das sementes. Os dados resultantes foram salvos em tabelas .csv e importadas no Rstudio para o cálculo da área (em mm²), das médias, medidas estatísticas (teste de Tukey e Kruskal-wallis) e desvio padrão utilizados na discussão dos resultados e na plotagem dos gráficos.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bioteste mostrou um aumento significativo e gradativo na área média das sementes de *Bidens pilosa* L. expostas às diferentes concentrações do extrato foliar de *Campomanesia xanthocarpa* (Figura 1). Entre as sementes expostas as concentrações de 10 e 20 mg/ mL⁻¹ não foram encontradas diferenças significativa, em relação as concentrações de 5 mg/ mL⁻¹ assim como as expostas as concentrações de 10 e 20 mg/ mL⁻¹ foi observado que a área das sementes calculadas a partir das medidas de altura e largura obtiveram em média de 10 mm² menor (concentração 5 mg/mL⁻¹) e de 7 mm² (no caso das outras duas) em relação a concentração 40 mg/mL⁻¹.

Figura 1: Área em mm² das sementes de *B. pilosa* L. expostas às diferentes concentrações de extrato aquoso de *C. xanthocarpa*. As letras são referentes ao teste de Tukey.



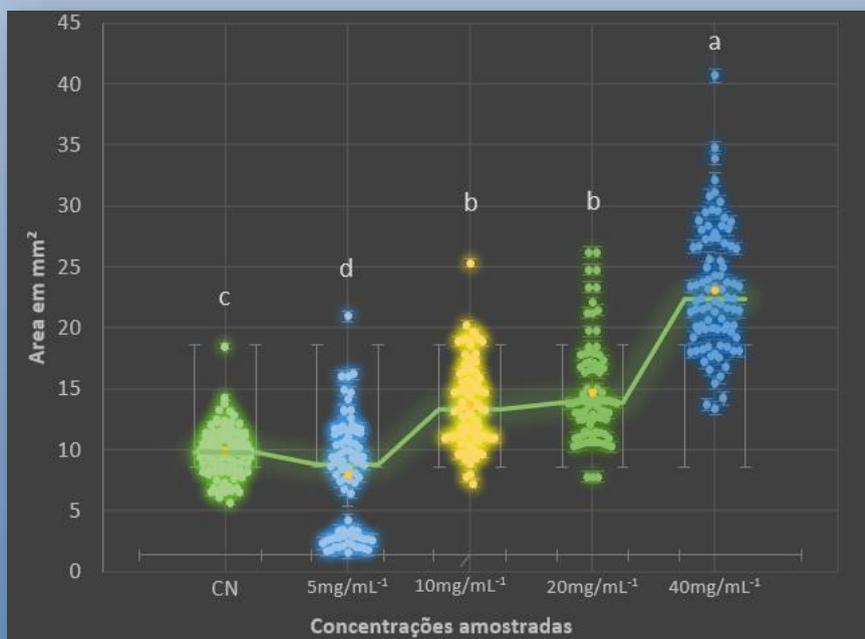
Para as análises estatísticas foram comparados os valores da média de cada uma das concentrações (através do teste t) e os resultados apontaram semelhança entre os tratamentos com 10 e 20 mg/mL⁻¹. Por se tratar de uma análise não paramétrica também foi realizado o teste de Kruskal-Wallis por meio do software XLStat considerando as variáveis comparadas como as diferentes concentrações utilizadas no bioteste.



Tabela 01: Diferença da área média de sementes de *Bidens pilosa* L. expostas aos extratos de *C. xantocarpa*.

Variável	Observações	Mínimo (em mm ²)	Máximo (em mm ²)	Média (em mm ²)	Desvio Padrão
área CN	90	5.658	18.439	9.804	2.114
área 5mg/mL ⁻¹	90	1.554	20.912	7.949	4.438
área 10 mg/mL ⁻¹	90	7.210	25.313	13.650	3.403
área 20 mg/mL ⁻¹	90	7.691	26.150	14.665	4.126
área 40 mg/mL ⁻¹	90	13.395	40.650	23.068	5.032

Figura 2: Diagrama de dispersão da comparação entre a área média em mm² e concentrações dos extratos de *C. xantocarpa*.





De acordo com os dados extraídos a partir da análise morfométrica, nota-se que a germinação de sementes de *Bidens pilosa* L. embebidas em soluções com a concentração 40 mg/mL^{-1} de extrato *Campomanesia xanthocarpa* apresentaram uma área e um desvio padrão (em mm^2) relativamente maior do que a área e o desvio padrão do controle negativo e das 3 outras concentrações utilizadas no bioteste realizado. Adegas, Voll (2003) mostraram que a absorção de água teve aumento significativo com maiores períodos de embebição. E que não houve correlação entre a germinação e os períodos de embebição. Eles ainda relataram que os picos de germinação e os maiores índices de velocidade de germinação foram obtidos pelos maiores períodos de embebição das sementes. Neste experimento, observou-se o efeito alelopático dos extratos com a inibição da germinação já nas concentrações menores ($5 \text{ e } 10 \text{ mg/mL}^{-1}$). E que, embora a expansão da área da semente era maior quanto maior fosse a concentração dos extratos isso não corroborava com a germinação, o que nos leva a crer que os extratos aquosos obtidos de folhas de *C. xanthocarpa* possam conter aleloquímicos que interferem nos mecanismos fisiológicos da germinação, como apontou o trabalho de Ferreira *et al.* (2019) apresentado neste mesmo evento científico.

Ademais, ao comparar as imagens obtidas ao final do bioteste, nota-se o entumescimento das sementes, um escurecimento gradual das folhas de papel germitest das placas de Petri de cada concentração e um aumento significativo no número de placas acometidas de proliferação fúngica (Figura 2).

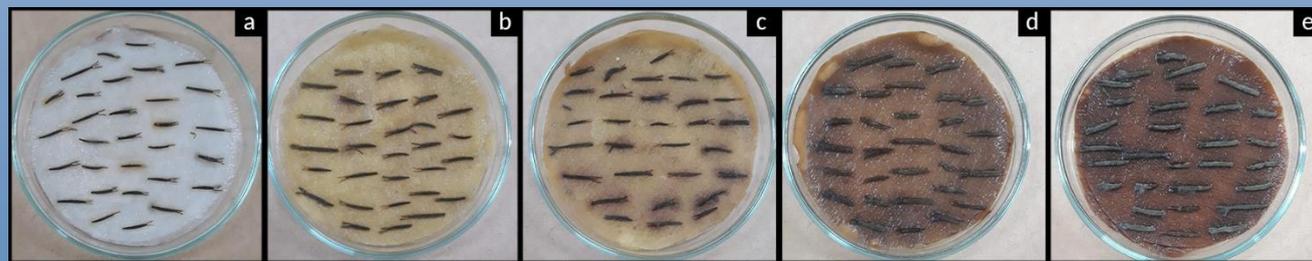


Figura 3: Sementes de *B. pilosa* L. expostas às diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas de *C. xanthocarpa*. a) Controle negativo (água destilada) b) 5 mg/mL^{-1} ; c) 10 mg/mL^{-1} ; d) 20 mg/mL^{-1} ; e) 40 mg/mL^{-1} .



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mostramos aqui que as ferramentas digitais podem ser utilizadas para aferir os processos de expansão de área de sementes expostas em bioensaios de fitotoxicidade e podem corroborar com dados preliminares de estudos de embebição de sementes. Destacamos que a expansão da área das sementes de *B. pilosa*, aqui estudadas, foi concentração dependente, assim como também a inibição da germinação demonstrando dessa forma o potencial de ação desses extratos sobre a morfometria do bioteste.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao MEC/SESu/FNDE pela bolsa PET do Professor Sandro Barbosa e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo financiamento e bolsas de pesquisa concedidas para conduzir este estudo.

REFERÊNCIAS

Adegas, F.S. e Voll, E. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). Planta Daninha [online]. 2003, v. 21, n. 1. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000100003>.

Barbosa, Jaqueline de Araujo et al. Allelopathy of aqueous *Pachyrhizus erosus* L. extracts on *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa* L. Pesquisa Agropecuária Tropical [online]. 2018, v. 48, n. 1, pp. 59-65. doi: <https://doi.org/10.1590/1983-40632018v48s1117>

Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environ Sci Eur. 2016;28(1). doi:10.1186/s12302-016-0070-0

Geiger F., et al, Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland, Basic and Applied Ecology 11(2): 97-105, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.baec.2009.12.001>





Gindri, Diego Medeiros et al. Herbicidal bioactivity of natural compounds from *Lantana camara* on the germination and seedling growth of *Bidens pilosa*. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [online]. 2020, v. 50 e57746. doi: <https://doi.org/10.1590/1983-40632020v5057746>.

Ferreira, Luana de Paula et al. Caracterização da ação alelopática de *Mabea fistulifera*. (Resumo) 16º Congresso Nacional do Meio Ambiente – V. 11 N.1 2019.

Gillezeau C, Van Gerwen M, Shaffer RM, et al. The evidence of human exposure to glyphosate: A review. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2019;18(1). doi:10.1186/s12940-018-0435-5

Hoffman B e Holz J. A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. 1988;27(11):3700-3701. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80806-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80806-9)

Krishnaiah, Duduku & Sarbatly, Rosalam & Nithyanandam, Rajesh. . A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing - FOOD BIOPROD PROCESS*. 2011; 89. 217-233. 10.1016/j.fbp.2010.04.008.

BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Bidens pilosa* (Picão – preto). Ação 20K5 (DAF/ SCTIE/ MS)/2013. 2015. Disponível em:
<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Bidens.pdf>

Peillex C, Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J Immunotoxicol*. 2020;17(1). doi:10.1080/1547691X.2020.1804492

Souza, Bruna A. et al. Preliminary phytochemical screening and molluscicidal activity of the aqueous extract of *Bidens pilosa* Linné (Asteraceae) in *Subulina octona* (Mollusca, Subulinidade). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2013; 85(4). doi: <https://doi.org/10.1590/0001-37652013111812>