

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL – MG**

**DANIELA VILAS BÔAS BRAGA**

**POTENCIAL FITOTÓXICO E CITOGENOTÓXICO  
DE FOLHAS E EPICARPOS DE DIFERENTES CULTIVARES  
DE *Coffea arabica* L. EM BIOENSAIO VEGETAL.**

**Alfenas/MG  
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL – MG**

**DANIELA VILAS BÔAS BRAGA**

**POTENCIAL FITOTÓXICO E CITOGENOTÓXICO  
DE FOLHAS E EPICARPOS DE DIFERENTES CULTIVARES  
DE *Coffea arabica* L. EM BIOENSAIO VEGETAL.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas.

**Orientador:** Prof. Dr. Sandro Barbosa.

**Coorientador:** Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Colaboradores: Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva

Dra. Kamila Rezende Dázio  
(Pós-Doutoranda PPGCA)

Renan Gomes Bastos  
(Doutorando PPGCF-UNIFAL)

João Vitor Calvelli Barbosa  
(Mestrando PPGCA)

Pamela Ingrid Alves  
(Mestranda PPGCA)

Nathália Ferreira Flausino  
(Bolsista IC-CNPq)

Jade Del Nero Oliveira  
(Bolsista IC- FAPEMIG)

Daniel Santos de Carvalho  
(Eng. Agrônomo Ipanema Coffees)

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Braga, Daniela Vilas Bôas

B813p Potencial fitotóxico e citogenotóxico de folhas e epicarpós de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. em bioensaio vegetal. / Daniela Vilas Bôas Braga – Alfenas, MG, 2019.  
57 f.: il. –

Orientador: Sandro Barbosa.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Germinação. 3. Índice mitótico. 4. Café. I. Barbosa, Sandro.  
II. Título.

CDD- 633.73



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG  
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000  
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9268 (Secretaria)  
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



DANIELA VILAS BÔAS BRAGA

**“Potencial fitotóxico e citotóxico de folhas e pericarpos de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. em bioensaio vegetal.”**

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 26 de julho de 2019.

Prof. Dr. Sandro Barbosa  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Laiane Corsini Rocha  
Instituição: UFLA-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Líliliana A. Avelar Pereira Pasin  
Instituição: FEPI

Assinatura:  \_\_\_\_\_

*Aos meus pais, Danilo e Dinha, por sempre estarem ao meu lado me apoiando.*

*À minha filha Denise, razão do meu viver.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que esteve ao meu lado durante esta caminhada, foi Nele que procurei força e coragem para não desistir nos momentos de fraqueza.

A meus pais Danilo e Dinha, meu infinito agradecimento. Vocês sempre acreditaram na minha capacidade e me ensinaram a sempre dar o melhor de mim e, acima de tudo, a ser uma pessoa honesta e justa. Obrigada por mais uma vez cuidarem do meu bem mais precioso, minha filha.

À minha filha Denise, a quem não pude dar muita atenção e acompanhamento nesses últimos 2 anos, mas, foi o motivo para eu sempre seguir em frente não importando qual fosse a dificuldade. Foi, é e sempre será por você, pensando no seu futuro que irei me sacrificar quantas vezes for necessário. Esta conquista é nossa!

A meus tios Ana Karla e Denilson, meu irmão Daniel, meu avô Tiãozinho, demais familiares e aos amigos de Pedralva, que sempre me apoiaram. Obrigada pela força!

Aos amigos de Alfenas: Gui, Marcelo, Daniel, Edu, Juliana, Jady, Gabi Sellive, Thaís e Menali. Os melhores rolês sempre foram com vocês.

Aos amigos que a Biologia me deu: Alexandre, Willian, Cris, Danilo, Denise, Amanda, Rafael e Wagner, gratidão pelo apoio de sempre.

À secretária Denise. Obrigada por toda ajuda e principalmente pela amizade e carinho.

Aos colegas e amigos do Biogen, Jade Del, Nathália, Letícia Massola, Cristiane, Kamila Dázio, Pedro, Gisele, Giovana, Roberto, César, Gabriel e Bia.

Aos irmãos de caminhada Pamela, João Vitor, Gleika, Valdir e Josiele. Vocês fizeram com que essa caminhada se tornasse mais fácil. Obrigada pela ajuda dentro e fora do laboratório. Gratidão pela amizade, pela parceria e paciência.

Aos professores e funcionários do PPGCA, em especial ao Prof. Dr. Breno, à técnica Gabriela e às ex funcionárias Val e Dona Ciomara.

A minha ex orientadora e mãe científica, Liliana. Sua orientação, incentivo e puxões de orelha ajudaram a trilhar meu caminho.

Ao engenheiro agrônomo, Daniel Santos de Carvalho, por todo apoio e atenção ao longo da pesquisa e pela ajuda nas coletas e, à Ipanema Coffees por ceder o material para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu coorientador Geraldo Alves da Silva, ao Professor Marcelo Silva e ao

doutorando Renan Gomes Basto, por todo suporte técnico durante o período deste trabalho, sem hesitar esforços.

Ao meu orientador, amigo e pai científico, Sandro Barbosa. Você chegou na minha vida num momento muito difícil e mesmo assim acreditou e me incentivou desde o início. Obrigada por toda paciência, persistência, ensinamento, por sempre me apoiar e segurar minhas mãos nos momentos que mais precisei.

A todos aos amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista, minha eterna gratidão. Essa conquista também é de vocês.

Os autores agradecem à Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), à CAPES, à FAPEMIG, ao CNPq e à Ipanema Coffees.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Com à finalidade de descobrir novas substâncias com ação bioherbicida, propõe-se, no presente trabalho, estudar a viabilidade do uso de folhas e epicarpos de café (*C. arabica* L.) como fonte de aleloquímicos, avaliando a ação fitotóxica e citogenotóxica de extratos aquosos das cultivares Acaia, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio em bioensaio com *Lactuca sativa*. Os extratos foram preparados nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg.mL<sup>-1</sup>, e caracterizados quanto ao pH e osmolaridade. Como controle utilizou-se a água destilada (0%). Os testes fitotóxicos foram realizados em DBC. Os de citotoxicidade foi em DIC, com 8 tratamentos e 3 repetições. Foi realizada a análise da atividade enzimática e da peroxidação lipídica. Os resultados foram submetidos à ANOVA e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0.05$ ). Os parâmetros avaliados foram: a porcentagem de germinação inicial e final, o índice de velocidade de germinação, o índice de efeito alelopático, o comprimento de parte aérea, o alongamento de raiz, índice mitótico e frequência de anormalidades cromossômicas. Constatou-se que os extratos de folhas e epicarpos de diferentes cultivares de *C. arabica* nas concentrações mais altas reduziram os parâmetros avaliados. Foram observadas anormalidades como micronúcleos, pontes em anáfase e telófase, c-metáfases, stickiness, cromossomos perdidos, cromossomo atrasado em anáfase e telófase. O aumento gradativo da concentração de extrato de diferentes cultivares de folhas e epicarpos de *C. arabica* afeta o desempenho germinativo de sementes de *L. sativa*, além de causar alterações na atividade enzimática e divisão celular.

**Palavras-chave:** Alelopatia. Germinação. Índice Mitótico. Café.

## ABSTRACT

In order to discover new bioherbicidal substances, it is proposed, in the present work, to study the viability of the use of coffee leaves and pericarp (*C. arabica* L.) as a source of allelochemicals, evaluating the phytotoxic and cytogenotoxic action of extracts Acaiaá, Yellow Bourbon, Catuaí Amarelo and Topázio in bioassay with *Lactuca sativa* L. The extracts were prepared at concentrations of 5, 10, 20 e 40 mg.mL<sup>-1</sup>, and were characterized for pH and osmolarity. As control the distilled water (0%) was used. The phytotoxic tests were performed in blocks completely randomized. Those of cytotoxicity were in a completely randomized design, with 8 treatments and 3 replicates. The enzymatic activity and the lipid peroxidation were analyzed. The results were submitted to ANOVA and the means comparison was done by the Scott Knott test ( $p \leq 0.05$ ). The parameters evaluated were: initial and final germination percentage, germination rate index, allelopathic effect index, shoot length, root length, mitotic index and frequency of chromosomal abnormalities. Leaf extracts and pericarp of different cultivars of *C. arabica* at higher concentrations were found to reduce the parameters evaluated. The mitotic index was reduced in comparison to the control and the frequency of abnormalities was smaller. Abnormalities such as micronuclei, anaphase and telophase bridges, c-metaphases, stickiness, lost chromosomes, delayed anaphase chromosome and telophase were observed. The gradual increase of the extract concentration of different leaf and pericarp cultivars of *C. arabica* affects the germination performance of *L. sativa* seeds, besides causing changes in the enzymatic activity and cell division.

**Keywords:** Allelopathy. Germination. Mitotic Index. Coffee.

## SUMÁRIO

	<b>PARTE I</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
2.1	Café: Origem histórica, produção e globalização	13
2.2	Caracterização botânico-agronômica do café	14
2.3	Fenologia do cafeeiro	15
2.4	Principais cultivares no Brasil	17
2.5	Processamento do café e geração de resíduos	18
2.6	Metabolismo vegetal	21
2.7	Composição química do café e sua possível utilização como fonte de aleloquímicos	21
2.8	Uso de aleloquímicos como substâncias potenciais para produção de bioherbicidas	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
4.1	Objetivos Gerais	26
4.2	Objetivos específicos	26
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>PARTE II: ARTIGO 1</b>	<b>33</b>

## PARTE I

### 1 INTRODUÇÃO

As substâncias que as plantas liberam no ambiente podem interferir favoravelmente ou não, no crescimento e desenvolvimento de outras ao seu redor (RICE, 1984). A grande maioria dessas substâncias são oriundas do metabolismo secundário de plantas. Esses metabólitos variam em qualidade e quantidade de uma espécie para outra (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Essas substâncias conhecidas também como aleloquímicos, se absorvidas pelas plantas ao redor, podem sofrer modificações em sua fisiologia como alteração nos processos de divisão, alongamento celular e modificando a ultraestrutura celular, além de influenciar os mecanismos hormonais de indução de crescimento, permeabilidade das membranas celulares, abertura estomática, fotossíntese, respiração, síntese proteica, metabolismo de lipídios e dos ácidos graxos (FORMIGHEIRI, *et al.*, 2018).

A infestação de espécies invasivas tem sido reconhecida como uma das maiores ameaças para espécies nativas e biodiversidade em todo o mundo (SAMPAIO; SCHMIDT, 2014). Porém, para atender às necessidades alimentares, a introdução de herbicidas foi indispensável, visto que se fazia necessário reduzir as espécies invasoras e conseqüentemente aumentar os rendimentos da produção. No entanto, o uso contínuo de herbicidas proporcionou o aumento da poluição ambiental, aumentando a resistência das plantas daninhas (COSTA; MARTINS, 2015; SILVA, *et al.*, 2017).

A espécie *Coffea arabica* L, representa 75% da produção mundial de café, sendo o Brasil responsável por um terço da produção mundial de café, consolidando-se como o maior produtor e exportador deste produto, e segundo maior consumidor (EMBRAPA, 2018). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção estimada para o ano de 2018 foi de 61,7 milhões de sacas beneficiadas. Contudo, essa alta produção gera também uma grande quantidade de resíduos. Segundo Fernandes, *et al.*, (2013), para cada saca de café produzida tem-se entre 50 a 60 kg de casca, que, de acordo Baqueta, *et al.* (2017), possui elevado potencial na geração de resíduos agroindustriais, que ao serem dispostos inadequadamente, podem afetar o meio ambiente, causando a poluição de solos e águas.

As substâncias químicas mais comuns causadoras de efeitos alelopáticos pertencem aos

grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (SOUZA, *et al.*, 2005). A literatura cita que os resíduos de café são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como cafeína, taninos e polifenóis (FERNANDES, *et al.*, 2013).

A fitotoxicidade de extratos vegetais é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição. Entretanto, existem poucos estudos descrevendo os mecanismos e modos de ação dos aleloquímicos sobre os eventos celulares ligados às mudanças genéticas e fisiológicas, a maioria refere-se apenas aos efeitos alelopáticos sobre a germinação, crescimento e desenvolvimentos das plantas (IGANCI *et al.*, 2006). Diante disso, as substâncias alelopáticas representam uma opção a ser seguida na busca pelo controle de planta das daninhas.

A busca por alternativas ao uso de herbicidas na agricultura constitui-se num dos desafios de um modelo de cultivo mais sustentável. Com à finalidade de descobrir novas substâncias com ação bioherbicidas, propõe-se, no presente trabalho, estudar a viabilidade do uso de folhas e epicarpos de café (*C. arabica* L.) como fonte de aleloquímicos, avaliando a ação fitotóxica e citogenotóxica de extratos aquosos das cultivares Acaia, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio em bioensaio com alface (*Lactuca sativa* L).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, acompanha revisão de literatura atualizada acerca dos temas abordados nesta dissertação, com intuito de gerar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados obtidos.

### 2.1 Café: Origem histórica, produção e globalização

O café tem sua origem na Etiópia, região de Kafa, onde hoje se localiza a cidade de Bonga. Conta-se que um pastor chamado Kaldi ao experimentar o fruto, confirmou seu efeito estimulante. Por volta dos anos 1000, os grãos começaram a ser fervidos em água, com finalidades medicinais e bebida estimulante. Porém, o processo de torrefação teve início apenas no século XIV, e a partir daí a bebida adquiriu forma e gosto da maneira que a conhecemos hoje (MARTINS, 2012).

Trazidas da Guiana Francesa, as primeiras mudas chegaram ao Brasil em 1727, na cidade de Belém do Pará por intermédio do Sargento Francisco de Mello Palheta. Sob condições climáticas favoráveis, o cultivo de café se espalhou rapidamente, e em curto espaço de tempo o café passou a ser o produto base da economia (ABIC, 2019). A produção cafeeira no Brasil serviu para alavancar a economia do país, auxiliar na mecanização do território e gerar divisas necessárias à industrialização e à construção de grandes sistemas de engenharia (SANTOS, 2017).

No comércio internacional, o café só é superado em valor pelo petróleo como fonte de divisas para os países em desenvolvimento. Em países menos desenvolvidos, as exportações de café respondem por uma proporção significativa das receitas (ALMEIDA; BRAGA, 2011). Para o ano de 2018 a produção de café arábica foi estimada em 104,01 milhões de sacas e a de café robusta em 63,5 milhões de sacas, números que apontam um volume total equivalente a 167,47 milhões de sacas (ABIC,2019).

O Brasil é o maior produtor de café, responsável por 30% do mercado internacional do produto. O parque cafeeiro se concentra no centro-sul do país, com destaque para quatro estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná (ALMEIDA, *et al.*, 2018). De acordo com o Relatório da Embrapa Café (2018), o país se mantém como segundo maior consumidor mundial do produto, ficando atrás dos Estados Unidos.

Segundo os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), para o ano de

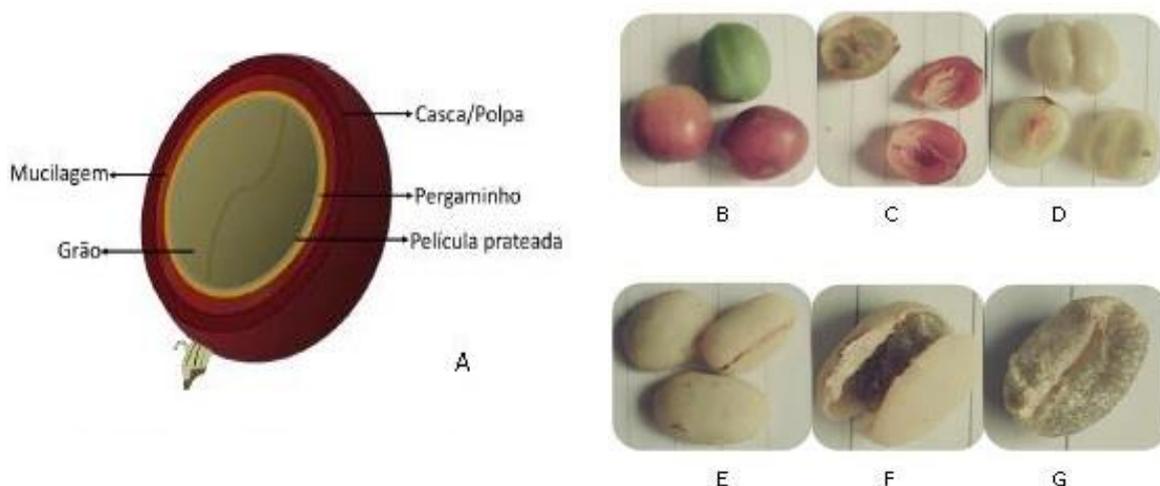
2018 a produção foi de 61,7 milhões de sacas beneficiadas. Para o ano de 2019, devido à influência da bialidade negativa, estima-se uma produção entre 50,48 milhões e 54,48 milhões de sacas beneficiadas (CONAB, 2018).

## 2.2 Caracterização botânico-agronômica do café

O cafeeiro pertence à classe das Eudicotiledôneas, a família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Existem descritas aproximadamente 100 espécies deste gênero, entretanto, dentre as diversas espécies existentes, as que apresentam melhor valor de mercado são o *Coffea canephora* P. e *Coffea arabica* L. (CASTRO, 2014).

Originário do Congo e da Guiné, o *C. canephora* é conhecida como café robusta ou conilon. Corresponde por 1/4 da produção mundial, concentrando-se na África, Ásia e América do Sul. No Brasil, sua produção concentra-se principalmente no Espírito Santo e em partes da Bahia e de Rondônia (CONAB, 2018).

Já a espécie *C. arabica*, é originária da Etiópia. É uma planta perene, com ciclo bianual, de clima tropical de altitude, adaptada a temperaturas amenas e clima úmido (ALCANTARA, 2012). É uma espécie autógama, com cerca de 90% das suas flores fertilizadas pela junção de pólen e óvulo oriundos da mesma planta. O fruto é do tipo drupa elipsoide, formado por exocarpo ou epicarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho). Possui dois lócus contendo dois endospermas (sementes), que são envolvidas pelo perisperma (película prateada), sendo esta, observada apenas após o beneficiamento do grão cru. A polpa representa de 39 a 49% da massa do fruto fresco. A casca representa 12% do fruto seco. A mucilagem representa de 22 a 31% do fruto seco. O pergaminho representa 3,8% do fruto fresco e 16 a 32% do fruto seco (DURÁN, *et al.*, 2017) (Figura 1).



**Figura 1-** (A) Desenho do fruto do café e suas partes. (B) Frutos de cafés em diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada.

Fonte: Duran, *et al.*, 2017.

### 2.3 Fenologia do cafeeiro

Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), fenologia pode ser definida como o estudo da vida da planta em função das condições ambientais. As relações e o grau de influência dos fatores envolvidos podem ser determinados com a ordenação das fases fenológicas da cultura (PEZZOPANE, *et al.*, 2007). Desta forma, (CAMARGO; CAMARGO, 2001), apresentaram um modelo simples para definir e esquematizar a sequência das fases fenológicas do cafeeiro arábica, nas condições tropicais do Brasil (Figura 2).



**Figura 2:** Esquematização das fases fenológicas de *C. arabica*, num período de 24 meses, nas condições climáticas tropicais do Brasil.

Fonte: CAMARGO; CAMARGO, 2001.

No primeiro ano do ciclo, nos meses de dias longos, formam-se os ramos vegetativos com gemas axilares nos nós. No mês de janeiro, com os dias mais longos, as gemas vegetativas axilares são induzidas por fotoperiodismo em gemas reprodutivas. Após o equinócio de março, com os dias curtos com menos de 13 horas de luz efetiva, a indução das gemas foliares já existentes para gemas florais intensifica-se, iniciando seu desenvolvimento. À medida que vão amadurecendo, as gemas florais entram em dormência, assim como as que já estão maduras ficando prontas para a antese. Com o aumento do potencial hídrico, provocado por chuva ou irrigação, desencadeia-se a florada (CAMARGO; CAMARGO, 2001; PEZZOPANE, *et al.*, 2007) (Figura 2).

O segundo ano fenológico tem início com a florada e formação dos chumbinhos, seguindo da granação dos frutos e a fase de maturação. Finalmente acontece a senescência, morte dos ramos plagiotrópicos terminais. Na primavera do ano seguinte os novos ramos brotam transformando-se em ramos reprodutivos, possibilitando nova produção, defasada no ano seguinte (CAMARGO; CAMARGO, 2001) (Figura 2).

O café possui crescimento contínuo, com dimorfismo de ramos, onde o ramo ortotrópico cresce verticalmente e dá origem aos ramos plagiotrópicos, que se desenvolvem lateralmente. Apresenta ainda uma variação sazonal no crescimento vegetativo e reprodutivo e que não é modificado pelo padrão de periodicidade, porém, o ritmo de crescimento das diferentes partes da planta muda em função de fatores genéticos, nutricionais, hormonais e ambientais (SALGADO, 2004).

A espécie *C. arabica* L. leva aproximadamente 2 anos para completar seu ciclo fenológico, com uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas, diferindo-se da maioria das plantas que emitem suas flores na primavera e frutificam no mesmo ano. Nessa sucessão de fases vegetativas e reprodutivas, o cafeeiro passa por estádios fenológicos que determinam fases importantes na formação da produção das plantas e sendo bem caracterizados, podem auxiliar em pesquisas relativas a estimativas de safra, previsão de época de maturação, controle fitossanitário e programa de melhoramento do cafeeiro (PEZZOPANE, 2007).

As fases reprodutiva e vegetativa ocorrem simultaneamente e com isso há competição por fotoassimilados, sendo essa a principal causa da bienalidade do cafeeiro, uma vez que a planta irá atender as demandas do crescimento vegetativo e reprodutivo mediante a divisão dos fotoassimilados e pela redistribuição dos nutrientes. Tem-se, ainda, as variações

sazonais no crescimento vegetativo que são intensamente influenciadas pela presença de flores e frutos, ou seja, há competição dentro da planta pelos metabólicos disponíveis de acordo com os drenos (SALGADO, 2004).

A bienalidade é uma característica da espécie *C. arabica* L., afetando diretamente a produção, ou seja, um ano de baixa carga (baixa produção) implicará em um ano de carga alta (alta produção). A divisão de carboidratos na planta é feita no sentido fonte – dreno, sendo que as flores e os frutos são drenos “fortes” em ano de grande produção. O amido produzido na fotossíntese corrente e os de reserva são direcionados preferencialmente para o desenvolvimento dos mesmos. Em anos de baixa produção, aparentemente, a competição é maior entre as partes vegetativas da planta (SALGADO *et al.*, 2004).

## 2.4 Principais cultivares no Brasil

Atualmente existe um variado número de cultivares de café arábica usados no mundo. No Brasil há registro de aproximadamente 128 registrados comercialmente que derivam de base genética estreita, implicando na similaridade genética entre os principais cultivares, sendo que, apenas quatro genótipos distintos são reconhecidos: Típica, Bourbon, Arabusta e Híbrido de Timor (RIBEIRO, 2017).

A história de propagação de *C. arabica* combinado à sua autogamia tem levado a diversidade genética estreita entre as cultivares, o que comprometeu os programas de melhoramento genético, dificultando o desenvolvimento de ferramentas moleculares. Recentemente foram reportados alguns mapas genéticos, entretanto, não há nenhum disponível publicamente (SANT’ANA, *et al.*, 2018). Porém, mesmo com base genética bastante estreita, as cultivares comercializadas apresentam grande variabilidade botânica oriunda de uma série de mutações e de cruzamentos naturais e artificiais (AGUIAR, *et al.*, 2004). Dentre os cultivares de arábica, destacam-se Mundo Novo, Catuaí e Bourbon. Os cultivares Catuaí e Mundo Novo compreendem a maior parte do parque cafeeiro da espécie *Coffea arabica* L. no Brasil (CARDOSO, *et al.*, 2016).

A cultivar Acaiá originou-se da seleção de plantas individuais de Mundo Novo, sendo, portanto, um Mundo Novo por origem. É possível que as sementes maiores de 'Acaiá' tenham provindo da cultivar Sumatra, que participou da origem de 'Mundo Novo'. Na progênie P 474 de 'Mundo Novo' foram obtidas plantas com sementes maiores, verificou-

se também que suas progênes S2 apresentavam sementes maiores do que as de 'Mundo Novo'. Os descendentes de prefixo IAC 474 deram origem às cultivares do grupo Acaíá, as quais começaram a ser distribuídas aos cafeicultores a partir de 1977. Apresenta boa produção e os dois florescimentos principais ocorrem entre os meses de setembro a outubro (AGUIAR, 2004).

O Catuaí Amarelo é oriundo do cruzamento de Caturra Amarelo (porte baixo), prefixo IAC 476-11, com Mundo Novo (alto vigor) IAC 374-19. O híbrido resultante recebeu o prefixo IAC H2077. Foram obtidos 3 cafeeiros homozigotos para porte baixo, frutos amarelos e alto vigor. Essa nova combinação foi denominada de Catuaí Amarelo. Em 1972, esta cultivar foi liberada, pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), para fins comerciais (AGUIAR, *et al.*, 2004).

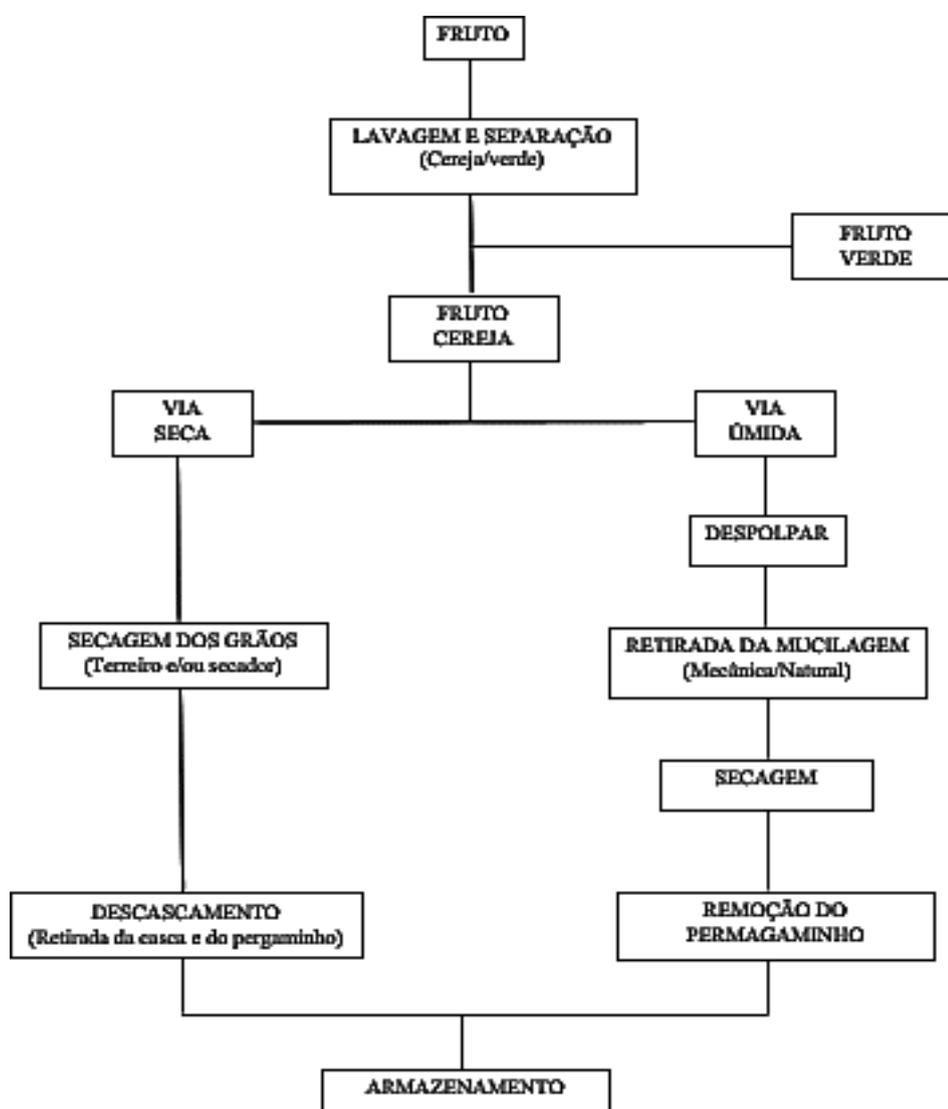
O Bourbon Amarelo pode ter se originado da mutação de Bourbon Vermelho ou ser produto de recombinação do cruzamento natural entre Bourbon Vermelho e Amarelo de Botucatu. O IAC, efetuou em 1945, a seleção de numerosas plantas cujas progênes foram estudadas em vários locais, originando o material genético da cultivar Bourbon Amarelo, indicada para o plantio. Os florescimentos principais ocorrem de setembro a outubro (AGUIAR, *et al.*, 2004). A cultivar Bourbon apresenta naturalmente elevada doçura, sabor achocolatado, intenso aroma e acidez agradável. Essas características fazem com que esta cultivar seja considerada nacionalmente a que possui maior potencial para a produção de cafés especiais (LIMA, *et al.*, 2016).

A cultivar Topázio é oriunda do cruzamento de Catuaí Amarelo e Mundo Novo, realizado por técnicos do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na década de 1960. Posteriormente, com a introdução desse material em Minas Gerais, pelo Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG-UFLA-UFV), a seleção foi intensificada, culminando com a liberação da cultivar Topázio MG-1190 para plantio comercial. A cultivar possui porte baixo, excelente produtividade e elevado vigor vegetativo (AGUIAR, *et al.*, 2004).

## **2.5 Processamento do café e geração de resíduos**

O método de colheita brasileiro, propicia a mistura de grãos verdes, cereja e secos, folhas e ramos, sendo necessário lavagem e posterior secagem. A colheita dos frutos pode ser realizada por derriça manual ou mecanizada, e os frutos colhidos necessitam passar por um

processo de limpeza, sendo separados de impurezas. Todo esse conjunto de operações é denominado de processamento dos grãos e influencia diretamente na qualidade da bebida (NEVES, 2016). Em seguida, independentemente do método de processamento adotado (via seca ou via úmida), os frutos devem ser submetidos à lavagem. A lavagem permitirá que os frutos cerejas e verdes sejam separados dos frutos sobremaduros, brocados, chochos. Após esta etapa, o processamento do café acaba variando entre os produtores, uma vez que o fruto poderá seguir o processamento por via seca ou via úmida (BORÉM, 2006) (Figura 3).



**Figura 3-** Fluxograma simplificado do processamento pós colheita do café  
Fonte: Autor, 2019.

O processamento em via úmida consiste no uso de água para retirada da casca e polpa do fruto, seguida pela secagem e retirada do pergaminho, dando continuidade as demais etapas do beneficiamento. Já no processo em via seca, uma técnica mais simples, a secagem é realizada diretamente nos grãos, ao contrário da via úmida, gerando o café em coco para o beneficiamento posterior (NUNES, *et al.*, 2019). Neste tipo de processamento, os grãos de café são secos diretamente ao sol e/ou em secadores artificiais (NEVES, 2016). Independente do processamento utilizado, diversos resíduos são gerados ao longo do beneficiamento do café (DURÁN, *et al.*, 2017). Dias *et al.* (2012), estimaram que para cada tonelada de café beneficiado, tem-se 1,25 toneladas de resíduos.

O processamento do café pela via úmida possibilita a formação de lotes com frutos maduros que além de aumentar o valor de mercado, diminui a demanda por espaço, armazenamento e mão de obra, refletindo diretamente nos custos dessas operações. Nesta etapa, o resíduo é composto por água residuária do café (ARC), polpa e casca, e após a secagem dos grãos, os pergaminhos (BRITO, 2012).

No processamento pela via seca, os frutos apresentam modificações na cor em virtude do lento processo de desidratação. Esta via resulta em frutos de café coco ou de terreiro, onde os grãos serão mantidos com a casca, conferindo ao fruto mais resistência a injúrias. Entretanto, haverá aumento no tempo de secagem, mais gastos com mão de obra e ocupação de uma área maior na etapa de armazenamento (DURAN, *et al.*, 2017). Neste processamento, a principal via de produção de resíduo é a retirada da casca e do pergaminho. Com base nos processos utilizados para o beneficiamento dos grãos de café, este é o principal método utilizado no Brasil, tendo elevado potencial na geração de resíduos agroindustriais, que ao serem dispostos inadequadamente, podem afetar o meio ambiente, causando a poluição de solos e águas (BAQUETA, *et al.*, 2017).

Várias alternativas estão sendo exploradas visando o gerenciamento adequado dos resíduos da cafeicultura, entretanto, ainda não há nenhuma solução. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos na intenção de solucionar ou diminuir os impactos gerados. Faria (2016), avaliou o potencial dos resíduos do processamento dos grãos de café, na produção de pellets, para a geração de energia térmica e classificá-los quanto à possibilidade de comercialização. Já Menezes (2012), estudou a viabilidade do uso da polpa na produção de biocombustível.

## 2.6 Metabolismo vegetal

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células (MARAIS; JAHNKE, 2019). No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Os metabólitos secundários das plantas constituem um grande reservatório de diversidade química natural que é constantemente gerado por meio de adaptações genéticas ao ambiente abiótico e biótico predominante e sempre flutuante. Como consequência, tornaram-se essenciais para a sobrevivência e a aptidão reprodutiva de uma espécie de planta dentro de seu ambiente natural (CHEZEM; CLAY, 2016). Cumprem funções diversas e importantes na ecologia química, modificando os precursores fornecidos pelo metabolismo primário (CARRIGTON, *et al.* 2018).

## 2.7 Composição química do café e sua possível utilização como fonte de aleloquímicos

A composição química do café depende de aspectos genéticos, aspectos fisiológicos, composição do solo, clima e práticas agrícolas (POYRAZ, *et al.*, 2016). O café é composto por constituintes voláteis e não voláteis, como ácidos, aldeídos, cetonas, compostos fenólicos, cafeína e outros, assim como, enzimas que agem sobre estes próprios constituintes (TOLEDO, *et al.*, 2016; PEREIRA, *et al.*, 2019).

As folhas do cafeeiro possuem vários compostos como fenóis, terpenóides, flavonóides, alcalóides (cafeína), aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos clorogênicos, ácidos neoclorogênicos, ésteres, cetonas, pirazinas e cumarinas (FERNANDES, *et al.*, 2013). Dentre esses compostos, os presentes em maiores concentrações na folha são os fenóis e os terpenóides. Já o fruto no estágio cereja, contém em sua mucilagem açúcares simples, polissacarídeos, minerais, proteínas e lipídeos, entre outros compostos, constituindo um excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Além disso, a mucilagem contém também água, taninos, cafeína, ácidos clorogênicos e cafêicos, aminoácidos e substâncias pécticas (CHEN, 2019).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Taiz; Zeiger, 2013). As substâncias químicas mais comuns causadoras de efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (SOUZA, *et al.*, 2005).

Os terpenos constituem o maior grupo de produtos secundário, tendo como uma das principais funções repelir os herbívoros (MOREIRA, *et al.*, 2016). Encontrados comumente na forma de óleos essenciais. São polares e solúveis em água (NGO, 2016). Podem ser definidos quimicamente como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (FELIPE; BICAS, 2017). Os óleos essenciais têm sido reportados como potentes inibidores da germinação de sementes e do desenvolvimento de diferentes espécies de plantas (TOMAZ, *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos são as substâncias químicas mais comumente associadas com o efeito alelopático. Classificam-se em ácidos fenólicos, flavonoides, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas (Taiz; Zeiger, 2013). Os ácidos fenólicos induzem a formação de lignina e aumentam a atividade de enzimas oxidativas, causando modificações da permeabilidade da membrana, contribuindo para a redução do crescimento radicular da planta (FARAH, *et al.*, 2012). Os flavonoides são os compostos naturais mais presentes nas plantas e apresentam efeitos alelopáticos capazes de inibir a germinação e o crescimento de plantas (FRANCO, *et al.*, 2016).

Os alcaloides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (FILHO, *et al.*, 2011). Os alcaloides são um importante grupo de compostos naturais. Esta classe de metabólitos secundários atua na defesa contra microrganismos fitopatogênicos, herbívoros e contra outras espécies de plantas que causam competição (Zamora-Natera, *et al.*, 2008).

Costa *et al.*, (2001), observaram que a casca de café aliada ao uso de herbicida ou a capina manual, na linha do cafezal controlou as plantas daninhas, apresentando resultado semelhante ao uso de apenas herbicida, e superior ao roço e a capina manual. May, *et al.*, (2011), descreveram que a aplicação do extrato da casca de café inibiu a germinação e o desenvolvimento de *Cucumis sativus* L. Minassa, *et al.*, (2017), ao utilizarem a palha de café conilon e arábica sobre a germinação e desenvolvimento de plantas daninhas e cultiváveis concluíram este resíduo pode ser utilizado no controle de plantas invasoras.

## 2.8 Uso de aleloquímicos como substâncias potenciais para produção de bioherbicidas

A introdução de defensivos agrícolas solucionou um dos principais problemas da agricultura, o controle de pragas e doenças. Entretanto, antes do uso desses produtos os agricultores, por meio do conhecimento empírico, faziam esse controle utilizando produtos naturais obtidos a partir de materiais disponíveis em suas próprias propriedades. Com o uso dos agrotóxicos, abandonou-se ou diminuiu o uso desses produtos (SILVA, *et al.*, 2017). No entanto, problemas como resistência e poluição ambiental, surgiram com o uso constante e indiscriminado de defensivos químicos. Com isso, existe um crescente incentivo em estudos sobre novas técnicas mais sustentáveis de controle e manejo de inseto-pragas (TAVARES, *et al.*, 2009).

Substâncias químicas existentes nas plantas podem, quando liberadas no ambiente, interferir no desenvolvimento de outras de forma negativa ou positiva. Este processo ocorre de forma natural e é conhecido como alelopatia (RICE, 1984). Essas substâncias também chamadas de aleloquímicos, resultam do metabolismo secundário das plantas, estando presentes em diferentes partes do vegetal, atuando como inibidores ou estimuladores da germinação de sementes e interferindo no crescimento inicial e desenvolvimento de plântulas próximas da espécie que libera os metabólitos (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O efeito alelopático é classificado em autotoxicidade e heterotoxicidade. O efeito autotóxico ocorre quando plantas da mesma espécie liberam seus aleloquímicos no meio interferindo na germinação e desenvolvimento de plantas da mesma espécie. Já o efeito heterotóxico ocorre quando uma planta libera substâncias que são tóxicas para a germinação e desenvolvimento de plantas de outras espécies (REZENDE, *et al.*, 2016). Depois de liberados no ambiente os aleloquímicos podem ser absorvidos pelas plantas ao redor e assim atuar na fisiologia das mesmas, com isso havendo a possibilidade de alterar os processos de divisão, alongamento celular e modificando a ultraestrutura celular, além de influenciar os mecanismos hormonais de indução de crescimento, permeabilidade das membranas celulares, abertura estomática, fotossíntese, respiração, síntese proteica, metabolismo de lipídios e dos ácidos graxos (FORMIGHEIRI, *et al.*, 2018).

A fitotoxicidade de extratos vegetais é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição. Entretanto, existem poucos estudos descrevendo os mecanismos e modos de ação dos aleloquímicos sobre os eventos celulares ligados às mudanças genéticas e fisiológicas, a maioria refere-se apenas aos efeitos alelopáticos sobre

a germinação, crescimento e desenvolvimentos das plantas (IGANCI, *et al.*, 2006).

Segundo Dias e Dias (2007), os metabólitos secundários estão envolvidos numa variedade de processos ecológicos, entretanto, eles não possuem apenas funções ecológicas uma vez que muitos dos metabólitos secundários são fitotóxicos, constituindo uma fonte para produção de novos herbicidas. As substâncias químicas mais comuns causadoras de efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas (SOUZA, *et al.*, 2005).

### 3 JUSTIFICATIVA

O processamento do café associado à elevada produtividade gera uma grande quantidade de resíduos. Estima-se que são geradas aproximadamente 225 milhões de toneladas de resíduos líquidos (águas residuárias) e 9,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos (casca, polpa, mucilagem, pergaminho, película prateada e borra), que na maioria das vezes são descartados incorretamente, tornando-se um agente poluidor. Nesse sentido, diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de aproveitar esses resíduos, dada a necessidade de dispô-los adequadamente no meio ambiente (MENEGHELLI, *et al.*, 2017).

O aproveitamento dos resíduos do processamento do café vem da urgência em minimizar os danos ao meio ambiente. Existem vários estudos afirmando que o café possui ação alelopática, e a maioria desses estudos se refere apenas à germinação e desenvolvimento de espécies vegetais, entretanto, há poucos relatos de pesquisas acerca da ação citogenotóxica dos aleloquímicos do café em bioensaios. Diante disso, faz-se necessário um estudo que demonstre quais os danos causados ao material genético, resultantes da ação desses aleloquímicos e ainda avaliar a possibilidade do desenvolvimento de um bioherbicida a base de folhas e/ou epicarpos de café.

## **4 OBJETIVO**

A sessão a seguir trata dos objetivos gerais e específicos pretendidos neste trabalho.

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a fitotoxicidade e a citogenotoxicidade de folhas e epicarpos de café (*Coffea arabica*, cultivares: Acaiá, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio) em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).

### **4.2 Objetivos específicos**

Verificar os efeitos dos extratos aquoso de folhas e epicarpos de café sobre a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, alongamento de raiz, comprimento de parte aérea, biomassa fresca e seca, em alface (*Lactuca sativa* L.).

Avaliar os efeitos dos extratos aquoso de folhas e frutos de café sobre os parâmetros citogenéticos por meio da quantificação do índice mitótico e da ocorrência de anormalidades cromossômicas em alface.

Submeter os extratos aquosos à análise fitoquímica para detecção qualitativa de compostos oriundos do metabolismo secundário das cultivares avaliadas.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que, dentre as cultivares de café avaliadas, todas possuem efeito alelopático, entretanto, a cultivar Topázio apresentou efeito menos drástico sobre a germinação e desenvolvimento de sementes de alface.

Os extratos aquosos de folhas e epicarpos de diferentes cultivares de *C. arabica* induziu a produção de espécies reativas de oxigênio, o que levou à peroxidação lipídica, seguida da redução da vitalidade celular e a parada mitótica, o que provavelmente acarretou a redução da germinação e inibição do crescimento de sementes de *L. sativa*. Diante disso, esses resíduos mostram ter potencial para o desenvolvimento de um bioherbicida, e ainda serve como uma alerta aos produtores que costumam dispor os epicarpos em lavouras alegando que os mesmos podem ser usados como adubos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira da Indústria de Café. **ABIC. A Expansão do café no Brasil**. Disponível em: <http://abic.com.br/o-cafe/historia/a-expansao-do-cafe-no-brasil/>; Acesso em: 7 de janeiro 2019.

AGUIAR, Adriano Tosoni da Eira *et al.* Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 179–192, 2004.

ALCANTARA, C. B. de *et al.* Desenvolvimento vegetativo de linhagens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) nas condições de cerrado em Patrocínio-MG. 2012.

ALMEIDA, D.C. B. *et al.* A herança colonial brasileira: Quanto as relações sociais e de produção no ciclo do café (1727-2017). **Caribeña de Ciencias Sociales**, julio, 2018.

ALMEIDA, F. M.; SILVA, O. M.; BRAGA, M. J. O comércio internacional do café brasileiro: a influência dos custos de transporte. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 2, p. 323-340, 2011.

BAQUETA, M.R. *et al.* Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal epicarpos de café. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8, n.2, p.68, 2017.

BORÉM, F. M. *et al.* Qualidade do café submetido a diferentes temperaturas, fluxos de ar e períodos de pré-secagem. *Coffee Science*, 1:55-63, 2006.

BRITO, Larissa Froede *et al.* Efeito dos resíduos de café seco e fermentado por *Monascus ruber* no metabolismo de camundongos Apo E. **atherosclerosis**, v. 99, n. 2, p. 747-754, 2012.

CAMARGO, A.; CAMARGO, M.B.P. Definition and outline for the phenological phases of arabic coffee under brazilian tropical conditions. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.

CARDOSO, D de A. *et al.* Seleção de progênies F4 oriundas do cruzamento icatu e catuaí amarelo com resistência à ferrugem. *Coffee Science*, Lavras, v. 11, n. 4, p. 555 - 566, out./dez. 2016.

CASTRO, A. C. C. M. **Avaliação do perfil químico de fenólicos, do potencial antioxidante e fotoprotetor da torta de semente de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae)**. 2014. 87 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.

CHEN, Xiumin. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 6, p. 1008-1025, 2019.

CHEZEM, William R. CLAY, Nicole K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, v. 131, p. 26-43, 2016.

Companhia Nacional de Abastecimento. **CONAB**. Acompanhamento da safra brasileira de

grãos. Monitoramento agrícola - Safra 2017/2018, v. 3, n. 9, P.1- 182, 2018. Acesso em: 29 de janeiro de 2018.

COSTA, L. E. C; MARTINS, E.S. Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 99-106, 2015.

DIAS, Eduardo C. *et al.* Biogenic amine profile in unripe Arabica coffee beans processed according to dry and wet methods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 16, p. 4120-4125, 2012.

DIAS, L. S.; DIAS, A. S. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 510-517, 2007.

DURÁN, Carlos AA *et al.*, Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.

**Embrapa Café**. Disponível em: [www.embrapa.br/embrapa\\_cafec](http://www.embrapa.br/embrapa_cafec). Acesso em: 20 de setembro de 2018.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. **Produção de milho. Guaíba: Agropecuária**, p. 21-54, 2000.

FARAH, Adriana. **Coffee Constituents**. In: CHU, Yi-Fang. Coffee: emerging health effects and disease prevention. [S.l.]: John Wiley; Sons. p. 21-58. 2012

FARIA, Wigor Souza *et al.*, Transformação dos resíduos lignocelulósicos da cafeicultura em pellets para geração de energia térmica. **Coffee Science**, v.11, n.1, p137-147, 2016.

FELIPE, Lorena O.; BICAS, Juliano L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FERNANDES, *et al.* Redução da adubação mineral do cafeeiro arábica com a utilização de palha de café. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 3, p. 324-336, jul./set. 2013.

FERREIRA, Alfredo Gui; AQUILA, Maria Estefânia Alaves. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FILHO, A. P. S.; TREZZI, M. M.; INOUE, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

FORMIGHEIRI, Felix B. *et al.* Alelopatia de *Ambrosia artemisiifolia* na germinação e no crescimento de plântulas de milho e soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 151-160, 2018.

FRANCO, D.M, *et al.* Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Acta Botanica Brasilica**, 30:157-165. 2016.

IGANCI, J. R. V. *et al.* Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

LIMA, Amador Eduardo *et al.* Agronomic performance of ‘Bourbon’s’ group coffee plants populations. **Coffee Science**, v. 11, n. 1, p. 22-32, 2016.

MARAIS, David J.; JAHNKE, Linda L. Biosignatures of cellular components and metabolic activity. *In: Biosignatures for astrobiology*. Springer, Cham. p. 51-85.2019.

MARTINS, Ana Luiza. **História do café**. Editora Contexto, 2012.

MAY, Dayane *et al.* Efeito de extratos de casca de café (*Coffea arabica* L.) na germinação e crescimento de pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, 2011.

MENEGHELLI, AL, E. **Arabica coffee seedlings production in substrate composed by residue from grains drying process**. p. 381–388, 2017.

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. 235 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MINASSA, Elisa Maria Campos *et al.* Coffee straw used as mulch for germination and strength of crops and spontaneous species seedlings. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 49, p. 3410-3414, 2017.

MONTEIRO, Siomara; BRANDELLI, Clara Lia Costa. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017

MOREIRA, Meire Helena *et al.* Interações alelopáticas sobre o desenvolvimento de alface (*Lactuca sativa*, L. cv. Vanda) cultivada em solo cafeeiro. **Revista da UIIPS**, v. 4, n. 4, 2016.

NEVES, J. V. G. **Cascas residuais de café orgânico: composição química, potencial antioxidante, fatores antinutricionais e aplicação tecnológica**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga. 2016.

NGO, Thi Chinh *et al.* Insight into the antioxidant properties of non-phenolic terpenoids contained in essential oils extracted from the buds of *Cleistocalyx operculatus*: a DFT study. **RSC Advances**, v. 6, n. 37, p. 30824- 30834, 2016.

NUNES, Jorge Otávio Silva; DUDA, Rose Maria; DE OLIVEIRA, Roberto Alves. Co-digestão anaeróbia de resíduos produzidos pela bovinocultura leiteira e no beneficiamento do café por via úmida em reatores uasb em série. **Ciência; Tecnologia Fatec-JB**, v. 11, 2019.

OLIVEIRA, Ademir KM *et al.* Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

PEREIRA, G.V.M. et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans—A review. *Food chemistry*, v. 272, p. 441-452, 2019.

PEZZOPANE, José Ricardo Macedo *et al.* Avaliações fenológicas e agrônômicas em café arábica cultivado a pleno sol e consorciado com banana 'Prata Anã'. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 701-709, 2007.

POYRAZ, İlham Eröz *et al.* Volatile compounds of *Coffea arabica* L. green and roasted beans. **Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji**, v. 5, n. 1, p. 31-35, 2016.

REZENDE, G. J. do C.; *et al.* Uso de extrato aquoso de repolho como herbicida natural. **Revista Cultivando o Saber**, v. 9, n. 2, p. 125-136, 2016

RIBEIRO, Bruno Batista *et al.* Perfil sensorial de cultivares de café processados por via seca e via úmida após armazenamento. **Coffee Science** - v.12, n.2, 2017.

RICE, E.L. **Allelopathy**. London, Academic Press Inc, 1984.

SALGADO, Paula Rodrigues. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima**. 2004. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. doi:10.11606/D.11.2005.tde-26042005-145455.

SAMPAIO, Alexandre Bonesso; SCHMIDT, Isabel Belloni. Espécies exóticas invasoras em unidades de conservação federais do Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 2, p. 32-49, 2014.

SANT'ANA, Gustavo C. *et al.* Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in *Coffea arabica* L. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 465, 2018.

SANTOS, H. F. **Características agrônômicas e seleção de progênies de cafeeiro resistentes a *Meloidogyne paranaensis* em área infestada**. 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2017.

SANTOS, Julio Cesar Freitas *et al.* Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Embrapa Acre-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2002.

SILVA, Cristiano Pereira *et al.* Extratos vegetais de espécies de plantas do cerrado sul-mato-grossense com potencial de bioherbicida e bioinseticida. **UNICIÊNCIAS**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

SOUZA, Sérgio Alessandro Machado *et al.* Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 0, 2005.

TAIZ L; ZEIGER. Fisiologia vegetal. 5ª. ed. Porto Alegre, Artmed. 954p. 2013

TAVARES, W.S. *et al.* Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda*

(Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops Products*, v.31, p.384-388, 2009.

TOLEDO, P. R. *et al.* Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, n. 4, p. 705-719, 2016.

TOMAZ, Marcelo Antonio *et al.* Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, 2014.

**PARTE II****ARTIGO I: FITOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES CULTIVARES DE CAFÉ SOBRE O POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE ALFACE**

**AUTORES:** Daniela Vilas Bôas Braga, Pamela Ingrid Alves, João Vitor Calvelli Barbosa, Jade Del Nero Oliveira, Renan Gomes Basto, Kamila Rezende Dázio, Geraldo Alves da Silva, Sandro Barbosa

Artigo redigido conforme as normas da Revista **Iheringia - Série Botânica**

## **Fitotoxicidade e citotoxicidade de diferentes cultivares de café sobre o potencial fisiológico de sementes de alface**

Daniela Vilas Bôas Braga<sup>1\*</sup>, Pamela Ingrid Alves<sup>2</sup>, João Vitor Calvelli Barbosa<sup>3</sup>, Jade Del Nero Oliveira<sup>4</sup>, Renan Gomes Basto<sup>5</sup>, Kamila Rezende Dázio<sup>6</sup>, Geraldo Alves da Silva<sup>7</sup>, Sandro Barbosa<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Parte da dissertação do primeiro autor, Programa de pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Cep 37130-001, Alfenas, MG, Brasil

\*Autor para correspondência: danivbb@ yahoo.com.br

<sup>2,3,4,5,6,7</sup> Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Cep 37130-001, Alfenas, MG, Brasil

<sup>8</sup> Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências da Natureza - ICN, Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Cep 37130000 - Alfenas, MG – Brasil

---

**RESUMO:** Com à finalidade de descobrir novas substâncias com ação bioherbicida, objetivou estudar a viabilidade do uso das folhas e dos epicarpós de café como fonte de aleloquímicos, avaliando as ações fitotóxica e citogenotóxica de extratos aquosos de diferentes cultivares de café em bioensaio com alface. Os resultados foram submetidos à ANOVA e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-knott ( $p \leq 0.05$ ). Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de germinação inicial e final, índice de velocidade de germinação, índice de efeito alelopático, comprimento de parte aérea, alongamento de raiz, índice mitótico e frequência de anormalidades cromossômicas. Constatou-se que os extratos nas concentrações mais altas reduziram os parâmetros avaliados. O aumento gradativo da concentração dos extratos afeta o desempenho germinativo de sementes de alface, além de causar alterações na atividade enzimática e na divisão celular.

**Palavras-chave:** Alelopatia, *Coffea arabica*, germinação, índice mitótico, *Lactuca sativa*

**ABSTRACT:** In order to discover new substances with bioherbicidal action, it aimed to study the feasibility of using coffee leaves and epicarps as a source of allelochemicals, evaluating the phytotoxic and cytogenotoxic actions of aqueous extracts of different coffee cultivars in bioassay with lettuce. The results were submitted to ANOVA and the comparison of means was done by the Scott-knott test ( $p \leq 0.05$ ). The parameters evaluated were: percentage of initial and final germination, germination speed index, allelopathic effect index, shoot length, root elongation, mitotic index and frequency of chromosomal abnormalities. It was found that the extracts in the highest concentrations reduced the evaluated parameters. The gradual increase in the concentration of the extracts affects the germinative performance of lettuce seeds, in addition to causing changes in enzymatic activity and cell division.

**Keywords:** Allelopathy, *Coffea arabica*, germination, mitotic index, *Lactuca sativa*

---

## INTRODUÇÃO

As substâncias que as plantas liberam no ambiente podem interferir favoravelmente ou não, no crescimento e desenvolvimento de outras ao seu redor. A grande maioria dessas substâncias são oriundas do metabolismo secundário de plantas. Esses metabólitos variam em qualidade e quantidade de uma espécie para outra (Rice,1984). Os metabólitos secundários auxiliam na sobrevivência da planta em situações adversas (Rockenbach *et al.* 2018). Essas substâncias conhecidas também como aleloquímicos, se absorvidas pelas plantas ao redor, podem sofrer modificações em sua fisiologia como a alteração nos processos de divisão, o alongamento celular e modificando a ultraestrutura celular, além de influenciar os mecanismos hormonais de indução de crescimento, a permeabilidade das membranas celulares, a abertura estomática, a fotossíntese, a respiração, a síntese proteica, o metabolismo de lipídios e dos ácidos graxos (Formigheiri *et al.* 2018).

Na agricultura moderna, a alelopatia desempenha um papel fundamental na manutenção da sustentabilidade dos agroecossistemas por meio da adoção de estratégias ambientalmente amigáveis, como a rotação de culturas, as culturas de cobertura ou sufocantes, a consorciação, a incorporação de resíduos de culturas, a cobertura morta e os bioherbicidas (Scavo *et al.* 2018).

A infestação de espécies invasoras tem sido reconhecida como uma das maiores ameaças para as espécies nativas e para a biodiversidade em todo o mundo (Travlos et al. 2017). Porém, para atender às necessidades alimentares, a introdução de herbicidas foi indispensável, visto que se fazia necessário reduzir as espécies invasoras e consequentemente aumentar os rendimentos da produção. No entanto, o uso contínuo de herbicidas proporcionou o aumento da poluição ambiental, danos à saúde e ainda contribuiu na resistência das plantas daninhas (Costa & Martins 2015, Silva *et al.* 2018).

A espécie *Coffea arabica* L., representa 75% da produção mundial de café, sendo o Brasil responsável por um terço da produção mundial, consolidando-se como o maior produtor e exportador deste produto, e segundo maior consumidor (Embrapa, 2018). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção estimada para o ano de 2018 foi de 61,7 milhões de sacas beneficiadas. Contudo, essa alta produção gera também uma grande quantidade de resíduos. Segundo Fernandes *et al.* (2013), para cada saca de café produzida tem-se entre 50 a 60 kg de casca e de pergaminho que, de acordo Baqueta *et al.* (2017), ao serem dispostos inadequadamente, podem afetar o meio

ambiente, causando a poluição de solos e de corpos d'águas.

As substâncias químicas mais comuns causadoras de efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, das cumarinas, dos terpenóides, dos flavonóides, dos alcalóides, dos glicosídeos, dos cianogênicos, dos derivados do ácido benzóico, dos taninos e das quinonas complexas (Scavo *et al.* 2018). A literatura cita que os resíduos de café são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como a cafeína, os taninos e os polifenóis (Fernandes *et al.* 2013).

A fitotoxicidade de extratos vegetais é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição, bem como à concentração. Entretanto, existem poucos estudos descrevendo os mecanismos e os modos de ação dos aleloquímicos sobre os eventos celulares ligados às mudanças genéticas e fisiológicas, a maioria refere-se apenas aos efeitos alelopáticos sobre a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Iganci *et al.* 2006). Diante disso, as substâncias alelopáticas representam uma opção a ser seguida na busca pelo controle de planta das daninhas.

A busca por alternativas ao uso de herbicidas na agricultura constitui-se em um dos desafios de modelo de cultivo mais sustentável. Com a finalidade de descobrir novas substâncias com a ação bioherbicidas, propõe-se, no presente trabalho, o estudo da viabilidade do uso de folhas e epicarpo de café (*C. arabica* L.), considerados como resíduos da cafeicultura, como fonte de aleloquímicos, avaliando a ação fitogenotóxica de extratos aquosos das cultivares Acaiá, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio em bioensaio com a alface (*Lactuca sativa* L.) com o objetivo de contribuir para a obtenção de um produto bioherbicida menos agressivo ao meio ambiente e à saúde.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local, coleta e preparo do material vegetal**

As amostras foram coletadas nas fazendas Conquista e Capoeirinha da Ipanema Coffees, na região de Alfenas-MG (21° 25' 46" S 45° 56' 50" W) em junho de 2018, nos horários entre 8h e 11h. As plantas foram selecionadas ao acaso, realizando um caminhamento em zigue zague de acordo com Centurion *et al.* (2013). Para os pontos de coleta em campo foi utilizado GPS, e ainda, foram anotados a localização de cada talhão mediante informação da cultivar e da gleba de acordo com o mapa da fazenda.

Coletou-se 3 kg de material vegetal na região mediana em relação à altura da copa que foram acondicionados separadamente em sacos plásticos, identificados e pesados com o auxílio de uma balança portátil. O procedimento foi realizado em 40 plantas de cada talhão, respeitando o limite de 3 metros das margens limitantes que constitui a parcela amostral. Cada parcela foi formada por 5 linhas de plantio com 20 plantas por linha, sendo as três linhas centrais, a parcela útil.

O material vegetal foi colhido manualmente, selecionando apenas os frutos de café cereja que se encontravam em ponto de maturação fisiológica e as folhas fisiologicamente maduras. As variedades escolhidas foram Acaiá, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio.

O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Biotecnologia e Citogenotoxicidade (Biogen) da UNIFAL/MG. As folhas e os frutos foram lavados e, em seguida foram dispostos em camadas finas e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 43°C até a obtenção de peso constante. O tempo necessário para a completa secagem foi determinado quando o peso de uma amostra, equivalente a 10% do peso do material de cada bandeja, permaneceu constante durante três pesagens consecutivas em balança analítica.

A temperatura da estufa foi controlada por meio de termostato e de termômetro, de modo a garantir a homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem. Após a secagem, o material vegetal passou por divisão manual grosseira. Nesta etapa, as sementes de café foram separadas do pericarpo e do pergaminho. Feito isso, o material vegetal foi pulverizado em moinho e armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

### **Determinação granulométrica e obtenção dos extratos aquosos**

O pó obtido após a moagem foi padronizado quanto ao seu tamanho médio de partícula. A análise granulométrica do material vegetal pulverizado foi executada segundo critérios descritos na Farmacopéia Brasileira e os extratos aquosos de folhas e epicarpós de café foram obtidos pelo método de decocção e liofilizados conforme descritos na Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2010).

### **Determinação do pH e osmolaridade**

Uma solução a 1% (p/v) do material vegetal foi pulverizado em água sendo aquecida até ebulição em chapa-elétrica por 5 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em algodão e gaze. Após o resfriamento foi aferido o pH do filtrado e da água, utilizando o potenciômetro previamente calibrado (Brasil, 2010).

A determinação da influência do potencial osmótico dos extratos foi averiguada com o auxílio de um osmômetro, aferindo apenas a maior concentração (40mg/ml<sup>-1</sup>).

### **Triagem fitoquímica**

Os extratos secos foram dissolvidos separadamente em metanol, a fim de se obter a concentração de 1,0 mg/mL. As análises cromatográficas foram realizadas em placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando a mistura de acetato de etila, metanol, água e ácido acético glacial (81:11:6:2) como fase móvel. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para a identificação dos compostos químicos presentes, 10µL das soluções-amostra e de soluções de padrões autênticos (Sigma<sup>®</sup>) na mesma concentração (1,0 mg/ml<sup>-1</sup>) – rutina, quercetina, ácido gálico, ácido tânico, catequina, quinina, cumarina, antraquinona, cafeína pura e eugenol, foram aplicadas em cada uma das placas. Em seguida, cada placa, separadamente, foi submetida a reveladores diferentes: anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C (identificação geral), NP-PEG (flavonoides), cloreto férrico a 1% (p/v) em metanol (compostos fenólicos), cafeína pura (cafeína), reativo de Dragendorff (demais alcaloides), KOH alcoólico a 5% e visualização em UV 365 nm (cumarinas) e reativo de Bornträger (antraquinonas).

Todas as classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (Wagner; Bladt; Zgainsky, 2009).

### **Ensaio de fitotoxicidade**

Os bioensaios foram conduzidos em placas de Petri (7 cm de diâmetro) contendo duas folhas de papel Germitest umedecidas com 3mL de solução, nas diferentes concentrações de extrato (5mg/ml<sup>-1</sup>, 10mg/ml<sup>-1</sup>, 20mg/ml<sup>-1</sup> e 40mg/ml<sup>-1</sup>) preparados a partir da solução estoque de 20% e água destilada como controle. Foram utilizadas 30 sementes de *L. sativa*

por placa, cultivar Babá de verão, adquiridas diretamente da empresa (Isla<sup>®</sup>). As placas foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Foram realizadas observações a cada 4 horas, anotando-se o número de sementes germinadas em cada tratamento para cálculo da germinabilidade e do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme apresentado por Maguire (1962). A partir dos dados de germinação foi calculado do índice de efeito alelopático (RI) conforme Borella, Martinazzo e Aumonde (2011).

No sétimo dia de avaliação todo material contido nas placas foi pesado compondo a biomassa fresca (BF). O alongamento de raiz (AR) e o comprimento de parte aérea (CPA) foram mensurados a partir de 10 plântulas selecionadas sendo as medidas realizadas no sétimo dia de germinação com o auxílio de paquímetro digital (DIGIMESS<sup>®</sup> 150mm). O material foi armazenado em sacos de alumínio e levados para estufa a 40°C com circulação de ar por 7 dias para secagem e a obtenção da biomassa seca (BS).

### **Ensaio de citotoxicidade**

As avaliações citogenéticas foram realizadas nas mesmas condições descritas no bioensaio de fitotoxicidade, entretanto, as raízes foram coletadas com 24 e 48 horas após o início do experimento. Todas as sementes que apresentaram a protusão radicular foram coletadas, fixadas em Carnoy (álcool etílico PA e ácido acético na proporção de 3:1) e armazenadas em freezer a -18°C. As preparações foram feitas pelo método de esmagamento, conforme Pereira *et al.* (2013).

Os meristemas apicais foram hidrolisados com ácido clorídrico 5,0 M a 25 ° C e corados com reagente de Schiff. O índice mitótico (IM) foi determinado usando a equação  $MI = NCM \times 100 / NTC$ , onde NCM é o número de células em mitose e NTC é o número total de células observadas. Foram analisadas 6000 células por tratamento com o auxílio de microscópio de campo claro. Analisou-se também as anormalidades cromossômicas de acordo com os seguintes critérios: C-metáfases, anáfase e pontes cromossômicas em telófase, cromossomos perdidos, viscosidade e presença de micronúcleos.

### **Atividade Antioxidante Enzimática e Peroxidação Lipídica**

Devido ao grande número de amostras, para análise da atividade enzimática e da peroxidação lipídica foi escolhido apenas uma cultivar e um órgão vegetal, sendo o critério de escolha aquela cultivar e órgão vegetal que apresentou a melhor resposta nos ensaios de fitotoxicidade e genotoxicidade.

Para a extração de enzimas antioxidantes, 200 mg de matéria fresca de plântulas inteiras foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1,5 mL de tampão de extração. As amostras foram centrifugadas a 13.000 giros por 10 min a 4 ° C, e os sobrenadantes foram coletados para análises enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), conforme relatado por Biemelt *et al.* (1998). A atividade enzimática foi avaliada espectrofotometricamente e expressa por grama de massa fresca.

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima inibir a fotoredução fotoquímica do azul de nitro tetrazólio (NBT), proposto por Giannopolitis & Ries (1978). Uma unidade de SOD foi definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução de NBT. As leituras foram realizadas a 560 nm em um espectrofotômetro. A atividade da CAT foi determinada pela redução na absorvância a 240 nm a cada 15 s durante 3 min, monitorizada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (Havir & Michale, 1987). A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o coeficiente de extinção foi = 36mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). A atividade da APX foi determinada pela redução da absorvância a 290 nm a cada 15 s por 3 min, segundo Nakano & Asada (1981). Observou-se a queda na absorvância pelo consumo do ascorbato. O coeficiente de extinção molar foi de 2,8mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA= malondialdeído), conforme descrito por Buege & Aust (1978). A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: [MDA] = (A535 - A600) / (ξ.b), onde ξ (coeficiente de extinção = 1,56×10<sup>-5</sup>cm<sup>-1</sup>); b (comprimento óptico = 1).

### **Delineamento experimental e análise de dados**

Para o ensaio de fitotoxicidade, o delineamento adotado foi em blocos casualizado (DBC) com 3 repetições, sendo cada repetição considerada um bloco, em esquema fatorial

3x5x4x2 sendo os fatores: blocos, concentrações, cultivares e órgãos vegetais (folha e pericarpo), respectivamente. Para o ensaio de citotoxicidade o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) seguindo o mesmo fatorial descrito anteriormente.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa Sisvar versão 5.4.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química dos extratos de epicarpos e folhas das cultivares Acaiá, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio, revelou uma variação de pH, entre 4,9 e 5,4 para epicarpos, e 5,8 e 6,6 para folha. O potencial osmótico dos extratos dos epicarpos variou de - 0,0953 a -0,1703 Mpa e das folhas de -0,0635 a -0,1657 Mpa (Tab. 1).

**Tabela 1-** Características físico-químicas dos extratos aquosos de epicarpos e folhas de *C. arabica* L.

Tratamento	pH	Potencial Osmótico (Mpa)
<b>Epicarpos</b>		
Controle	6,9	0
Acaiá	5,4	-0,1544
Bourbon	5,0	-0,1249
Catuaí	5,1	-0,0953
Topázio	4,9	-0,1703
<b>Folhas</b>		
Controle	6,9	0
Acaiá	5,8	-0,0999
Bourbon	6,0	-0,1612
Catuaí	6,1	-0,1657
Topázio	6,6	-0,0635

Gatti et al., (2004) recomendam que o potencial osmótico dos extratos envolvidos nos testes de germinação não exceda o valor de -0,2 MPa. Já os valores de pH, de acordo com Baskin & Baskin (1998), estão dentro do intervalo que não influencia no processo germinativo de *L. sativa*.

A detecção de compostos do metabolismo secundário por meio de triagem fitoquímica dos extratos aquosos de diferentes cultivares de café investigados neste estudo, revelou a presença de flavonóides, compostos fenólicos, cafeína e taninos para as folhas e de compostos fenólicos, cafeína e taninos para os epicarpos (Tab.2).

**Tabela 2-** Triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

Metabólito Secundário	Epicarpós				Folhas			
	Acaiá	Bourbon	Catuaí	Topázio	Acaiá	Bourbon	Catuaí	Topázio
<b>Flavonoides</b>	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Comp. Fenólicos</b>	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Cafeína</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Alcalóides</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Antraquinona</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Taninos</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Saponinas</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

De acordo com Ashihara *et al.* (2017), a cafeína é o alcaloide encontrado em maior quantidade em diversos tecidos e órgãos do cafeeiro, principalmente nas sementes, flores e folhas. Segundo Waller *et al.* (1986), a cafeína é sintetizada no pericarpo, transportada e acumulada no endosperma da semente durante o desenvolvimento do fruto.

Foram feitas as análises granulométricas dos pós obtidos dos epicarpós e das folhas de café e de acordo com critérios da Farmacopéia Brasileira, o pó obtido pode ser classificado como pó semifino (Brasil, 2010).

Ao comparar a ação do extrato aquoso dentro de cada tratamento nas primeiras 24 horas, nota-se um atraso na germinação das sementes de *L. sativa*, observando que quanto maior a concentração utilizada, maior o efeito. Ainda nesta variável, ao comparar as cultivares e os órgãos vegetais, percebe-se que os mesmos seguem o padrão de concentração, ou seja, o efeito é dependente da dose. Com isso, pode-se sugerir que o efeito inibitório é dependente da concentração e independente da cultivar e/ou do órgão vegetal, embora os extratos oriundos das folhas apresentem efeito alelopático mais acentuado (Tab.3).

**Tabela 3-** Sementes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas e casca de *C. arabica*, cultivares Acaiaí, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo e Topázio.

Trat	Conc [mg.ml <sup>-1</sup> ]	G24h (%)	GF (%)	IVG	RI	CPA (mm)	AR (mm)	BF
Pericarpo de Acaiaí	0	96,66 a A	100,00 a A	8,14 a A	0,00 a A	24,50 a B	33,42 a A	0,47 a A
	5	83,33 b B	98,88 a A	6,77 b C	-0,05 a A	28,67 a A	18,21 b C	0,53 a A
	10	72,22 b C	100,00 a A	5,44 c D	-0,09 a A	28,71 a A	10,08 c E	0,42 a A
	20	2,22 c F	94,44 a A	2,49 d F	-0,47 b D	5,95 b E	2,75 d F	0,24 b B
	40	0,00 c F	2,22 b F	0,04 e G	-0,99 c F	0,00 c F	0,00 e G	0,18 b C
Pericarpo de Bourbon	0	98,88 a A	100,00 a A	8,53 a A	0,00 a A	24,69 a B	30,45 a A	0,49 a A
	5	88,88 b B	100,00 a A	6,98 b B	-0,04 a A	28,76 a A	16,13 b D	0,55 a A
	10	81,11 b B	98,88 a A	5,83 c C	-0,08 a A	26,79 a B	8,24 c E	0,38 a A
	20	4,44 c F	94,44 a A	2,61 d F	-0,45 b D	5,45 b E	1,83 d G	0,13 b C
	40	0,00 c F	7,77 b F	0,15 e G	-0,97 c F	0,00 c F	0,00 e G	0,07 b C
Pericarpo de Catuaí	0	97,77 a A	98,88 a A	8,65 a A	0,00 a A	25,47 a B	28,71 a B	0,49 a A
	5	83,33 b B	97,77 a A	6,34 b B	-0,07 b A	25,82 a B	15,56 b D	0,46 a A
	10	67,77 c C	100,00 a A	5,17 c D	-0,14 b B	25,71 a B	15,60 b D	0,35 a A
	20	0,00 d F	95,55 a A	2,18 d F	-0,58 c E	9,30 b D	4,34 c F	0,20 b B
	40	0,00 d F	2,22 b F	0,39 e G	-0,94 d F	0,00 c F	0,03 d G	0,09 b C
Pericarpo de Topázio	0	95,55 a A	98,88 a A	9,33 a A	0,00 a A	23,00 a B	26,30 a B	0,45 a A
	5	86,66 a B	97,77 a A	6,69 b B	-0,05 b A	25,76 a B	18,58 b C	0,46 a A
	10	84,44 a B	98,88 a A	6,06 c C	-0,02 a A	24,97 a B	14,52 c D	0,41 a A
	20	2,22 b F	92,33 a A	2,06 d F	-0,60 b E	11,96 b D	3,26 d F	0,21 b B
	40	0,00 b F	45,55 b D	0,83 e G	-0,87 c F	0,71 c F	1,04 d G	0,10 b B
Folha de Acaiaí	0	97,77 a A	100,00 a A	8,67 a A	0,00 a A	23,09 a C	30,18 a A	0,50 a A
	5	87,77 a B	100,00 a A	5,92 b C	-0,05 a A	33,78 b A	14,45 b D	0,40 a A
	10	46,66 b D	97,77 a A	4,50 c D	-0,21 b B	29,15 b B	8,43 c E	0,44 a A
	20	24,44 c E	85,55 b B	3,48 d F	-0,39 c C	16,16 c D	7,91 c E	0,26 b B
	40	0,00 c F	4,44 c F	0,08 e G	-0,98 c F	0,24 d G	0,07 d G	0,07 c C
Folha de Bourbon	0	94,44 a A	98,88 a A	8,21 a A	0,00 a A	25,16 a A	33,09 a A	0,48 a A
	5	92,22 a A	98,88 a A	6,93 b B	-0,05 a A	32,83 a A	14,45 b D	0,59 a A
	10	61,11 b C	95,55 a A	4,66 c D	-0,15 b B	32,97 a A	8,91 c E	0,50 a A
	20	2,22 c F	68,88 b C	1,92 d E	-0,59 c E	13,83 b D	5,14 d F	0,19 b B
	40	0,00 c F	4,44 c F	0,08 e G	-0,98 d F	0,00 c G	0,04 e G	0,06 b C
Folha de Catuaí	0	95,55 a A	100,00 a A	8,28 a A	0,00 a A	25,26 a C	31,03 a A	0,46 a A
	5	94,44 a A	98,88 a A	7,14 b B	-0,01 a A	33,47 b A	12,71 b D	0,59 a A
	10	57,77 b D	97,77 a A	5,08 c D	-0,18 b B	32,44 b C	7,67 c E	0,44 a A
	20	3,33 c F	66,66 b C	1,00 d E	-0,62 c E	16,28 a D	4,54 d F	0,21 b B
	40	0,00 c F	3,33 c F	0,07 e G	-0,99 d F	0,24 d G	0,06 e G	0,06 c C
Folha de Topázio	0	93,33 a A	100,00 a A	8,04 a A	0,00 a A	23,47 a C	28,56 a B	0,44 a A
	5	91,11 a A	98,88 a A	6,73 b B	0,00 a A	29,57 b B	14,58 b D	0,52 a A
	10	65,55 b C	96,66 a A	5,04 c D	-0,14 b B	35,35 b A	9,06 c E	0,40 a A
	20	4,44 c F	82,22 b B	2,35 d E	-0,54 c E	14,51 c D	5,81 d F	0,23 b B
	40	0,00 c F	21,11 c E	0,44 e G	-0,91 d F	3,41 d F	1,62 e G	0,08 c C

Médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística entre si (Letra minúscula: Referente à concentração dentro de cada tratamento/ Letra maiúscula: referente à comparação entre as cultivares e aos órgãos).

Ao final do experimento, a germinabilidade das sementes de *L. sativa* submetidas à ação dos extratos de epicarpós de diferentes cultivares de café não mostrou diferença significativa nas concentrações 5mg/ml<sup>-1</sup>, 10 mg/ml<sup>-1</sup> e 20mg/ml<sup>-1</sup> em relação ao tratamento controle. O mesmo padrão foi observado ao comparar-se as cultivares. Por outro lado, nos tratamentos com as folhas de café, ao comparar a porcentagem de germinabilidade dentro de cada tratamento e entre as cultivares, apenas as concentrações 5mg/ml<sup>-1</sup> e 10mg/ml<sup>-1</sup> não se diferiram estatisticamente, mostrando que a concentração 20mg/ml<sup>-1</sup> dos extratos

de folhas promove um atraso mais acentuado na germinação quando comparada ao extrato de epicarpos. Já na concentração  $40\text{mg/ml}^{-1}$ , o tratamento epicarpos de Topázio apresentou porcentagem de germinação superior a 40% e o tratamento folhas de Topázio apresentou porcentagem de germinação final superior de 20% (Tab. 3).

A aplicação de extrato de epicarpos e folhas de café não inibiu totalmente a germinação nos tratamentos utilizando a concentração  $20\text{mg/ml}^{-1}$ . Contudo, houve redução na formação de plântulas normais e maior sensibilidade na raiz, podendo ser observadas anomalias como engrossamento e encurvamento, além de necrose. Segundo Pereira *et al* (2013), a germinação da *L. sativa* é mais comprometida em concentrações mais altas, pois o embrião é afetado, acarretando a diminuição do percentual de germinação. Porém, em concentrações mais baixas o pericarpo e o tegumento funcionam como uma barreira protetora. Para Silva (2015), essas alterações podem estar relacionadas com o efeito sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do material genético, reações enzimáticas e a respiração celular. E de acordo com Maraschin-Silva & Aquila (2006), as alterações no padrão de germinação e no índice de germinação indicam interferências nas reações metabólicas. E ainda, os extratos podem provocar o aumento na entropia informacional, causados por sementes com germinação mais lenta. Isso demonstra perda de sincronia nas reações metabólicas da germinação e heterogeneidade na fisiologia das sementes tratadas.

Muitas vezes o efeito alelopático não é sobre o percentual final de germinação, mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo (Ferreira & Borghetti 2004). O IVG é um parâmetro utilizado para mostrar que mesmo em baixas concentrações os compostos podem alterar a fisiologia das sementes testadas (Ribeiro *et al.* 2012). Já o índice de efeito alelopático (RI) serve para mostrar se houve estímulo ou inibição da germinação. Quando apresenta valores positivos em relação ao controle indica estímulo e valores negativos, inibição (Borella *et al.* 2010). Ao analisar o IVG, nota-se que todos os tratamentos diferiram do controle (Tab.3).

Analisando a variável índice de efeito alelopático (RI), todos os tratamentos utilizando folhas de café, a partir da concentração  $10\text{mg/ml}$  apresentaram efeito alelopático (Tab.3).

Ao analisar a variável comprimento de parte aérea (CPA), observa-se que nos tratamentos folha de Acaiá, folha de Catuaí e folha de Topázio ao avaliar o efeito da

concentração dentro de cada tratamento, nota-se que as concentrações  $5\text{mg/ml}^{-1}$  e  $10\text{mg/ml}^{-1}$ , propiciou um estímulo em relação aos controles e na variável alongamento de raiz (AR), todos os tratamentos foram diferentes dos controles (Tab.3).

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de epicarpis e de folhas de café promoveu efeito estimulante na parte aérea nas concentrações  $5\text{mg/ml}^{-1}$  e  $10\text{mg/ml}^{-1}$  e efeito inibitório nas raízes das plântulas de *L. sativa* (Fig.1).



**Figura 1** - Plântulas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas e epicarpis de diferentes cultivares de *C. arabica*, no 7º dia após o início do experimento, onde: A: Controle, B:  $5\text{mg/ml}^{-1}$ ,  $10\text{mg/ml}^{-1}$ ,  $20\text{mg/ml}^{-1}$ ,  $40\text{mg/ml}^{-1}$ .

Estes resultados estão em concordância com a afirmação de Lorenzi (2000), de que a ação alelopática de extratos aquosos pode ser tanto inibitória como estimulante ao crescimento de outras plantas e corroboram com os resultados obtidos por Santos *et al.* (2002) e May *et al.* (2011), onde o extrato obtido da epicarpis de café propiciou tanto o estímulo quanto a inibição no desenvolvimento das plântulas de caruru-de-mancha e pepino, respectivamente.

O aumento da concentração do extrato ocasionou redução estatisticamente significativa no crescimento da radícula. Em geral, as raízes são mais sensíveis às substâncias presentes nos extratos comparativamente às demais estruturas da plântula

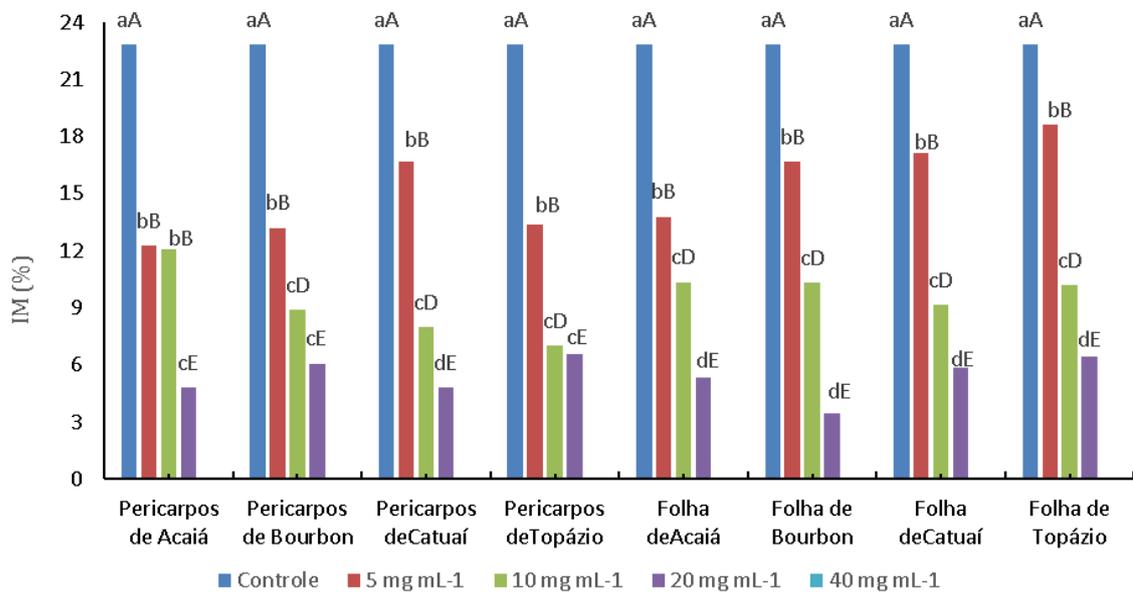
(Chon & Nelson 2010). Esta ocorrência deve-se ao fato das raízes estarem em contato direto e prolongado com o extrato e aos aleloquímicos (Chung *et al.* 2001, Aquila *et al.* 2004). Assim, é possível inferir que nas concentrações de 20 mg/ml e 40mg/ml, o crescimento da radícula foi afetado, indicando que concentrações mais elevadas do extrato possuem capacidade fitotóxica em plântulas de *L. sativa*.

Na variável biomassa fresca (BF), ao comparar a concentração, nota-se que as menores concentrações foram estatisticamente iguais ao controle. Ao passo de que a partir de 20 mg/ml<sup>-1</sup> fica evidente a redução da biomassa (Tab.3). Tal variável corrobora com as análises de AR e CPA, as quais sofreram redução estatística significativa a partir dessa concentração.

De acordo com Cheng & Cheng (2015), os aleloquímicos podem alterar o conteúdo de reguladores de crescimento de plantas ou induzir desequilíbrios em vários fitohormônios, além de exercerem diferentes efeitos sobre a síntese, funções, conteúdos e atividades de várias enzimas, assim, comprometendo o desenvolvimento das plântulas que estão em contato direto e ainda, na atividade enzimática, a fosforilase, enzima envolvida na germinação de sementes, pode ser inibida pelo ácido clorogênico, ácido caféico e catecol. E ainda, os compostos fenólicos podem aumentar a atividade da fenilalanina amônio-liase (PAL) e da  $\beta$ -glicosidase, enquanto reduzem a atividade da fenol- $\beta$ -glicose transferase, inibindo assim o crescimento das raízes.

Segundo Waller *et al.* (1986), a cafeína é sintetizada no pericarpo, transportada e acumulada no endosperma da semente durante o desenvolvimento do fruto e perfaz de 1 a 2% da massa seca de sementes de cafeeiro ou média de 40mM. Baumann *et al.* (1984) observaram a germinação de *C. arabica*, e com isso sugeriram que a cafeína presente na semente do café teria um importante papel ecológico na germinação da espécie, pois a mesma seria responsável tanto por proteger as plântulas contra competidores no solo, quanto contra os predadores pelo seu acúmulo nas partes vegetativas da planta.

Por meio das análises citogenéticas foi possível avaliar os efeitos dos extratos de folhas e epicarpós de café sobre o material genético de *L. sativa*. Raízes de *L. sativa* submetidas aos extratos de folhas e de epicarpós de diferentes cultivares de café apresentaram menores índices mitóticos, diferindo estatisticamente do controle (Fig. 2).



**Figura 2:** Índice mitótico (IM) de sementes de *L. sativa* colocadas em extrato aquoso de diferentes cultivares de *C. arabica*. Colunas com a mesma cor seguida correspondem as concentrações. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (Letra minúscula: Referente à concentração dentro de cada tratamento/ Letra maiúscula: referente à comparação entre as cultivares e aos órgãos vegetais).

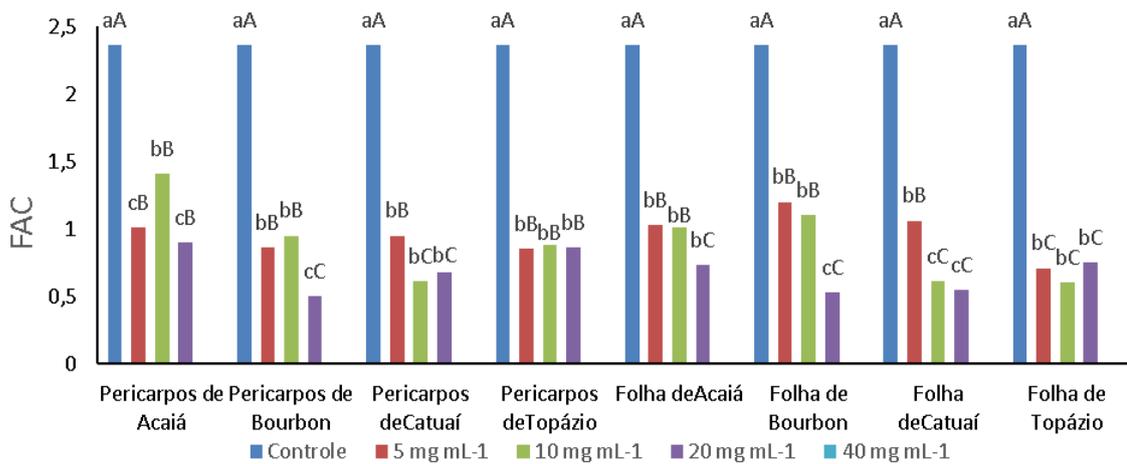
Os índices mitóticos obtidos para raízes expostas aos extratos foram significativamente diferentes entre si de maneira dose-dependente, na qual o aumento da concentração diminuiu a atividade mitótica. A concentração 20mg/ml-1 foi a que apresentou índices menores revelando alta porcentagem de células em interfase e baixa porcentagem de células em divisão. Na concentração de 40mg/ml<sup>-1</sup> não foi possível coletar material. Os resultados encontrados nessa variável, corroboram com os resultados encontrados em alongamento de raiz.

O índice mitótico foi reduzido em comparação ao controle. Para justificar a diminuição do IM, pode-se relacionar a ação direta dos aleloquímicos nas células e as alterações metabólicas provocadas pelos mesmos. Os dados do índice mitótico obtido neste estudo foram semelhantes ao relatado por Iganci *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2013), demonstraram que os extratos reduziram o índice mitótico e o alongamento de raiz das plantas testadas.

Durante o crescimento das raízes, o número de células em divisão no tecido meristemático está relacionado com a duração da mitose no ciclo celular. O número de células em uma fase de divisão é proporcional ao tempo gasto por essa fase em relação ao comprimento total da mitose (Kiełkowska 2017). As raízes tratadas com extrato de epicarpis e folhas de diferentes cultivares de café, alterou significativamente quando

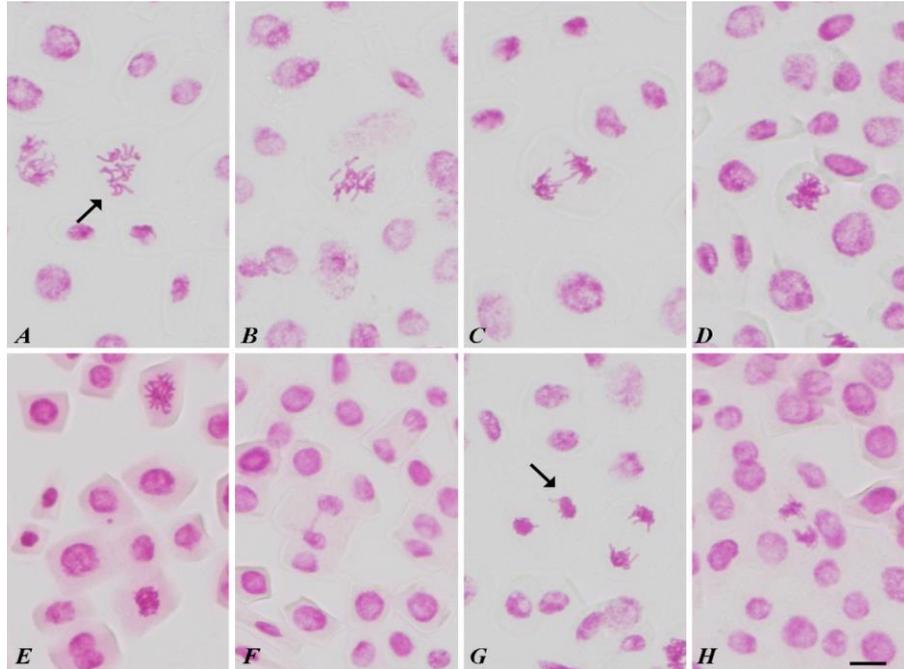
comparadas ao controle. O número de células em divisão diminuiu à medida que aumentou a concentração dos extratos, enquanto no tratamento controle foram observadas proporções quase iguais de células em metáfase, anáfase e telófase. Estes resultados sugerem um aumento na duração do ciclo de divisão celular nos tratamentos com os extratos.

A análise do ciclo celular também revelou diminuição significativa nas alterações citogenéticas nas células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos extratos de folhas e epicarpós de café. Para o tratamento controle, foram observadas anormalidades cromossômicas nas raízes de *L. sativa*, entretanto, as raízes expostas aos extratos apresentaram menor frequência de anormalidades cromossômicas (Fig.3).



**Figura 3:** Frequência de anormalidades cromossômicas (FAC) de sementes de *L. sativa* colocadas em extrato aquoso de diferentes cultivares de *C. arabica*. Colunas com a mesma cor seguida correspondem as concentrações. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (Letra minúscula: Referente à concentração dentro de cada tratamento/ Letra maiúscula: referente à comparação entre as cultivares e aos órgãos vegetais).

Em meristemas radiculares de *L. sativas* expostas aos extratos, a frequência de anormalidades foi menor. Foram observadas anormalidades como micronúcleos (MN), pontes em anáfase (PA) e telófase (PT), c-metáfases (CM), stickiness (ST), cromossomos perdidos (CP), cromossomo atrasado em anáfase (CAA) e telófase (CAT). Sendo as anormalidades mais encontradas: micronúcleos, C-metáfase, stickiness e cromossomos perdidos (Fig. 4).



**Figura 4:** Anormalidades cromossômicas identificadas nas pontas de raízes de *L. sativa*. (A) C-metáfase. (B) Cromossomo perdido. (C) Ponte em anáfase. (D) stickiness. (E) Micronúcleo. (F) Ponte em telófase. (G) Cromossomo atrasado em telófase. (H) Cromossomo atrasado em anáfase

De acordo com Silva *et al.* (2015), o índice mitótico e as anormalidades cromossômicas são utilizados para avaliar citotoxicidade e análise de micronúcleos para verificar mutagenicidade das substâncias. Os MN são pequenos fragmentos de DNA encontrados no citoplasma das células, podendo originar-se por fragmentos acêntricos ou por perda total de cromossomos na anáfase, sendo produzidos por estresse genotóxico e pela exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos. Não se prendem ao fuso mitótico e com isso, não chegam aos polos celulares durante o ciclo de divisão celular (Meneguetti 2011, Durante & Formenti 2018).

A formação de MN observada neste estudo pode ser uma consequência de fragmentos cromossômicos ou cromossomos em atraso que não incorporam aos núcleos. Os extratos de ambos os órgãos vegetais testados causaram a diminuição da atividade mitótica e o número de anomalias cromossômicas.

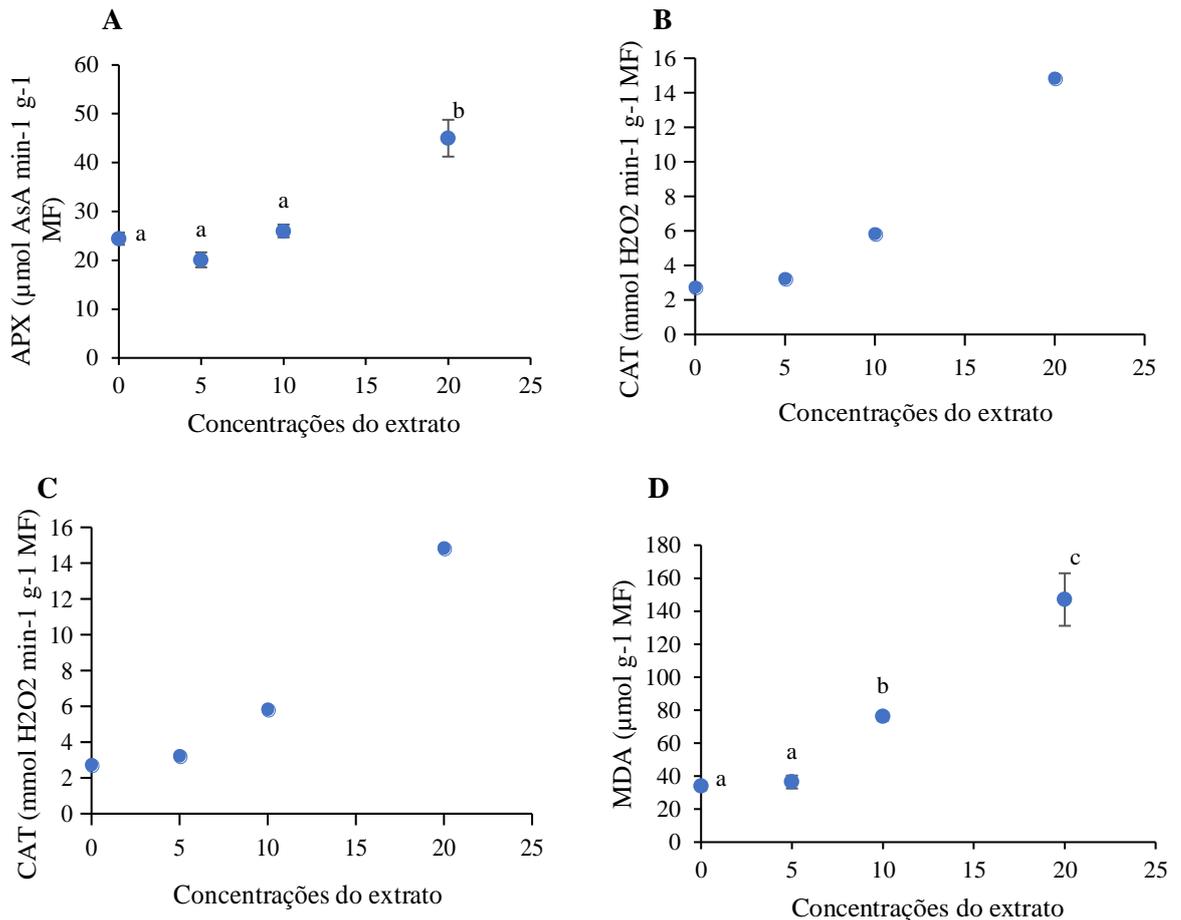
Aragão *et al.* (2017), citam que a presença de stickiness indica a formação de complexos entre o agente tóxico e os grupos fosfatos do DNA. Que a presença de C-metáfase indica efeito aneugênico, pois o fuso mitótico é inativado e isso pode levar a formação de micronúcleos. E cromossomos perdidos indicam a presença de ligações cruzadas entre moléculas de DNA e entre DNA e proteínas.

Friedman & Waller (1983), citado Ferreira & Aquila (2000), Souza Filho, Trezzi e Inoue (2011) e Cuadrado *et al* (2018), ao avaliar por 4 semanas sementes de *C. arabica* L. cv. Bourbon, expostas à solução aquosa de cafeína, observaram que houve uma redução de hipocótilo e inibição quase que completa das raízes e ainda, a divisão celular foi inibida e ocorreu o bloqueio na formação de placas celulares. Os autores afirmam que a cafeína é autotóxica para o café, pois é capaz de inibir a germinação e desenvolvimento bem como bloquear a mitose de células em plântulas dessa espécie, alegando que a cafeína é a principal substância alelopática encontrada no cafeeiro. Diante dessa afirmação, é possível inferir que a cafeína pode ser um dos principais metabólitos responsáveis pelos efeitos fitotóxico e citotóxico dos extratos testados.

### **Atividade Antioxidante Enzimática e Peroxidação Lipídica**

As cultivares Acaiá, Bourbon Amarelo e Catuaí Amarelo apresentaram respostas estatisticamente iguais tanto no ensaio de fitotoxicidade quanto no ensaio de citotoxicidade, diante disto, escolheu-se a cultivar Catuaí Amarelo, visto que o parque cafeeiro nacional ainda tem predominância de cultivares dos grupos Mundo Novo e Catuaí (Mapa, 2019).

Nas concentrações  $5\text{mg/ml}^{-1}$  e  $10\text{mg/ml}^{-1}$  não foi observado danos ocasionados às plântulas, provavelmente devido ao sistema antioxidativo manter o equilíbrio entre a formação e a degradação das espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, a concentração  $20\text{mg/ml}^{-1}$  promoveu estresse às plântulas, estimulando acentuadamente a elevação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX (Fig. 11 A, B e C). Analisando a peroxidação lipídica medida como MDA, as concentrações  $10\text{mg/ml}^{-1}$  e  $20\text{mg/ml}^{-1}$  exibiu as maiores concentrações de MDA (Fig. 5D).



**Figura 5-** (A) Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX), (B) catalase (CAT), (C) superóxido dismutase (SOD) e (D) peroxidação lipídica (MDA), em raízes de plântulas de *L. sativa* sob diferentes concentrações de extrato de folhas de *C. arabica* cv. Catuaí amarelo.

Em condições de estresse, as plantas produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), que em condições extremas causam danos oxidativo progressivo e conseqüentemente a morte celular (Seifikalhor *et al.* 2019). As espécies reativas de oxigênio podem facilmente difundir-se pela bicamada lipídica movendo-se do cloroplasto para o citosol (Cataneo *et al.* 2005). Tem sido demonstrado que as espécies reativas de oxigênio desempenham muitos papéis multifuncionais críticos nas vias de sinalização e no desenvolvimento das plantas, incluindo resposta de defesa, morte celular, fechamento dos estômatos e desenvolvimento dos pelos radiculares (Azarabadi *et al.* 2017).

Uma análise geral dos resultados obtidos permite inferir que a elevação na atividade das enzimas antioxidantes não foi suficiente para evitar o estresse oxidativo e eliminar a

formação das espécies reativas de oxigênio que provavelmente, são resultantes do efeito tóxico do extrato sobre o metabolismo de plântulas de *L. sativa* refletindo na diminuição do crescimento, especialmente nas maiores concentrações do extrato de folhas de Catucaí Amarelo.

A peroxidação lipídica (MDA) elevou em resposta ao estresse imposto pelo aumento da concentração do extrato de folhas de Catucaí Amarelo. A elevação nos teores de espécies reativas de oxigênio provavelmente conduziu à elevação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX. É possível inferir que a elevação da atividade destas enzimas não foi suficiente para a eliminação dos radicais livres, com reflexos no aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio e consequente peroxidação lipídica, com danos ao sistema de membranas celulares, resultando no aumento da incidência de plântulas anormais que foram observadas no ensaio de fitotoxicidade quando plântulas de *L. sativa* foram expostas à concentração 20mg/ml<sup>-1</sup>.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.* (2017), ao avaliarem a ação do extrato de *L. multiflorum* sobre sementes de *L. sativa*. Yan *et al.* (2015), mostraram que além do aumento da atividade enzimática e da concentração de MDA, a utilização de artemisinina em sementes de *L. sativa*, promoveu a diminuição significativa do IM nas células meristemáticas. De acordo Almeida *et al.* (2008), a ação dos aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, motivo pelo qual torna-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos. Contudo, está comprovado que vários mecanismos de ação dos aleloquímicos podem afetar os processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura de estômatos, nível de fitohormônios, disponibilidade mineral, divisão e alongamento celular, estrutura e permeabilidade de membranas e parede celular, sendo que muitos desses processos ocorrem em função do estresse oxidativo.

Alguns estudos têm demonstrado que a cafeína apresenta atividade antioxidante. Contudo, há controvérsias em relação a esta atividade (Paula *et al.* 2016). Segundo Birben *et al.* (2012), em doses moderadas o estresse oxidativo parece oferecer estímulos que ativam os sistemas de defesa antioxidante, ativando genes que codificam enzimas defensivas, fatores de transcrição e proteínas estruturais. Contudo, em doses elevadas, a produção de espécies reativas de oxigênio, vem sendo associado a mudanças nas estruturas

do DNA, danos aos tecidos e aumento de apoptose.

## CONCLUSÃO

Das cultivares analisadas todas demonstraram ter efeito fitotóxico e genotóxico. Efeito este que se deu em função da concentração de extrato utilizada e não pela cultivar ou órgão vegetal, embora o efeito apresentado pela folha mostrou ser mais acentuado. Foi observado o aumento da atividade enzimática e da concentração de MDA, bem como uma diminuição da germinação das sementes de *L. sativa* que provavelmente está ligada à superprodução de espécies reativas de oxigênio.

Em conclusão, pode-se inferir que o extrato aquoso de folhas e epicarpós de diferentes cultivares de *C. arabica* induziu a superprodução de espécies reativas de oxigênio, o que levou à peroxidação lipídica, seguida da redução da vitalidade celular e a parada mitótica, o que provavelmente acarretou a redução da germinação e inibição do crescimento de sementes de *L. sativa*. Diante disso, esses resíduos mostram ter potencial para o desenvolvimento de um bioherbicida, e ainda serve como uma alerta aos produtores que costumam dispor os epicarpós em lavouras alegando que os mesmos podem ser usados como adubos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), à CAPES, à FAPEMIG, ao CNPq e à Ipanema Coffees.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, Gustavo Dias et al. Estresse oxidativo em Células vegetais mediante aleloquímicos. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- Aragão, Francielen Barroso et al., Fitotoxicidad y citotoxicidad de los extractos de *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) en la planta modelo *Lactuca sativa* (Asteraceae). Revista de Biología Tropical, v. 65, n. 2, p. 435- 444, 2017.
- Ashihara, Hiroshi et al. Xanthine alkaloids: occurrence, biosynthesis, and function in plants. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 105. Springer, Cham. p. 1-88.

2017.

- Azarabadi, Saeidreza et al., Ros generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS- scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L.). *European Journal of Plant Pathology*, v. 147, n. 2, p. 279- 294, 2017.
- Baqueta, M.R. et al., Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal epicarpós de café. *Brazilian Journal of Food Research*, v.8, n.2, p.68, 2017.
- Biemelt, S.; Keetman, U.; Albrecht, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology, Rockville*, v. 116, p. 651-658, Feb. 1998.
- Birben, Esra et al., Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.
- Borella, Junior; Celia Maria, T. U. R.; Pastorini, Lindamir Hernandez. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica*. *Revista Biociências*, v. 16, n. 2, 2010.
- Borella, Junior; Martinazzo, Emanuela Garbin; Aumonde, Tiago Zanatta. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. 3, p. 398, 2011.
- Brasil. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010. 523 p.
- Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology, San Diego*, v. 52, p. 302-310, Feb. 1978.
- Cataneo, Ana Catarina et al., Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 4, n. 2, p. 23-31, 2005.
- Centurion, Lucas et al., Monitoramento fenológico do cafeeiro em Lavouras de Lavras, MG, nos anos agrícolas 2011-2012 e 2013–Projeto SIMAFF. 2013.
- Cheng, Fang; Cheng, Zhihui. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in plant science*, v. 6, p. 1020, 2015.
- Chon, S.-U.; Nelson, C. J. Allelopathy in Compositae plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 30, n. 2, p. 349-358, 2010.
- Chung, I. M.; Ahn, J. K.; Yun, S. J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop protection*, v. 20, n. 10, p. 921-928, 2001.

- Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Monitoramento Agrícola - Safra 2017/2018, v. 3, n. 9, P.1- 182, 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2018.
- Costa, Leidiane Eulália Chaves; Martins, Érica Soares. Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 12, n. 2, p. 99-106, 2015.
- Costa, R. S. C.; Santos, J. C. F.; Leonidas, F. das C. Alternativas de manejo de plantas daninhas para a cultura do café em Rondônia. Embrapa Rondônia-Comunicado Técnico (Infoteca-E), 2001.
- Cuadrado, Isabel Maniega et al. Actividad alelopática de la cafeína en plántulas de trigo y lenteja. *Ambiociencias*, n. 4, p. 29-36, 2018.
- Durante, Marco; Formenti, Silvia C. Radiation-induced chromosomal aberrations and immunotherapy: micronuclei, cytosolic DNA, and interferon-production pathway. *Frontiers in oncology*, v. 8, 2018.
- Fernandes, et al., Redução da adubação mineral do cafeeiro arábica com a utilização de palha de café. *Coffee Science, Lavras*, v. 8, n. 3, p. 324-336, jul./set. 2013.
- Ferreira, Alfredo Gui; Aquila, Maria Estefânia Alaves. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.
- Formigheiri, Felix B. et al., Alelopatia de *Ambrosia artemisiifolia* na germinação e no crescimento de plântulas de milho e soja. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 41, n. 3, p. 151-160, 2018.
- Friedman, Jacob; Waller, George R. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of chemical ecology*, v. 9, n. 8, p. 1099-1106, 1983.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. *Plant Physiology, Rockville*, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.
- Havir, E. A.; Mchale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology, Rockville*, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- Iganci, J. R. V. et al., Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arq. Inst. Biol.*, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.
- Kiełkowska, Agnieszka. *Allium cepa* root meristem cells under osmotic (sorbitol) and salt (NaCl) stress in vitro. *Acta Botanica Croatica*, v. 76, n. 2, p. 146-153, 2017.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa. Registro nacional de cultivares – RCN. Disponível em:

[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php). Acesso em: 10 de julho 2019.

- Maraschin-Silva, Fabiana; Aqüila, Maria Estefânia Alves. Allelopathic potential of native species in *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) germination and initial growth. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.
- May; Dayane et al., Efeito de extratos de casca de café (*Coffea arabica* L.) na germinação e crescimento de pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. 2, 2011.
- Meneguetti, D. U. de O. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. *Revista Pesquisa; Criação*. V 10, N 2, p. 181-187, 2011.
- Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- Paula, R.A., et al., Avaliação do efeito antioxidante da bebida de café solúvel cafeinado e descafeinado In vitro e In vivo. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 3, 2016.
- Pereira, Márcio Paulo et al., Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.
- Ribeiro, Luciene de Oliveira et al., Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 2, 2012.
- Rice, E.L. Allelopathy. London, Academic Press Inc, 1984.
- Rockenbach, Ana Paula et al., Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018.
- Santos, Julio Cesar Freitas et al., Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. Embrapa Acre-Artigo em periódico indexado (Alice), 2002.
- Scavo, Aurelio; Restuccia, Alessia; Mauromicale, Giovanni. Allelopathy: principles and basic aspects for agroecosystem control. *In: Sustainable Agriculture Reviews 28*. Springer, Cham. p. 47-101. 2018.
- Seifikalhor, Maryam et al., Diverse role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. *Plant cell reports*, p. 1-21, 2019.
- Silva, A.P., et al., Evaluation toxicity, cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluation of *Turnera*

- ulmifolia* L.(chanana) in eukaryotic cells. Saúde em Foco, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2015.
- Silva, Eduardo SO; Marafon, Glaucio José; Seabra, Rogério dos S. O desencanto da terra: Produção de alimentos, ambiente e sociedade. Editora Garamond, 2018.
- Silva, T. A. et al., Ação do extrato de *Lolium multiflorum* Lam. sobre atributos fisiológicos de sementes e plântulas de alface. Iheringia. Série Botânica., v. 72, n. 1, p. 9-5, 2017.
- Souza Filho, A. P. S.; Trezzi, M. M.; Inoue, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (Alice), 2011.
- Waller, G.R.; Kumari, D.; Friedman, J.; Friedman, N.; Chou, C.H. Caffeine Autotoxicity in *Coffea Arabica* L. In: Putnan, A.; Tang, C.S. (Ed.). The Science of Allelopathy. New York: John Wiley, p.243-263, 1986.