



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SCHIRLEY AP. COSTALONGA

**Avaliação dos efeitos alelopáticos e mutagênicos
de formas extrativas de *Passiflora edulis* Sims
por meio do bioensaio *Allium cepa*.**

Vitória
2009

SCHIRLEY AP. COSTALONGA

**Avaliação dos efeitos alelopáticos e mutagênicos
de formas extrativas de *Passiflora edulis* Sims
por meio do bioensaio *Allium cepa*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.
Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Marcieni Ataíde de Andrade

VITÓRIA
2009

Costalonga, Schirley Aparecida.

Avaliação dos efeitos alelopáticos e mutagênicos de formas extrativas de *Passiflora edulis* Sims por meio do bioensaio *Allium cepa* / Schirley Aparecida Costalonga. – 2009.

71p.

Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas.

1. Alelopatia. 2. Mutagenicidade. I. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Departamento de Ciências Biológicas. III. Título.

SCHIRLEY AP. COSTALONGA

**Avaliação dos efeitos alelopáticos e mutagênicos
de formas extrativas de *Passiflora edulis* Sims
por meio do bioensaio *Allium cepa*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 15 de dezembro de 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Marcieni Ataíde de Andrade
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

À Deus, toda honra e glória por mais uma vitória, mais uma barreira superada e por colocar em minha vida pessoas maravilhosas.

À minha amada mãe, Maria de Lourdes Costalonga, por sempre estar disposta a apoiar-me incondicionalmente e por ter me ensinado sempre o valor de uma boa educação. Se hoje posso dizer com orgulho tudo o que consegui, é graças à senhora; essa vitória é nossa!

À minha família e amigos, por compreenderem as inúmeras vezes em que estive ausente e pela torcida constante.

Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), em especial aos colegas da Gerência de Recursos Naturais (GRN), por me permitirem a conclusão desta etapa.

À Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade, pela co-orientação e por fazer parte da banca.

À Prof^a Dr^a Valéria Fernandes, por seu apoio desde a graduação, por ter lido a primeira versão deste trabalho e contribuído para sua melhoria e por fazer parte da banca.

À uma pessoa essencial, sem a qual nada disso teria acontecido: Prof^a Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci. Chamá-la de orientadora é muito pouco para definir o que você significa para mim. Sua amizade e apoio nos momentos mais difíceis foram importantíssimos para mim. Obrigada por toda sua dedicação, apoio e amor.

Ao Ricardo Celestino, secretário do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, por sempre estar disponível a me ajudar. Obrigada por sua amizade.

À FAPES, pela bolsa de estudos.

"Entre a lembrança do passado e a expectativa do futuro, há uma estreita passagem chamada **Agora**, em que o tempo não entra."

Autor Desconhecido

COSTALONGA, Schirley Aparecida. MSc. Universidade Federal do Espírito Santo. Dezembro de 2009.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ALELOPÁTICOS E MUTAGÊNICOS DE FORMAS EXTRATIVAS DE *Passiflora edulis* Sims, POR MEIO DO BIOENSAIO *Allium cepa*.

RESUMO

O ser humano desenvolveu a arte de utilizar as plantas para diversas finalidades, como instrumento terapêutico poderoso e alternativa de controle biológico. O teste de *Allium cepa* é uma eficiente ferramenta na identificação de substâncias danosas aos animais e vegetais. Dentre as espécies nativas que necessitam de estudos que esclareçam sobre seus potenciais medicinais e alelopáticos encontra-se *Passiflora edulis* (maracujá amarelo), largamente utilizada como fitoterápico no Brasil; além disso, produz inúmeras substâncias com potencial alelopático, porém sem estudos aprofundados. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos alelopáticos e mutagênicos exercidos por quatro extratos foliares e dois infusos de *P. edulis* sobre sementes de *A. cepa* submetidas aos tratamentos contínuo e descontínuos agudo e crônico em meio contendo água destilada, três concentrações dos extratos (1, 2 e 5 mg/mL) ou três concentrações dos infusos (10, 50 e 100%). Houve um acentuado potencial alelopático para o extrato etanólico, cujas concentrações reduziram os índices de germinação e velocidade de germinação; para os extratos hexano e acetato de etila, os mesmos resultados só foram obtidos nas concentrações de 2 e 5 mg/mL e para o extrato diclorometano, apenas na maior concentração. Os infusos mesocárpico e foliar não alteraram a capacidade e o tempo de germinação. Quanto ao desenvolvimento radicular, nenhuma modificação foi relatada. O índice mitótico foi afetado em todas as concentrações dos extratos avaliados, na concentração de 100% do tratamento contínuo, todas as concentrações do tratamento descontínuo agudo e nas concentrações de 10 e 100% do tratamento descontínuo crônico do infuso mesocárpico. Efeitos aneugênicos foram observados somente na concentração de 1 mg/mL do extrato diclorometano e tratamento descontínuo crônico 100% do infuso foliar. Efeitos clastogênicos ocorreram apenas em 2 mg/mL do extrato acetato de etila no tratamento descontínuo agudo e 2 mg/mL do extrato etanólico no tratamento contínuo. As sementes tratadas por 72h com 1 e 2 mg/mL de acetato de etila sofreram crescimento anormal de suas raízes e não responderam à coloração. Houve aumento de células mortas e micronúcleos em todos os tratamentos descontínuos crônico. Os resultados obtidos indicam a profunda relação entre os efeitos alelopáticos e mutagênicos e reforçam a importância de estudar as espécies nativas. Para que haja maior segurança no uso de *P. edulis* pelo homem, será necessária a realização de testes em animais.

Palavras-chaves: Alelopatia, mutagenicidade, *P. edulis*, Teste de *A. cepa*.

COSTALONGA, Schirley Aparecida. MSc. Universidade Federal do Espírito Santo. Dezembro de 2009.

EVALUATION OF ALLELOPHATIC AND MUTAGENIC EFFECTS OF EXTRACTIVES FORMS OF *Passiflora edulis* Sims, THROUGH *Allium cepa* BIOASSAY.

ABSTRACT

The human being use plants for different things, like powerful medicine instrument and biological control. The *Allium cepa* system is a efficient tool for identify dangerous substances for animals and vegetables. *Passiflora edulis* is a native plant used abundantly as phytoteraphic in Brazil; besides it produce many substances with allelophatic potencial, but without intense studies. Thus, the aim was evaluated the allelophatic and mutagenic effects of four leave extracts and two infusions of *P. edulis* over *A. cepa* seeds treaty with continuous and discontinuous acute and chronics treatments in middle with water, three concentration of extracts (1, 2 e 5 mg/mL) or three concentrations of infusions (10, 50 e 100%). Happened a accentuated allelophatic potential for the ethanolic extract, which reduced the germination and speed's germination index; for the hexane and acetate extracts, same results were obtained for 2 e 5 mg/mL concentration and for dichlorometane extract, only in the major concentration. Didn't have changes on this parameters when mesocárpico and leave infusions were used. For the roots developments, none change was reported. The mitotic index was affected in all three extracts' concentrations, in 100% of continuous treatments, all concentration of acute discontinuous and 10 e 100% of chronic treatment with mesocarpic infusion. Aneugenic effects were related only in 1 mg/mL of dichlorometane extract and 100% acute discontinuous treatment of leave infusion. Clastogenic effects happened in 2 mg/mL of acetate extract in acute discontinuous treatment and 2 mg/mL of ethanolic extract in continuous treatment. The seeds treated with 1 e 2 mg/mL of acetate extract for 72h presented abnormal roots growth and didn't response for coloration. Happened elevated number of dead cells and in all chronic discontinuous treatment. The results above denote the deep relation between the allelophatic and mutagenic effects and reinforce the importance of study the native species. For more security concerning the use of *P. edulis* for human beings, advice the establish tests in animals.

Key words: Allelophaty, mutagenicity, *P. edulis*, *A. cepa* system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Flor, folhas e frutos de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	29
Figura 2 – Fruto do maracujá, destacando a região do mesocarpo.....	34
Figura 3 - Sementes de <i>A. cepa</i> germinadas em controle negativo; em destaque, semente com emissão de radícula.....	39
Figura 4 – Porcentagem de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de <i>P. edulis</i>	41
Figura 5 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de <i>P. edulis</i>	43
Figura 6 – Porcentagem de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	45
Figura 7 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	45
Figura 8 – Porcentagem de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	46
Figura 9 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	46

Figura 10 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações dos extratos de <i>P. edulis</i>	48
Figura 11 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	49
Figura 12 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	49
Figura 13 – Fotomicrografia esquematizando um ciclo de divisão celular normal, com suas respectivas fases.....	53
Figura 14 - Índice Mitótico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato foliar de <i>P. edulis</i>	54
Figura 15 - Índice Mitótico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	55
Figura 16 - Índice Mitótico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	55
Figura 17 – Fotomicrografia representando alterações no ciclo celular que caracterizam efeito aneugênico; as setas destacam (a) – C-metáfase; (b) – anáfase multipolar; (c) – telófase com atraso; (d) - anáfase com perda cromossômica; e (e) – metáfase com perda cromossômica.....	57

Figura 18 – Índice de Efeito Aneugênico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de <i>P. edulis</i>	58
Figura 19 – Índice de Efeito Aneugênico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	59
Figura 20 - Índice de Efeito Aneugênico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	59
Figura 21 – Fotomicrografia representando alterações no ciclo celular que caracterizam efeito clastogênico; as setas destacam (a) – aderência; (b) – micronúcleo em prófase; (c) – micronúcleo em interfase; (d - e) – telófase com ponte cromossômica; e (f) – morte celular.....	60
Figura 22 – Índice de Efeito Clastogênico nas sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações dos extratos.....	61
Figura 23 - Índice de Efeito Clastogênico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de <i>P. edulis</i>	62
Figura 24 - Índice de Efeito Clastogênico das sementes de <i>A. cepa</i> em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de <i>P. edulis</i>	62
Figura 25 – Comparação entre o tamanho de (a) - uma radícula sem alteração e (b) - a radícula de uma semente submetida ao tratamento descontínuo crônico com extrato acetato de etila.....	63

Figura 26 – Semente de *A. cepa* tratadas com o extrato acetato de etila, apresentando bifurcação da região meristemática.....63

Figura 27 – Fotomicrografia de células meristemáticas de *A. cepa* (a) – células normais, com núcleo diferenciado pela coloração com Reativo de Schiff; (b) – células submetidas ao tratamento descontínuo crônico com as concentrações de 1 e 2 mg/mL do extrato acetato de etila, onde se observa alteração na permeabilidade celular, não sendo possível diferenciar o núcleo.....64

Figura 28 – Fotomicrografia de células radiculares de *A. cepa* submetidas ao tratamento descontínuo crônico, que continuam unidas por ponte.....65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVOS	09
2.1 OBJETIVO GERAL.....	09
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	09
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 O DESENVOLVIMENTO DA ALELOPATIA	10
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	13
3.3 A GERMINAÇÃO COMO AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA	14
3.4 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS AO LONGO DA HISTÓRIA	15
3.5 FITOTERAPIA NO BRASIL.....	19
3.5.1 Legislação brasileira	22
3.6 A TOXICIDADE VEGETAL E VALIDAÇÃO DE FITOTERÁPICOS	23
3.7 MUTAGENICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS E O BIOENSAIO <i>ALLIUM</i> <i>CEPA</i>	27
3.8 <i>Passiflora edulis</i> : USOS MEDICINAIS	29
3.8.1 Constituintes químicos e princípios ativos	30
3.8.2 Propriedades medicinais e alelopatia	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ÁREA DE ESTUDOS E MATERIAL VEGETAL.....	33
4.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DOS EXTRATOS FOLIARES.....	34
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA SOBRE O SISTEMA-TESTE <i>Allium</i> <i>cepa</i>	35

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA SOBRE O SISTEMA-TESTE <i>Allium</i> <i>cepa</i>	36
4.4.1 Preparação citológica e análise das lâminas	37
4.4.2 Análise dos efeitos mutagênicos	37
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO	39
5.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA	47
5.3 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO	52
5.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE EFEITO ANEUGÊNICO.....	57
5.5 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE EFEITO CLASTOGÊNICO	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

A história humana no planeta Terra mescla-se com a evolução vegetal; plantas e animais coexistem há milhares de anos e, desde os primórdios, influenciam ativamente os rumos da humanidade, pois ao buscar na natureza recursos que lhe proporcionassem uma melhor qualidade de vida e, conseqüentemente, elevasse sua sobrevivência, o ser humano pôde abandonar o hábito nômade e a vida nas florestas para se estabelecer em sociedade; é o surgimento de uma postura ereta, dieta variada e início da colonização dos continentes e das civilizações como as conhecemos. Desde então, sua busca por soluções que pudessem facilitar seu dia-a-dia e aplacar suas dores foi sempre incessante (BALESTRIN, 2006). Nesse contexto, os vegetais têm sido utilizados como fonte de alimento, matéria prima para fabricação de roupas, em rituais religiosos e, principalmente, para tratamento de doenças, devido à sua abundância na natureza e fácil obtenção (BLANCO, 2007).

Nosso país é imensamente privilegiado, uma vez que nas florestas tropicais se encontra a maior biodiversidade do planeta e nossa riquíssima flora possui um enorme potencial ainda escassamente explorado quanto aos metabólitos secundários produzidos por ela que, ao competir por luz, água e nutrientes, concorrem constantemente com outras espécies para aumentar suas chances de sobrevivência no ecossistema, podendo, assim, interferir no ciclo de vida de outros vegetais (ALVES et al., 2004). Balestrin (2006, p. 16) comenta que,

“Diversos autores têm apontado [para] a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais. Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres, das quais são conhecidos aproximadamente 50.000 metabólitos secundários [porém a maioria sem estudos aprofundados quanto a sua toxicidade sobre outros organismos]”.

Neste panorama, é importantíssimo que espécies nativas sejam bem pesquisadas, principalmente em nosso país, onde a grande diversidade botânica pode apresentar infinitas potencialidades no uso de seus recursos. Dentre os parâmetros que necessitam ser explorados, estão seu uso como medicamento e sua toxicologia; para isso, torna-se imprescindível a realização de estudos que investiguem os potenciais alelopático e mutagênico das mesmas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos alelopáticos e mutagênicos de diferentes extratos foliares e dos infusos mesocárpico e foliar de *P. edulis* através do sistema-teste *A. cepa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial tóxico, aneugênico e clastogênico de diferentes extratos foliares e do infuso do mesocarpo de *P. edulis* sobre o desenvolvimento inicial de células meristemáticas radiculares de *A. cepa*.
- Inferir sobre possíveis efeitos alelopáticos exercidos por diferentes extratos foliares e pelos infusos mesocárpico e foliar de *P. edulis* sobre germinação de sementes de *A. cepa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O DESENVOLVIMENTO DA ALELOPATIA

Por serem organismos sésseis, as plantas necessitaram desenvolver, ao longo de sua evolução, eficientes mecanismos que possibilitassem uma defesa eficaz contra predadores, ao mesmo tempo em que as auxiliassem na competição com outros vegetais, aumentando suas vantagens adaptativas. Cada espécie vegetal aperfeiçoou esse mecanismo e desenvolveu um conjunto de compostos de defesa (LARCHER, 2006), cujos efeitos compreendem o que chamamos de toxicidade biogênica ou alelopatia¹, uma forma de interação bioquímica entre vegetais, definida como interferência (direta ou indireta) provocada pela liberação, no ambiente, de substâncias naturais oriundas de seu metabolismo secundário e que, ao serem liberadas, seja na água, no solo, substrato ou volatilizadas no ar, afetam o desenvolvimento de outras plantas (LIMA et al., 2004). Segundo Rice (apud Ferreira e Aquila, 2000), o termo alelopatia pode ser extrapolado para os efeitos benéficos ou maléficos exercido por biomoléculas liberadas por microorganismos.

Para autores como Harborne e Almeida (apud PERIOTO, 2003, p.1), a alelopatia é muito mais complexa do que isso, podendo ser considerada um “componente de interferência, caracterizando-se pela introdução de novos fatores no meio ambiente, os compostos químicos, o que a distingue da competição, que se dá pela retirada ou redução dos mesmos [...]”. Para Ferreira e Aquila (2000), alelopatia e competição são realmente distintas, embora possam estar intimamente relacionadas:

“Na natureza, alelopatia pode ser confundida com competição, [todavia], o efeito alelopático consiste na liberação de um composto químico pela planta no ambiente, ao passo que competição é a remoção ou redução de um fator ambiental, [necessário à outra planta], tal como água, luz, minerais, etc.”.

Historicamente, o estudo das interações alelopáticas foi inicialmente mais intenso entre espécies cultivadas e não cultivadas; recentemente, contudo, dados focando

¹ O termo foi primeiramente usado por Molish em 1937 e deriva do grego *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo); contudo, os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um mesmo composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo de sua concentração no ambiente (Ferreira; Áquila, 2000).

espécies nativas têm aumentado significativamente e esse campo de conhecimento é uma área emergente da ecofisiologia², porque

“[...] pesquisas envolvendo alelopatia oferecem ilimitadas oportunidades para contribuir com o aumento do conhecimento da química e da biologia de relações interespecíficas e na resolução de problemas práticos da agricultura. Desse modo, a alelopatia tem sido relatada como ferramenta útil à regeneração de florestas, recuperação de áreas degradadas, problemas com ervas invasoras, rotação de culturas, consorciação de espécies e adubação verde. [...] Além disso, é, também, reconhecida como importante mecanismo ecológico que influencia a dominância vegetal, a sucessão, a formação de comunidades vegetais e de vegetação clímax; assim, a composição florística de determinada área pode ter o modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas liberadas no ambiente” (PERIOTO, 2003).

A percepção da existência da alelopatia ocorreu desde o início do cultivo de vegetais; o primeiro registro acerca da interferência de uma planta sobre o desenvolvimento de outra ocorreu em 300 a.C, com Theophrastus propondo que *Cicer arietinum* exauria o solo onde se encontrava, limitando o surgimento de outras espécies no local; em 1 d.C, Plínio relatou problemas nas culturas de sua cidade e aventou a teoria de que seriam provocados por outras plantas ali existentes (GATTI, 2003). Documentos japoneses datados de 300 anos atrás descrevem que produtos químicos das folhas de *Pinus densiflora*, quando lixiviados pela chuva ou orvalho, prejudicavam as culturas sob suas copas.

Contudo, o assunto começou a ser mais frequentemente discutido em meados do século XIX, com De Candolle expondo sua teoria de que o cansaço das terras submetidas a décadas consecutivas de monocultura, era resultado do acúmulo de aleloquímicos³ exsudados pela cultura, a qual passava a afetar seu próprio desenvolvimento; outros trabalhos reportaram que uma espécie de noqueira afetava as plantas ao seu redor (BLANCO, 2007). No início do século XX, Schreiner e Reed identificaram no solo um ácido orgânico liberado pelas raízes e que inibiam o crescimento de algumas culturas (GATTI, 2003). Dependendo da planta, os efeitos podem diminuir acentuadamente o crescimento e produtividade vegetal.

² Ciência que estuda as respostas vitais das plantas quanto submetidas às mudanças nos fatores ambientais (LARCHER, 2006).

³ Termo primeiramente cunhado por Wittaker e Feeny em 1971, sendo definido como agentes químicos de importância essencial para a adaptação de espécies e organização das comunidades (CORRÊA, 2008).

Sczczepanski, em 1977, por considerar a amplitude do conceito *alelopatia*, o dividiu em três categorias distintas:

“*Alelospolia* ou competição, onde organismos provocam a retirada ou redução de fatores do ambiente, como água, etc., [...]; *alelomedicação* ou interferência indireta, onde as alterações são causadas no ambiente por organismos, com reflexo nos seres vizinhos, como a escolha seletiva de um herbívoro; e *alelopatia* [propriamente dita], interferência causada por substâncias químicas produzidas por certos indivíduos e que no ambiente afetam outros [membros] da comunidade” (PIRES e OLIVEIRA apud GATTI, 2003).

Em 1978, Putnam & Duke introduziram os termos *planta doadora* (que libera substâncias químicas) e *planta receptora* (afetada pelos compostos lançados pelo doador), relatando que a principal função dos produtos secundários é a proteção dos organismos que os produzem e que uma mesma substância poderia desempenhar inúmeras funções, dependendo de sua concentração, rotas de translocação e liberação (Dandelot et al., 2008).

Einhellig relatou, em 1995, diversos mecanismos de ação dos aleloquímicos nos organismos vegetais, onde podem atuar como hormônios (como a giberelina), na fotossíntese e morfologia celular, permeabilidade de membranas, etc. (PERIOTO, 2003), além de afetar a germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas já estabelecidas e contribuir para o desenvolvimento de microorganismos (TEIXEIRA et al., 2005).

Na tentativa de melhor classificar a alelopatia, Miller (em 1996) a desmembrou em *autotoxicidade*, efeito dos exudados vegetais sobre a mesma espécie da planta que os liberou; e *heterotoxicidade*, quando uma planta produz substâncias que influenciarão o desenvolvimento de outra espécie vegetal. A vantagem da primeira seria manter o espaçamento entre indivíduos para prevenir o desenvolvimento de predadores e patógenos, bem como promover polinização cruzada (GATTI, 2003).

Os estudos alelopáticos possuem inúmeras dificuldades e na tentativa de minimizar algumas delas, certos autores utilizam em seus bioensaios sementes nativas; no entanto, sementes de espécies cultivadas são as mais utilizadas, entre elas, as de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*), por serem altamente sensíveis às diferentes concentrações de aleloquímicos, mesmo que estas sejam baixas; outras peculiaridades que destacam seu uso incluem: germinação rápida (em

aproximadamente 24h), possibilitando obtenção de respostas em curto período experimental, crescimento linear e ampla tolerância às variações de pH (MAIRESSE et al., 2007, STEIN et al., 2008).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo vegetal pode ser dividido em *primário*, onde são produzidas substâncias essenciais ao desenvolvimento da planta, e *secundário*, cujos produtos originados (metabólitos secundários, fitoquímicos ou aleloquímicos) não possuem relação direta com a saúde vegetal⁴, porém são oriundos dos metabólitos primários e desempenham papéis importantíssimos no sucesso evolutivo dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2003). Evolutivamente, são originados por mutações⁵ e, por proporcionarem vantagens aos seus produtores em relação aos seus vizinhos que não os possuíam, foram selecionados pela seleção natural (Ferreira; Áquila, 2000).

Todas as plantas os produzem, todavia, são específicos às espécies vegetais ou a um grupo relacionado e sua produção varia em relação ao órgão onde são sintetizados, estágio do ciclo de vida vegetal, forma de liberação, estações do ano, estado nutricional e estresse, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes às quais as plantas estão expostas (LARCHER, 2006).

Esses metabólitos representaram um importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas, combatendo patógenos e predadores; além disso, são responsáveis diretos pela prevenção da decomposição das sementes, influem na dormência das gemas, atração de polinizadores e dispersores de sementes (TEIXEIRA et al., 2005). Seus mecanismos de ação podem ser diretos ou indiretos sobre a planta alvo. Os efeitos indiretos incluem alterações nas características nutricionais do solo; já os efeitos diretos, englobam alterações no crescimento e no metabolismo vegetal (PERIOTO, 2003).

⁴ Na verdade, alguns metabólitos secundários possuem papel importantíssimo nas funções vitais das plantas; um exemplo é o hormônio giberelina, imprescindível ao desenvolvimento desses organismos (TAIZ; ZEIGER, 2003).

⁵ Os primeiros compostos secundários eram basicamente protetores, como resinas, ligninas e flavonóides; com a evolução das angiospermas e o surgimento das espécies herbáceas, os tipos de produtos secundários foram ampliados (LARCHER, 2006).

Dentre as diversas substâncias químicas com propriedades alelopáticas, destacam-se os ácidos fenólicos, cumarina, saponinas, glicosídeos, terpenos, alcalóides, esteróides e flavonóides. Na maioria dos casos, esses compostos não causam nenhum efeito sobre a planta-alvo, pois são liberados sozinhos e em baixas concentrações (SOUZA et al., 2002). Whittaker (apud GATTI, 2003) defende que, nas células vegetais, os aleloquímicos ficam isolados nos vacúolos, a fim de evitar sua própria autotoxicidade; somente quando estão em grande quantidade e/ ou em interação com vários aleloquímicos é que a alelopatia se estabelece.

3.3 A GERMINAÇÃO COMO AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA

A maioria das pesquisas em alelopatia refere-se aos efeitos sobre a germinação e o crescimento do organismo-teste, desconsiderando os efeitos celulares e moleculares relacionados às mudanças fisiológicas. Contudo, é fundamental lembrar que os efeitos visíveis dos fitoquímicos sobre o organismo vegetal são apenas uma sinalização secundária de mudanças anteriores; desta forma, interferências sobre germinação e/ou desenvolvimento radicular apenas espelham eventos ocorridos em nível molecular e celular (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Segundo Maraschin-Silva e Áquila (2007), dentre os efeitos diretos sobre a planta resultantes da alelopatia, a germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém muito mais fácil de ser observado (a semente germina ou não). Como citado por Stein et al. (2008),

[...] compreende uma seqüência de eventos fisiológicos, influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes; cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais. Em síntese, [...] germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica”.

Desta forma, para uma efetiva verificação dos efeitos alelopáticos, é importante avaliar não somente detalhes sobre a germinação, mas também comprimento da radícula, já que este parâmetro expõe resultados mais específicos que o primeiro.

No início do século XX, foi descoberto que a luz é um importante fator regulador da germinação de muitas espécies; algumas sementes germinam somente com

extensa exposição à luz e outras com breve exposição. Em geral, os fatores luz e temperatura agem em conjunto sobre a germinação; com relação à temperatura, esta pode afetar as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo (RAVEN, et al., 2001). Todavia, de todos os fatores, a água é o que mais influência o processo germinativo; uma vez que o movimento da água para o interior da semente ocorre graças à capilaridade e difusão, indo do maior para o menor potencial hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2003; LARCHER, 2006); com a embebição, ocorre reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, intensificação das atividades metabólicas, fornecendo energia e nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião. Por outro lado, o excesso de umidade tende a provocar decréscimo na germinação, impedindo a penetração do oxigênio e reduzindo todo o processo metabólico resultante (STEIN et al., 2008).

3.4 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS AO LONGO DA HISTÓRIA

As plantas são utilizadas pelo homem como medicamentos há milênios; o processo de evolução da “arte da cura” não exigiu conhecimentos científicos na exploração dos recursos fitoterápicos existentes nas ervas que os circundavam; a descoberta das propriedades curativas dos vegetais foi – à priori – meramente empírica, por tentativas de erros e acertos e pela observação dos animais que buscavam nas plantas solução para suas afecções (FERRO, 2006; JARDIM et al., 2001). A constatação da existência nas plantas de algo capaz de provocar reações benéficas ao organismo (princípio ativo⁶), embora tenha ocorrido de forma lenta e gradual, converteu e ampliou vagarosamente a cultura da utilização de plantas como instrumento terapêutico, repassando-a às gerações seguintes e preservando-a até os dias atuais. O uso de fitoterápicos, ou medicamentos cujo efeito terapêutico possui origem em matérias-primas vegetais e em seus extratos, caracteriza uma das terapêuticas mais procuradas atualmente, a fitoterapia (SIMÕES et al., 2000). Segundo Shrestha e Dhillion (2003), aproximadamente 60% da população mundial, 80% em países em desenvolvimento, dependem diretamente dos vegetais em seus propósitos curativos.

⁶ Substâncias encontradas nas plantas medicinais e cuja ação farmacológica é responsável pelo poder terapêutico das mesmas (MARTINS et al., 1995; FERRO, 2006).

De acordo com Ferro (2006, p. 10):

Fitoterapia (do grego *therapeia* - tratamento e *phyton* - vegetal) é um ramo da alopatia que utiliza fitoterápicos (medicamento tecnicamente obtido e elaborado que contenha exclusivamente princípios ativos vegetais) para o tratamento de enfermidades.

Resquícios mais antigos desta prática remontam do ano 5000 a.C., quando, de acordo com Lorenzi e Matos (2008, p. 11),

A simples observação das variações sazonais mostradas pelas plantas certamente deslumbrou os primeiros observadores da natureza, que provavelmente viam nos vegetais, grande sabedoria em antecipar as estações do ano, assim como uma força admirável em ressurgir do lodo ou do solo após as vicissitudes climáticas. Tal admiração deve ter criado um respeito místico, que certamente contribuiu para o uso ritual das plantas [...], elevando-as a categoria de entidades divinas [...].

Em 3000 a.C., quando acreditava-se que as doenças eram um castigo por pecados cometidos, surgiram os primeiros documentos escritos, referenciando muitas plantas consideradas medicinais, como canela, salgueiro, figo, etc. (MARTINS et al., 1995).

A cultura milenar chinesa estuda desde seus primórdios os efeitos da flora sobre a saúde humana e isso ocorreu paralelamente à acupuntura; imperadores chineses apoiavam essas investigações e muitas vezes agiam como cobaias humanas, testando as plantas em si mesmos (FERRO, 2006). Atualmente, nenhuma nação supera a China na utilização de medicamentos naturais; neste país só se recorre à alopatia⁷ tradicional quando não se encontra uma alternativa na flora chinesa (BIESKI, 2005; VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

No Egito por volta do ano 2000 a.C. as plantas eram usadas na mumificação, em tratamento de patologias internas, ginecológicas e dermatológicas; papiros da época do faraó Ramsés I detalhavam mais de 800 fórmulas medicinais utilizadas (SCHNEIDER, 1984; FERRO, 2006). Os gregos – além das terapias tradicionais - realizavam rituais míticos com os vegetais, pois acreditavam que a saúde resultava de um equilíbrio de forças naturais e as propriedades curativas das plantas ratificavam a existência dos deuses; Theophrastus, considerado o pai da botânica,

⁷ Sistema da medicina criado por Hipócrates que visa tratar as doenças por meios contrários a elas, procurando conhecer suas causas e combatê-las (FERREIRA; FERREIRA, 2001). Tradicionalmente utiliza quimioterápicos.

publicou um tratado compilando todos os conhecimentos existentes na época sobre as ervas medicinais (FERRO, 2006). Hipócrates, o pai da medicina, indicava em sua obra o efeito terapêutico de ervas para diversas doenças (MARTINS et al., 1995).

Por volta de 78 d.C., Dioscórides, em suas explorações com o exército romano, recolheu preciosas informações sobre as plantas que encontrava e as reuniu no tratado *De Materia Medica*, considerado referência em toda Roma e Arábia e que representa um marco no conhecimento de numerosos fármacos (FERRO, 2006).

Os primeiros relatos de uso das plantas na forma de extratos e infusões ocorreram entre 131-201 d.C.; de acordo com Ferro (2006, p. 3), “[...] eram usados solventes como álcool, água ou vinagre [...] para conservar e concentrar os componentes ativos das plantas[...]”.

Essa época de intenso incentivo ao desenvolvimento da fitoterapia foi abruptamente interrompida na Idade Média, quando todo o “saber” era controlado pela Igreja e o uso de ervas na cura de afecções era considerado ato de bruxaria; somente os monges e sacerdotes de alguns mosteiros europeus poderiam fazer uso de tais tratamentos. Esse cenário obscuro só tem fim com a Renascença e a exploração de novos territórios, como o Brasil, acaba trazendo à luz novos conhecimentos adquiridos pelos povos nativos e que são passados aos exploradores.

Ao longo dos primeiros séculos da Idade Moderna, universidades criavam jardins botânicos para incentivar as pesquisas (FERRO, 2006), que foram gradativamente sendo retomadas com a publicação de inúmeras obras sobre os poderes curativos vegetais; com o desenvolvimento da química moderna e o isolamento de compostos vegetais para fabricação de fármacos sintéticos, o conhecimento popular passou a ser considerado quase irrelevante e, novamente, o uso das ervas se restringiu às classes mais baixas, sem recursos necessários para usufruírem dos remédios sintéticos. Além disso, “[...] o estudo das plantas medicinais mostrou uma resistência inicial a acompanhar as grandes revoluções científicas [...]” (LORENZI; MATOS, 2008), o que manteve a fitoterapia rebaixada por décadas à categoria de misticismo.

Esse cenário piorou após a II Guerra Mundial, graças ao avanço na difusão dos antibióticos e da vacinação em massa, causando a ilusão de que a medicina havia

vencido a guerra contra a doença, fazendo as terapias naturais começarem a perder prestígio e credibilidade (FARIA, 1998 apud BIESKI, 2005).

Na década de sessenta, a bioquímica se desenvolveu, “permitindo o conhecimento das ações metabólicas, responsáveis por várias patologias” (YUNES et al., 2001) e o modelo chave-fechadura foi estendido para os fármacos, que necessitam se acoplar a um receptor específico para transporte até as células-alvo. No fim dos anos sessenta “houve um desinteresse total da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal, por se acreditar que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas vegetais [...]” (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Nos anos noventa surge a Engenharia Genética e com ela, a elucidação da base genética de diversas patologias, além da constatação de que determinadas substâncias podem causar alterações no DNA. O aperfeiçoamento de técnicas de análises químicas possibilitou um maior estudo das plantas e estabelecimento seguro de seu correto uso, ressurgindo - com isso – o interesse pelas pesquisas das mesmas na busca de novos fármacos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Felizmente, a idéia de desenvolvimento sustentável e a tentativa de viver harmonicamente com a natureza, incentivaram o crescimento dos estudos com plantas medicinais, colocando a fitoterapia novamente na categoria de ciência. Assim, ela vem ganhando terreno e “[...] desde então, a busca pelo aperfeiçoamento da qualidade tem sido cada vez maior, visando sempre ao bem-estar e à saúde” (FERRO, 2006, p. 7).

Infelizmente, esse crescimento notável ocorre muito mais em países desenvolvidos do que em nações em desenvolvimento, onde a população é bem mais carente de um sistema de saúde adequado e indispõem de recursos para arcar com os custos elevados da aquisição de fármacos⁸ principalmente porque, na maioria das vezes, as matérias-primas utilizadas na fabricação desses medicamentos são importadas; a elas, as ervas medicinais apresentam-se como única alternativa para sanar os males que os afligem. Segundo Yunes et al. (2001), esse crescimento desigual deve-se a dois fatores:

⁸ Moléculas de estrutura determinada com efeitos sobre os sistemas fisiológicos e estados patológicos, cujos efeitos secundários não desejados são bem estabelecidos (YUNES et al., 2001).

[...] primeiro, ao aprimoramento da tecnologia farmacêutica na área de fitoterápicos, o que permitiu um melhor controle de qualidade dos fármacos baseado na moderna tecnologia de identificação, determinação e quantificação de compostos químicos, tornando possível a fabricação de fitofármacos⁹ seguros, eficazes e de efeito totalmente reprodutível.

Por outro lado, os avanços na pesquisa de fitoterápicos a nível farmacológico, toxicológico e molecular permitiram constatar que estes apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido, com avaliação toxicológica segura, e de estudos de farmacologia pré-clínica e clínica realizados segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros [...].

Turolla & Nascimento (2006) são categóricos em afirmar que o crescimento da fitoterapia faz com que as plantas ocupem papel importantíssimo na medicina moderna, pois fornecem à indústria farmacêutica novas opções de remédios, os quais dificilmente seriam obtidos sinteticamente; além disso, para eles

[...] as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos e que [...] podem ser usados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais.

Nesse panorama, torna-se imprescindível o total apoio do poder público em relação às pesquisas com ervas medicinais uma vez que, como relata Martins et al. (1995, p. 15) “não se trata unicamente do fator econômico; há que se destacar a importância para a segurança nacional e a preservação dos ecossistemas onde existam tais espécies”. Ratificar os poderes curativos dos vegetais através de testes científicos habilita seu uso por parte da população, em função da facilidade de acesso (podem ser encontrados em diversos lugares), do baixo custo e da compatibilidade cultural com as tradições populares. Poderão ser comercializados se seguirem as normas vigentes na lei, facilitando seu uso pela comunidade, desafogando e reduzindo os custos do sistema público de saúde.

3.5 FITOTERAPIA NO BRASIL

A primeira referência sobre as plantas medicinais brasileiras foi feita por Pero Vaz de Caminha em sua carta ao rei de Portugal, citando inclusive algumas de suas propriedades (FERRO, 2006). Ao chegarem ao território recém descoberto, os primeiros europeus se depararam bestificados com uma grande quantidade de

⁹ Substância química isolada de vegetais, empregada para tratamento de estados patológicos; diferencia-se do fitoterápico, pois este consiste de princípios ativos integrais.

plantas medicinais utilizadas pelos povos nativos e, por intermédio dos pajés, esse conhecimento foi transmitido aos conquistadores, que os difundiram por toda a Europa. Além disso, muitas plantas locais, por suas similaridades com espécies medicinais do Velho Mundo, foram testadas para usos similares (LORENZI; MATOS, 2008).

O interesse por nossa flora e suas finalidades terapêuticas aumentou com a vinda dos jesuítas, uma vez que o fornecimento de medicamentos pela metrópole não ocorria de maneira regular; dentre eles destaca-se o padre José de Anchieta, (MARTINS et al., 1995). Todavia, o primeiro ato normativo de expressão referente a plantas medicinais no Brasil só se deu com a publicação da 1ª edição da *Farmacopéia Brasileira* em 1929, uma compilação de mais de 280 monografias sobre o uso de algumas plantas da flora medicinal brasileira, baseada quase que 100% em relatos populares e escasso embasamento científico (BIESKI, 2005).

A utilização das ervas medicinais brasileiras apresenta, fundamentalmente, as seguintes influências culturais:

- a) Indígenas, que aprenderam a retirar da natureza os recursos necessários à sobrevivência; as plantas possuíram papel fundamental desde a construção de habitações e fabricação de vestimentas, à alimentação e remédio¹⁰. Essa interação tão forte com o reino vegetal fez dos indígenas uma nação singular, pois “na verdade, poucos povos primitivos adquiriram um conhecimento tão completo sobre as propriedades físicas, químicas e terapêuticas de seu ambiente botânico [...]” (FERRO, 2006, p.24);
- b) Imigrantes europeus, que no advento da colonização trouxeram uma variedade de vegetais que, embora não fossem nativos, se aclimataram muito bem e geraram variedades distintas de seus descendentes europeus (MARTINS et al., 1995); seus conhecimentos fitoterápicos somaram-se àqueles possuídos pelas tribos locais, e foram imprescindíveis na época das grandes incursões ao interior (LORENZI; MATOS, 2008);
- c) Escravos africanos, com suas experiências trazidas de sua terra natal, geralmente obtidas empiricamente (LORENZI; MATOS, 2008);

¹⁰ Os índios há muito compreenderam que uma mesma planta pode ser administrada tanto como remédio quanto veneno somente variando as dosagens.

- d) Chineses e japoneses, com seus estudos milenares nas áreas da “medicina tradicional”.

À medida que os séculos avançaram e a sociedade se desenvolveu, o homem foi introduzindo no ambiente, agentes químicos manufaturados, fomentando-se a idéia “de que tudo o que é natural não oferece perigo, é saudável e bom para o planeta, enquanto tudo o que é artificial (sintético) caracteriza-se como criminoso” (RIBEIRO et al., 2003, p. 23), culminando com o uso cada vez mais abusivo das plantas por parte da população que, “recorre a fitoterapia num movimento quase instintivo de reconciliação com a natureza” (PELT, 1979 apud BIESK, 2005). Seja por esse motivo ou pela deficiência da rede pública de assistência primária à saúde, cerca de oitenta por cento da população brasileira, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), não possui acesso aos medicamentos ditos essenciais (MARTINS et al., 1995) e dependem diretamente da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, onde 85% das práticas envolvem o uso de plantas medicinais, seus extratos e princípios ativos (SILVA et al., 2006).

Dentro da perspectiva da difusão do uso e da rentabilidade desse mercado, esperaria-se que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando o fato de ser um verdadeiro império vegetal graças à sua extensa e diversificada flora (detendo aproximadamente um terço das espécies mundiais). No entanto, o país ainda não apresenta destaque no mercado mundial de fitoterápicos (YUNES et al., 2001) basicamente por três motivos: a falta de uma política governamental realmente comprometida com o desenvolvimento deste mercado, a procura pelo lucro alto e rápido por parte das indústrias de medicamentos (restringindo a realização de testes mais aprimorados para o desenvolvimento eficaz e seguro de um medicamento) e ausência de uma real integração entre diversas áreas de pesquisa (fisiologia, bioquímica, genética, botânica, etc.) para realizar uma investigação abrangente, gerando um resultado mais fidedigno.

Apesar da expressiva evolução nos últimos anos, poucas indústrias farmacêuticas concentram o seu potencial industrial exclusivamente nos fitoterápicos; as mesmas têm tanto procurado atender os padrões exigidos pelo governo, quanto implantar métodos próprios que atestem e/ou ratifiquem a qualidade de seus produtos

(SIMÕES et al., 2000). Esse ato torna os produtos e serviços fornecidos pela empresa mais seguros à população.

Infelizmente, atos como esse ainda não são maioria. A ausência de um sistema de fiscalização efetiva, associada à competição acirrada entre indústrias nacionais e multinacionais, propiciou o surgimento e desenvolvimento de empresas pouco estruturadas, levando à fraude e à má qualidade dos produtos. Os fitoterápicos ali produzidos chegam ao mercado sem nenhuma comprovação pré-clínica e sem rotulação correta (nome da espécie vegetal, datas de fabricação e validade, etc.) (YUNES et al., 2001; FERREIRA et al., 1998).

Entretanto, esse quadro representa somente a ponta do iceberg; a raiz do problema está na extração e manipulação das ervas, feitos, geralmente, de maneira errônea.

No Brasil [...] as espécies vegetais de interesse são coletadas por mateiros que não sabem, na maioria das vezes, identificar corretamente uma espécie vegetal e suas variedades e, muito menos qual é a época ideal de coleta. As plantas coletadas são secadas de maneira precária, perdendo, muitas vezes, as substâncias ativas. [...] após seco é vendido à distribuidoras que o repassam aos estabelecimentos farmacêuticos que produzem os fitoterápicos (FERRO, 2006, p. 27).

Esses inúmeros problemas sinalizam veementemente a necessidade de políticas capazes de corrigir esse quadro, permitindo que o país ocupe o lugar que merece no panorama do mercado mundial de fitoterápicos, pois, como definiu Von Martius em sua célebre frase “as plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres” (MARTINS et al., 1995, p. 15).

3.5.1 Legislação Brasileira

Enquanto a legislação para os medicamentos de fármacos sintéticos encontra-se bem estabelecida no país, os fitoterápicos ainda necessitam de maior esforço regulatório por parte das organizações de saúde; a legislação a eles concernente já sofreu inúmeras alterações pelo órgão que regulamenta sua elaboração e uso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro desses medicamentos, o termo *Fitoterápico* aplica-se ao

[...] medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

O Ministério da Saúde, em seu decreto mais recente (decreto Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006) aprovou a *política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos* e criou – através da portaria nº. 189 de 02/10/2006 – o *Grupo de Trabalho Interministerial*, cuja função será elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, objetivando garantir à população brasileira, “o acesso [...] e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento e fortalecimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006).

Em nosso país, onde há influência cultural de diversas civilizações, além de uma biodiversidade que poderia ser bem aproveitada como medicamento, é notável o contraste entre os milhões gastos com a busca de informações que comprovem cientificamente a segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais e as filas dos postos de saúde que continuam aumentando a cada dia. Assim, o estímulo ao uso tradicional das ervas medicinais é imprescindível; todavia, deve-se restringir a casos específicos, buscando-se evitar que isso se torne uma prática indiscriminada.

3.6 TOXICIDADE VEGETAL E A VALIDAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

A idéia de que produtos de origem natural possuem propriedades terapêuticas está intrínseca na população e difundida constantemente pela mídia e comunidade científica; contudo, muitas vezes a possibilidade de possuírem efeitos adversos é ignorada (FAGUNDES et al., 2005). Na Conferência de Alma Ata, a OMS declarou que o uso milenar de uma planta dita medicinal confere segurança suficiente para sua utilização pela humanidade, a menos que algum estudo científico apresente provas do contrário (FERRO, 2006). Entretanto, este mito representa uma séria

ameaça à saúde do paciente, uma vez que os problemas decorrentes de intoxicação podem surgir após longos períodos de exposição aos agentes toxicológicos.

Apesar da diversidade genética vegetal mundial ser enorme, somente cerca de 15-17% das plantas medicinais utilizadas foram testadas para comprovação de suas propriedades (BAGATINI et al., 2007), o que é preocupante, pois os produtos oriundos do metabolismo vegetal e de sua biotransformação devem ser encarados como potencialmente tóxicos até que testes comprovem sua eficácia e segurança. De fato, não há porque considerar – à priori – inócua uma planta medicinal, se do reino vegetal são obtidas substâncias potencialmente tóxicas como curare, glicosídeos cianogênicos, etc (SIMÕES et al., 2000).

Há inúmeros casos comprovados de plantas ditas seguras e usadas por décadas sem apresentarem nenhum problema, até demonstrarem ser danosas ao organismo humano. Confrei¹¹ (*Symphytum officinale*), Kava-kava¹² (*Piper methysticum*) e Erva-de-São-João¹³ (*Hypericum perforatum*) são exemplos de plantas populares brasileiras que, embora amplamente utilizadas, apresentam perigos em seu uso prolongado (VALSA; FELZENSZWALB, 2001; SCHNEIDER, 1984).

De acordo com Martins et al. (1995, p. 20),

[...] as intoxicações ocorrem quase sempre em razão do uso de quantidades excessivas de determinadas plantas, do preparo e uso inadequados e – principalmente – em virtude do uso de plantas com efeitos tóxicos. Não são raros os casos em que se empregam somente uma ou mais partes da planta com fim medicinal, sendo outra parte considerada tóxica [...].

Para Rosa (apud Souza, 2005), “o progresso da fitoterapia e a obtenção de fitofármacos dependem do acesso facilitado às plantas produtoras e às inúmeras substâncias ativas nelas presentes” e sua correta utilização como medicamento requer uma prévia validação como qualquer outro fármaco, ou seja, é necessário fundamentar-se em experimentos que comprovem cientificamente que os riscos são insignificantes frente aos benefícios de seu uso, verificando se a ação investigada realmente existe e se há algum potencial toxicológico na espécie humana (SIMÕES

¹¹ Pode resultar em lesões hepáticas graves, uma vez que sintetiza alcalóides pirrolizidínicos, causadores de necrose de células do fígado (SCHNEIDER, 1984).

¹² Famoso por suas propriedades calmantes, porém estudos comprovaram sua relação com o surgimento de vários casos de hepatite (FERRO, 2006).

¹³ Antidepressivo que, se utilizado juntamente com anticoncepcionais pode afetar o tratamento e causar problemas à saúde do paciente (FERRO, 2006).

et al., 2000); o uso popular prolongado não basta para validar um vegetal como medicamento eficaz e seguro. Em geral, grande parte das preparações fitoterápicas comercializadas não possui certificado de qualidade e sua venda é alicerçada em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos. (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

Os testes de validação devem contar com profissionais de várias áreas (fisiologistas, geneticistas, etc) e abranger tanto a matéria-prima (as plantas), através de sua correta identificação, quanto o produto tecnologicamente acabado (fitoterápico), garantindo-lhe uma correta rotulagem; desta forma, contribuir-se-á inquestionavelmente para a eficácia¹⁴, segurança¹⁵ e qualidade¹⁶ do produto final (FERRO, 2006), culminando por propiciar confiabilidade aos consumidores.

Segundo Varanda (2006), “o estudo das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas é válido em dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, e em segundo, como medida de segurança para o uso popular”. Já para Ferro (2006), dentre as diversas razões para a validação de fitoterápicos destacam-se:

- a) melhoria das condições de saúde pública – principalmente em regiões de baixa renda – além de oferecer à população melhores informações sobre o uso de plantas para medicação;
- b) surgimento de novas fontes de medicamentos;
- c) em termos botânicos, pode-se obter maiores informações sobre o genoma e fisiologia vegetal, influências no ecossistema, ações terapêuticas, etc.; e
- d) ter a certeza de que a planta usada não consiste em placebo nem veneno.

¹⁴ Comprovação (através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos) da atividade biológica esperada relacionada aos princípios ativos prováveis de sua ação (FERRO, 2006).

¹⁵ Comprovação da inocuidade (ausência de substâncias tóxicas e de contaminantes nocivos) do fitoterápico frente a testes toxicológicos adequados e aprovados pela comunidade científica (FERRO, 2006).

¹⁶ Conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso do qual se destina (SIMÕES et al., 2000).

Uma correta validação dos medicamentos à base de vegetais é obtida aliando-se o uso tradicional das plantas aos estudos fitoquímicos e controle de qualidade (GURIB-FAKIM, 2006). Nos Estados Unidos e Europa as normas para a certificação e o controle de qualidade de preparações vegetais são mais rígidos e há mais controle no registro e na comercialização dos produtos obtidos de plantas. No Brasil, contudo, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades, pois as pesquisas ainda são incipientes, assim como o controle pelos órgãos oficiais da comercialização em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (CARVALHO, 2004).

Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer trivial; isto, entretanto, não é verdade, pois trata-se de um problema sério de saúde pública. Por isso os avanços na área de validação de fitoterápicos são necessários e urgentes, já que

[...] as plantas medicinais constituem fonte imediata e viável de medicamentos para enfermidades com poucos recursos terapêuticos. [...] No entanto, poucos desses produtos são estudados de acordo com protocolos científicos modernos. A maioria não pode, portanto, ser aceita como medicamento ético de prescrição livre porque, em geral, não possuem eficácia comprovada na espécie humana, sem estudos de eventual toxicidade e sem controle de qualidade apropriado (SIMÕES et al., 2000, p. 194).

Os efeitos fisiológicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo humano são muitas vezes negligenciados, tanto pela população que as utiliza geralmente de forma errônea e indiscriminada, quanto pela ciência, que às vezes não investiga a fundo o potencial tóxico dos metabólitos presentes. Para tal, a utilização de organismos-teste é de extrema importância nesses estudos, sendo inúmeros dados extrapolados para a espécie humana (principalmente para avaliação de mutagenicidade e de carcinogenicidade) por três motivos (FAGUNDES et al., 2005):

- a) um agente potencialmente genotóxico ao DNA representa perigo a qualquer tipo de células (animal, vegetal ou microrganismos) graças à universalidade do código genético;
- b) há similaridades entre os metabolismos de plantas e animais, como o sistema oxidase e os mecanismos de divisão celular;

- c) a atuação de pró-mutágenos em vegetais tem alta relevância, uma vez que seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos.

3.7 MUTAGENICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS E O BIOENSAIO

Allium cepa

Segundo Alberts (1997), a sobrevivência em longo prazo de uma espécie pode aumentar através de mudanças genéticas que selecionem os indivíduos mais aptos graças ao surgimento dos alelos (variações de um mesmo gene); estes estão – por sua vez - sujeitos à Seleção Natural, constituindo-se, portanto, no substrato para a evolução adaptativa. Entretanto, a sobrevivência de um indivíduo demanda estabilidade genética, mantida por mecanismos de replicação e de reparo eficazes; quando estes mecanismos falham, estabelece-se uma lesão permanente no material genético, denominada mutação¹⁷ (RIBEIRO et al., 2003).

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a agentes ambientais¹⁸, que podem induzir modificações químicas tanto ao nível celular quanto molecular, afetando processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica e podendo aumentar e/ou acelerar o processo de aparecimento das mutações (CARVALHO, 2004; ALMEIDA NETO et al., 2005; STELATO, 2007) e aberrações cromossômicas, fenômeno esse que pode levar a processos cancerígenos e morte celular (MATIOLI, 2001; SOUZA, 2005). A detecção de tais substâncias potencialmente citotóxicas¹⁹ e genotóxicas²⁰ e seus prováveis efeitos nos organismos é fundamental no estudo do impacto que elas podem trazer às populações animal, vegetal e humana, além de avaliar o espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos, dentre eles os fitoterápicos (COSTA; MENK, apud SOUZA, 2005, p.14; IGANCI et al., 2006).

¹⁷ Alterações hereditárias do material genético, decorrentes de erros de replicação antes da divisão celular e não causadas por recombinação ou segregação e que pode afetar qualitativa ou quantitativamente o gene (GRIFFITHS et al., 2001; FONSECA e PEREIRA, 2004).

¹⁸ Podem ser químicos (provenientes do meio ambiente ou resultantes de reações químicas que ocorrem nas próprias células), biológicos ou radiações (tais como a luz ultravioleta e raios-X).

¹⁹ Substâncias capazes de provocar danos à célula como um todo.

²⁰ Substâncias caracterizadas por causarem danos especificamente ao material genético da célula e serem potencialmente capazes de gerar tumores em seres humanos.

Um bioindicador pode ser mais valioso se detectar os agentes poluentes ou tóxicos em mais de um ambiente e permitir a detecção de muitas classes de danos em diversos tipos de células. O ideal é que sejam utilizados bioindicadores fenotipicamente mais sensíveis a lesões ao material genético, expressando em um curto espaço de tempo, respostas a qualquer alteração externa a que são submetidos (COSTA; MENK, apud SOUZA, 2005). Dentre os organismos-teste comumente utilizados, os vegetais superiores constituem um importante material para testes genéticos de monitoramento de poluentes ambientais, fortalecidos em meio à comunidade científica, pois proporcionam maior conhecimento da genotoxicidade e especialmente das aberrações mitóticas em eucariontes (FISKESJÖ, 1985). Para o autor,

Sistemas vegetais se mostram especialmente adequados para pesquisas [...] de monitoramento ambiental. As razões para usar sistemas vegetais são muitas: Plantas são fáceis de armazenar, geralmente os cromossomos estão em boas condições, baixo custo e – o mais importante – possui uma boa correlação para outros sistemas-teste. (tradução nossa).

Dentre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* (cebola) destaca-se como um eficiente organismo-teste na identificação de efeitos perigosos de substâncias presentes tanto na água quanto na atmosfera, em suas diversas concentrações, em diferentes tempos de exposição e para avaliação da sua influência nos organismos; seu uso foi originalmente introduzido por LEVAN, em 1949 (LEME et al., 2005).

O teste de avaliação de alterações cromossômicas – também conhecido como bioensaio do *A. cepa* - é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), sendo, portanto, mundialmente reconhecido como eficaz na análise de monitoramento da genotoxicidade de substâncias ambientais (BAGATINI et al., 2007) e recomendado devido a sua praticidade (fácil manipulação), baixo custo e cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular, além de ser sensível e apresentar boa correlação com outros sistemas-testes. Uma vez que suas raízes crescem diretamente em contato com a substância testada, é possível analisar o efeito de diferentes concentrações (mesmo baixas) sobre o ciclo celular. Conseqüentemente, resultados positivos no teste de *A. cepa* devem ser considerados como alerta e indicativo de que o fator químico testado pode ser um risco à saúde humana (SÁ et al., 2005; FISKESJO, 1985). Os agentes mutagênicos

poderão, então, ser detectados citologicamente pela inibição do ciclo celular, interrupção em metáfases, surgimento de pontes e micronúcleos, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, entre outros.

3.8 *Passiflora edulis* Sims: USOS MEDICINAIS E ALELOPATIA

Várias espécies nativas são largamente empregadas pela população, algumas com estudos químicos, farmacológicos e/ou fisiológicos que suportam sua utilização como medicamento ou alternativa agrícola para herbicida natural; outras são empregadas a partir do conhecimento empírico ou tradicional (SIMÕES *et al.*, 2000). Dentre estas, pode-se citar o maracujá (*Passiflora*²¹ *edulis* Sims – figura 1), planta originária da América tropical e popularmente conhecida por maracujá-peroba, maracujá-de-suco, maracujá-azedo e maracujá-redondo (LORENZI; MATOS, 2008).

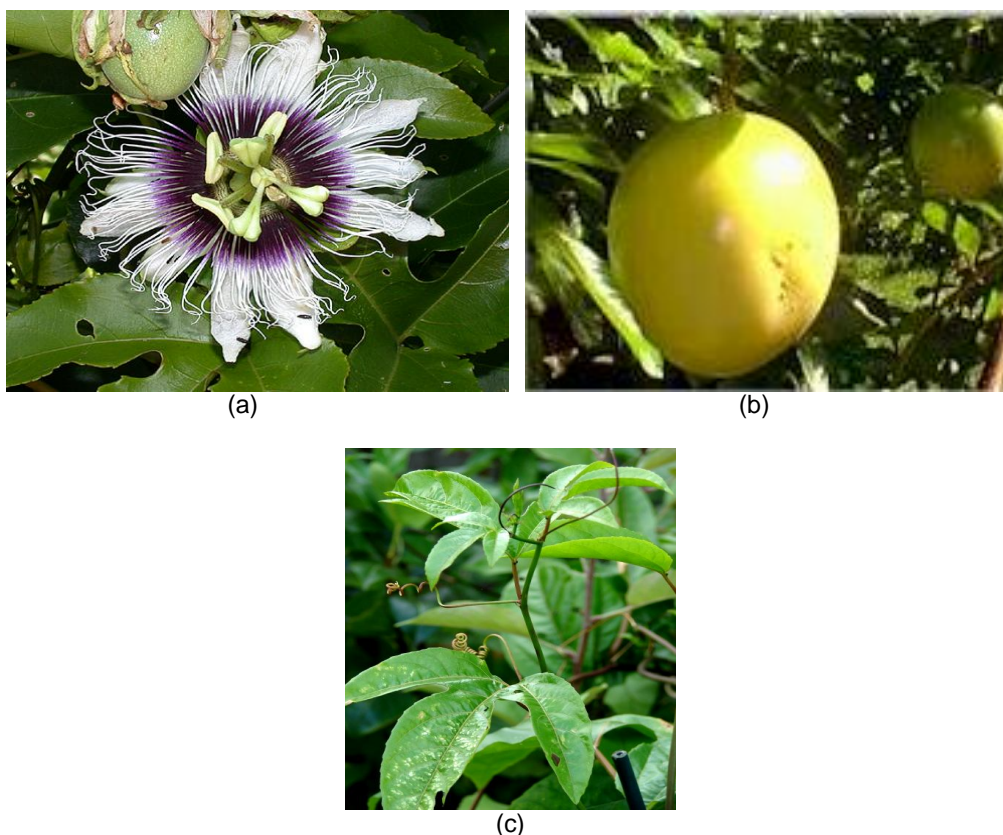


Figura 1: *Passiflora edulis* Sims: (a) flor; (b) frutos e (c) folhas.
Fonte: Melo et al., 2005.

²¹ O termo *Passiflora* foi atribuído pelos jesuítas, ao perceberem que as flores se assemelham aos instrumentos da Paixão de Cristo; além disso, o termo *passion* significa paixão (COSTA et al., 2005).

É uma trepadeira perene, de folhas alternas trilobadas, verdes externamente e alvas internamente, subcoriáceas, com duas pequenas glândulas nectaríferas na base do limbo; possui flores com pétalas brancas oblongas com o centro arroxeadado, de 2,5 a 3 cm de comprimento. O fruto de sabor ácido e agradável é uma baga globosa ou ovóide, apresentando entre 4 a 6 cm de diâmetros, de cor amarelo-clara lustrosa, contendo sementes reniformes, escuras, envolvidas por um arilo amarelo-escuro (LORENZI; MATOS, 2008; KLEIN, 2002).

Das quatrocentas espécies de *Passiflora*, trinta são descritas por possuírem frutos comestíveis, cuja polpa pode representar até 55% do fruto; entretanto, poucas dessas espécies alcançaram desenvolvimento comercial tão grande quanto *Passiflora edulis*, cuja variedade *flavicarpa* representa uma das formas mais cultivadas em escala comercial no Brasil, principalmente na região Nordeste (MÜLLER, 2006). Na década de setenta, sua comercialização ainda era modesta, mas, a partir da década de oitenta, as culturas se expandiram devido à certeza de lucro certo, já que produz frutos o ano todo (GILMAN, 1999), de onde se extrai um delicioso néctar, utilizado popularmente como suco refrescante, importante fonte de sais minerais – ferro, fósforo e cálcio – e vitaminas A, C, B1, B2 e B5; além disso, é matéria-prima na fabricação de doces, geléias, licores, dentre outros (LIMA; FANCELLI, 2003). O arilo succulento das sementes é utilizado na preparação caseira e industrial de sucos e sorvetes (CIRAD/IPGRI, 2000).

3.8.1 Constituintes Químicos e Princípios Ativos:

Os principais fitoconstituintes de *Passiflora edulis* ácidos graxos (linoléico, oléico, palmítico), flavonóides, esteróides, taninos, alcalóides (seis vezes mais que outras espécies do gênero (LUTOMSKI; MALEK, 1975)), terpenos, polifenóis (antioxidantes), carotenóides e cumarinas (responsáveis pela ação antibacteriana) (MARTINS et al., 1995; LORENZI; MATOS, 2008).

Em ensaios farmacológicos, os princípios ativos detectados foram o harmano (alcalóide mais conhecido por passiflorina, um sedativo natural encontrado nas folhas e frutos), maracujina e cardioespermina (um glicosídeo cianogênico) (LORENZI; MATOS, 2008).

3.8.2 Propriedades medicinais e Alelopatia

Embora estudos alelopáticos focando espécies nativas ainda sejam escassos, sabe-se que algumas espécies frutíferas, como *Passiflora edulis*, apresentam substâncias inibidoras cuja função primária é garantir a dormência das sementes para que não germinem dentro do fruto – local com condições ótimas à germinação. No caso do maracujá, os aleloquímicos estão em maior concentração no arilo (que envolve toda a semente) e, de acordo com Balsalobre et al., (2006), além de inibir a germinação precoce de sua própria espécie, apresenta ação alelopática considerável sobre a germinação de outras espécies. No entanto, faltam dados que relatem se esse efeito concentra-se apenas no arilo ou se outras partes da planta podem exercer alelopatia (seja ela positiva ou não).

Os primeiros indícios do uso de seus frutos como fonte alimentar vieram da descoberta, em sítios arqueológicos na Virginia, de sementes datadas de milhares de anos atrás, ainda na pré-história; os europeus que chegaram à América relataram o cultivo desta planta pelos povos nativos. Todavia, seus primeiros usos medicinais datam de 1567, no Peru (DHAWAN et al., 2004) e popularizou-se no século XVII (SCHNEIDER, 1984), sendo, desde então, uma das principais fontes exploradas no sistema de terapia tradicional de muitas nações.

Há diversas indicações e formas de uso para todas as partes botânicas de *P. edulis*. As folhas são utilizadas na preparação de tintura²², infuso²³, extrato fluido²⁴ e decocto²⁵ (MARTINS et al., 1995); apresentam propriedades terapêuticas calmante, indicado para debilidades dos sistemas gastrointestinal (DHAWAN et al., 2004) e nervoso como inquietação, ansiedade, espasmos musculares decorrentes de tensão nervosa, excitações nervosas e neurastênicas, dores de cabeça e úlcera nervosa, nevralgias e insônia de origem emocional (MATOS, 1997 apud JARDIM et al., 2001).

²² Partes trituradas da planta permanecem por até duas semanas macerando em álcool, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente; o resíduo é, então, prensado, filtrado e armazenado em vidro escuro (LORENZI; MATOS, 2008).

²³ Produto resultante do processo de infusão, no qual acrescenta-se à erva picada água previamente fervida, permanecendo tampado por 10-15 minutos (LORENZI; MATOS, 2008).

²⁴ Obtido pelo tratamento de substâncias vegetais por um solvente apropriado, evaporando-se depois até à consistência desejada (LORENZI; MATOS, 2008).

²⁵ Obtido através da decocção, onde partes vegetais são fervidas juntamente com a água, por até 20 minutos (LORENZI; MATOS, 2008).

Podem ser usadas no tratamento de erisipela e dermatites infecciosas (uso local), hemorróidas e gota, além de possuírem propriedades antioxidantes (FERRO, 2006).

Os frutos também são indicados por suas propriedades sedativas, hipnóticas e no tratamento de carcinoma gástrico (DHAWAN et al., 2004). Já a raiz possui propriedades emenagogas (estimula a menstruação) (COSTA et al., 2005), enquanto suas sementes são anti-helmínticas quando usadas cruas e secas; seu óleo (em concentrações de 1-5%) é indicado no tratamento da acne (FERRO, 2006).

Recentemente, o mesocarpo de *P. edulis* tem sido empregado com sucesso no tratamento complementar do diabetes mellitus (ZANINI et al., 2007) e na redução do colesterol LDL; para tal, os pacientes trituram a casca até obterem uma farinha, usada tanto em bebidas como mesclado aos alimentos.

Todavia, há restrições quanto ao uso do maracujá como fitoterápico, principalmente para pessoas que apresentem hipotensão, devido à sua ação sedativa (LIMA; FANCELLI, 2003); também é recomendada cautela quanto à interação com outros medicamentos, pois pode produzir reações adversas (VEIGA JUNIOR et al., 2005). O tratamento à base das folhas deve ser feito apenas por curtos períodos e após longa fervura das mesmas para eliminar o excesso de ácido cianídrico, substância tóxica oriunda da hidrólise de um glicosídeo cianogênico (COSTA et al., 2005) e que em doses elevadas pode causar depressão respiratória e outros problemas, devido a sua habilidade de se ligar a metais (Fe^{++} , Mn^{++} e Cu^{++}), grupos funcionais da maioria das enzimas existentes (FRANCISCO; PINOTTI, 2000); também estão presentes em doses elevadas nos frutos imaturos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDOS E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Os quatro extratos orgânicos utilizados neste estudo (etanólico, acetato de etila, hexânico e diclorometano) foram obtidos a partir de folhas de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa*, coletadas no Horto Municipal Arthur Dias, da prefeitura do município de Vitória, localizado em Cariacica-ES e foram preparados pela Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade, do Departamento de Farmácia, da Universidade Federal do Pará (UFPA); para isso, as folhas foram secas em estufa por cinco dias, trituradas com moedor elétrico e submetidas a extração com solventes orgânicos de polaridade crescente, com finalidade de agrupar, selecionar e extrair os diferentes grupos químicos (SIMÕES et al., 2000).

Para o preparo do infuso foliar, folhas de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* foram coletadas no Viveiro de Restinga, da Prefeitura Municipal de Vitória, localizado em Jardim Camburi, Vitória – E.S.; dessas, 10g (cinco folhas) foram picadas e adicionadas a 250 ml de água previamente fervida, permanecendo tampada por 10-15 minutos e, em seguida, coado.

Os frutos utilizados para o preparo do infuso mesocárpico foram obtidos em supermercado da cidade de Vitória, E.S., todos oriundos de um único produtor de forma a garantir que pertençam à mesma variedade (*flavicarpa*). O preparo ocorreu seguindo as especificações recomendadas pelos médicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro aos seus pacientes (RAMOS, 2004): os frutos maduros foram lavados, descascados para a retirada da película amarela (epicarpo) e cortados ao meio para a retirada da polpa; o mesocarpo resultante (figura 2) foi cortado em fatias de até 5 cm de comprimento e colocado em temperatura média (160-180°C) para a retirada de toda a umidade. Após, foi triturado em liquidificador e peneirado até ser reduzido a pó. Para o preparo do infuso, 6,60g (uma colher de sopa) desta matéria

seca foram adicionadas a 300 ml de água previamente fervida e mantida tampada por 10-15 minutos, sendo, então, coado.

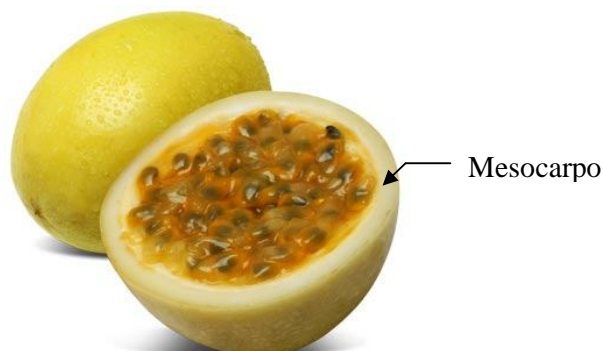


Figura 2: Fruto do maracujá, destacando a região do mesocarpo.
Fonte: www.agrapapaya.com

4.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DOS EXTRATOS FOLIARES:

Devido ao fato de o extrato bruto apresentar certo grau de hidratação, mesmo após ter sido evaporado, realizou-se a determinação da massa seca para mensurar a quantidade efetiva de extrato (não hidratado) a ser utilizada nos protocolos experimentais. Para isto, inicialmente um cadinho de porcelana vazio foi aquecido em um agitador magnético com aquecimento. A seguir, foram feitas várias pesagens do cadinho em balança digital e anotado seu peso, até que se obtivesse o mesmo peso em três pesagens sucessivas. Em seguida, o cadinho contendo 100mg do extrato bruto foi então colocado para aquecimento novamente até a total evaporação do diluente, controlando cuidadosamente o aquecimento para evitar a perda do material devido à fervura. A seguir, o cadinho foi pesado, por repetidas vezes e, mantido em aquecimento constante, até que o peso observado não se alterasse por três vezes consecutivas.

Para a determinação da massa seca, do valor da pesagem final foi subtraído o valor do peso do cadinho vazio. O total obtido corresponde à massa seca do extrato contido em 100mg do extrato bruto diluído. As concentrações de extratos utilizadas neste estudo foram – então – baseadas no valor da massa seca.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA SOBRE O SISTEMA - TESTE *Allium cepa*

As sementes de *Allium cepa* (cultivar Baia Periforme) submetidas à germinação foram obtidas de uma fonte comercial e selecionadas pelo mesmo lote (lote nº. 25870), entretanto eram não-clonais. A porcentagem de germinação era de 96% e pureza de 100%.

Para a realização do bioensaio de alelopatia, além do controle negativo feito com água destilada (CN), as sementes foram expostas às concentrações de 1, 2 e 5mg/mL de cada um dos extratos foliares (etanólico, acetato de etila, hexânico e diclorometano). No caso dos infusos – mesocárpico e foliar - de *Passiflora edulis*, utilizou-se o infuso concentrada (100%) e suas diluições a 10 e 50%.

As sementes foram acondicionadas em placas de petri cujo fundo foi coberto com papel filtro e diretamente embebidas com as concentrações correspondentes dos extratos, dos infusos ou água destilada; cada placa continha 25 sementes e cada tratamento foi feito em triplicata.

A cada vinte e quatro horas, durante quatro dias, mensurou-se o número de sementes germinadas e o comprimento das radículas.

Para análise dos efeitos alelopáticos, foram considerados os seguintes dados:

- Índice de germinação (IG) - relação entre o número de sementes de *A. cepa* submetidas à germinação em tratamento contínuo e o número de sementes que efetivamente apresentaram extensão da radícula (LABOURIAU; VALADARES, 1976 apud BALSALOBRE et al., 2006).
- Índice de velocidade de germinação (IVG) - número de sementes germinadas pelo tempo do experimento (MAGUIRE, 1962 apud BALSALOBRE et al., 2006).
- Porcentagem de alelopatia (%A) – de acordo com a seguinte fórmula (BALSALOBRE et al., 2006).

$$\% A = \frac{(G \text{ testemunha} - G \text{ tratamento})}{G \text{ testemunha}} \times 100$$

onde G significa germinação.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA SOBRE O SISTEMA - TESTE *Allium cepa*

Para os testes com o mesocarpo e folhas, foram testadas as concentrações de 10, 50 e 100% dos infusos; já para os extratos foliares (etanólico, acetato de etila, hexânico e diclorometano) foram avaliadas as concentrações de 1, 2 e 5mg/mL. As sementes de *Allium cepa* (obtidas de uma fonte comercial e selecionadas pelo mesmo lote - nº. 25870 - porém não-clonais) foram tratadas seguindo procedimento descrito abaixo (FISKEJO, 1985):

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em água destilada (controle negativo - CN), nos diferentes extratos foliares (concentrações de 1, 2 e 5mg/mL) e nos infusos mesocárpico e foliar concentradas (100%) e suas diluições a 10 e 50%. Desta forma, realizaram-se dois tipos de tratamento:

1) Tratamento contínuo: As sementes germinaram diretamente em três diferentes condições: em água destilada (CN) e nas diferentes concentrações dos extratos (1, 2 e 5mg/mL) e dos infusos mesocárpico e foliar (10, 50 e 100%).

2) Tratamento descontínuo: As sementes inicialmente germinaram em água destilada até atingirem cerca de 1 cm de comprimento; em seguida, foram transferidas a seus respectivos tratamentos (CN e as três dosagens dos extratos e infusos) e após 20h (tratamento agudo), metade das raízes foram coletadas aleatoriamente. O restante permaneceu recebendo o tratamento correspondente até completar 72h (tratamento crônico).

Após a coleta, as raízes foram fixadas em fixador Carnoy 3:1 e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas, sendo, posteriormente acondicionadas na geladeira.

4.4.1 Preparação citológica e análise das lâminas:

Para as análises citológicas, todas as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento comum suave, onde as lâminas são submetidas a uma hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60° C por 5 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, utilizou-se o Reativo de Schiff por 2 horas em local escuro para a coloração. O esmagamento das pontas das raízes foi realizado com 1 gota de orceína acética à 1% e 1 gota de ácido acético a 45%; as lamínulas foram descoladas com nitrogênio líquido e secas à temperatura ambiente. Após, fixaram-se as lamínulas com Entellan, tornando-as permanentes.

Foram usadas cinco lâminas de cada tratamento, sendo contadas 1000 células em cada lâmina através de análise em microscópio óptico, com objetiva de aumento 40X; o total de células analisadas, por tratamento, foi de 5000.

4.4.2 Análise dos efeitos mutagênicos

Para análise do efeito citotóxico, calculou-se o índice mitótico através da seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Para análise do efeito genotóxico, calculou-se o índice de aberração através da fórmula:

$$IA = \frac{\text{Número de células aberrantes}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Para a avaliação dos efeitos aneugênicos, foram analisadas células em divisão portadoras de metáfases irregulares (c-metáfase), alterações nas anáfases (multipolares, com atraso, etc), alterações nas telófases (atrasos), células binucleadas e/ou multinucleadas e perdas cromossômicas.

$$\text{IEA} \quad \frac{\text{Número de células aneugênicas}}{\text{Número total de células observadas}} \quad \times 100$$

Quanto aos efeitos clastogênicos, avaliou-se a frequência de células portadoras de alterações como aderência, pontes e quebras cromossômicas, além de células portadoras de micronúcleos e morte celular.

$$\text{IEC} \quad \frac{\text{Número de células clastogênicas}}{\text{Número total de células observadas}} \quad \times 100$$

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos alelopáticos e mutagênicos foram feitos em delineamento inteiramente casualizados (DIC), utilizando-se dados não-paramétricos e amostragem probabilística. A análise estatística foi feita utilizando-se o método Qui-Quadrado, com níveis de significância fixados em $p < 0,05$ e $p < 0,010$.

$$\chi^2 = \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO:

As massas secas estabelecidas para os extratos foliares foram: 0,0002421 mg do extrato etanólico, 0003062 mg do extrato hexânico, 0,0003049 do extrato diclorometano e 0,0003491 mg do extrato acetato de etila.

A toxicidade dos extratos foliares e dos infusos mesocárpico e foliar de *Passiflora edulis* foi associada à inibição da capacidade e velocidade de germinação das raízes de *A. cepa* e às alterações em seu crescimento. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram efetiva protusão radicular (figura 3).

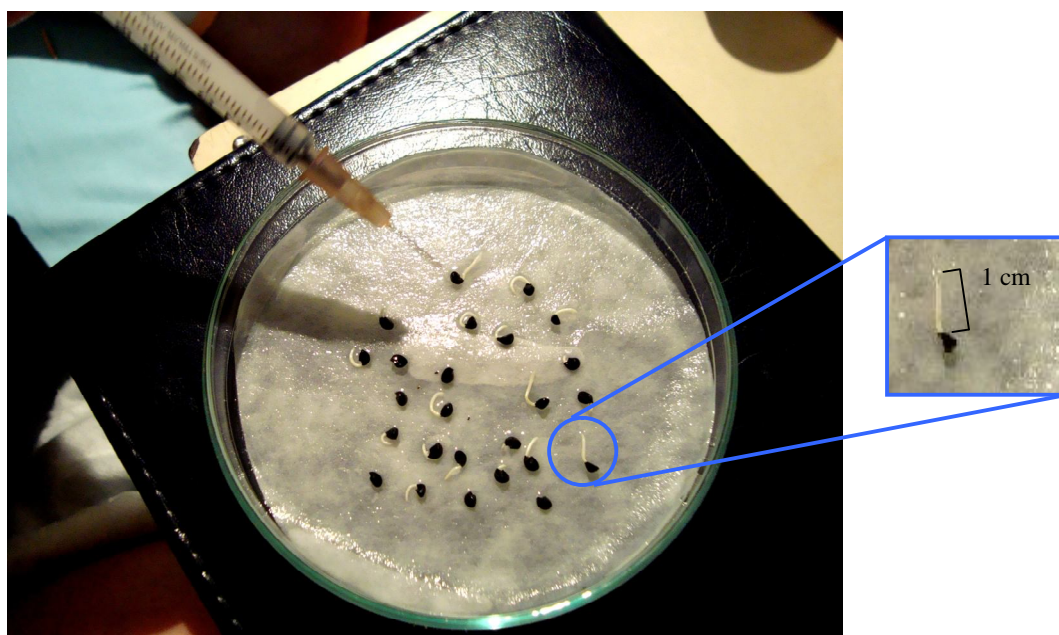


Figura 3 - Sementes de *A. cepa* germinadas em controle negativo; em destaque, semente com emissão de radícula.

A tabela 1 indica a porcentagem de alelopatia obtida para as sementes de *A. cepa* submetidas à germinação diretamente em contato com três diferentes concentrações (1, 2 e 5 mg/mL) de quatro extratos foliares (etanólico, acetato de etila, hexânico e diclorometano) de *P. edulis*, em comparação com aquelas germinadas diretamente no controle negativo.

Tabela 1. Índice de Alelopatia para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 2 e 5 mg/mL dos extratos etanólicos, acetato de etila, hexano e diclorometano de *P. edulis*.

<i>Extratos</i>	<i>Concentrações do Extrato</i>	<i>Nº. total de sementes</i>	<i>Nº. sementes germinadas</i>	<i>Índice de Germinação (%)</i>	<i>Índice de Alelopatia (%)</i>
CN	-	25	23	92	-
Etanólico	1 mg/mL	25	6	24	74,00
	2mg/mL	25	4	16	82,60
	5mg/mL	25	3	12	86,96
Acetato de etila	1mg/mL	25	17	68	26,10
	2mg/mL	25	6	24	73,91
	5mg/mL	25	9	36	61,00
Hexano	1mg/mL	25	17	68	26,10
	2mg/mL	25	10	40	56,52
	5mg/mL	25	10	40	56,52
Diclorometano	1mg/mL	25	14	56	39,13
	2mg/mL	25	17	68	26,10
	5mg/mL	25	12	48	48,00

Índices de Alelopatia superiores a 50% são considerados como tendo significativo efeito alelopático (Balsalobre et. al., 2006). As maiores porcentagens de alelopatia ocorreram nos ensaios que utilizaram extrato etanólico e foram aumentando conforme as concentrações do mesmo se elevavam; esse alto índice alelopático se refletiu na capacidade de germinação das sementes. O extrato etanólico afetou significativamente a emissão radicular das sementes de *Allium cepa* em todas as concentrações testadas (1, 2 e 5mg/mL) do extrato etanólico (figura 4a), reduzindo a porcentagem de germinação à medida que a dosagem aumentava; este fato evidencia – portanto - a alta toxicidade do extrato.

Em relação aos extratos acetato de etila e hexano (figuras 4b e 4c, respectivamente), apesar de ocorrer uma queda considerável na quantidade de sementes germinadas, somente as duas maiores concentrações testadas (2 e 5 mg/mL) de ambos os extratos afetaram significativamente a porcentagem de germinação e tiveram elevada porcentagem de alelopatia, indicando que, a capacidade de emissão radicular das sementes declina à medida que se eleva a dosagem desses extratos, o que pode ser atribuído ao aumento da concentração dos aleloquímicos ali presentes, potencializando seus efeitos alelopáticos.

O índice de alelopatia para o extrato diclorometano se manteve abaixo dos 50%, porém, suficiente para, na maior concentração aplicada (5 mg/mL), afetar a germinação de forma significativa (figura 4d), indicando que os metabólitos ali presentes necessitam estar em maiores doses para afetar a capacidade de emitir radículas.

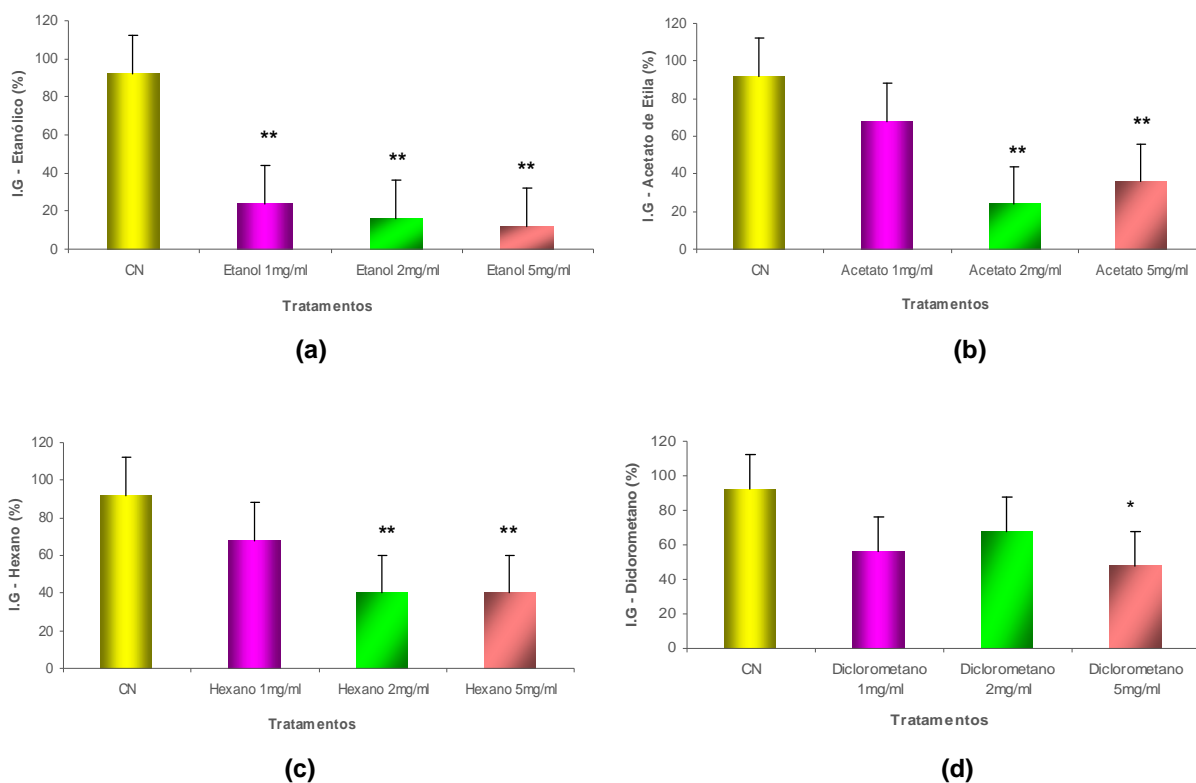


Figura 4 – Porcentagem de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de *P. edulis* (1, 2 e 5 mg/mL) **(a)** - extrato etanólico; **(b)** – extrato de acetato de etila; **(c)** – extrato hexânico; e **(d)** – extrato diclorometano (* significativo a $p < 0,05$ e ** significativo a $p < 0,01$).

Contudo, quando se compara os resultados do índice de germinação com os dados do índice de velocidade de germinação, ou seja, quanto tempo foi necessário para que as raízes conseguissem emergir, nota-se que, apesar das três concentrações do extrato etanólico apresentarem os maiores índices de alelopatia e interferirem na germinação das sementes com ele tratadas, o índice de velocidade de germinação foi reduzido significativamente apenas para os tratamentos com as duas maiores concentrações testadas (figura 5a), evidenciando que, as poucas sementes que conseguem vencer as barreiras impostas à germinação, apresentam retardo na velocidade em que as radículas despontam. Já para a concentração de 1 mg/mL, apesar dos compostos presentes no extrato etanólico reduzirem a capacidade de germinação das sementes, aquelas que germinaram não apresentaram alterações na velocidade de germinação.

Em nenhuma das concentrações testadas do extrato acetato de etila ocorreram alterações na velocidade com que as sementes de *A. cepa* germinaram (figura 5b), embora já apresentem uma tendência à redução. Para o extrato hexânico (figura 5c), esse parâmetro foi afetado apenas na concentração mais baixa (1 mg/mL), exatamente a única que não relatou interferências significativa na porcentagem de germinação, mostrando que, os efeitos alelopáticos não foram suficientes para matar as sementes expostas à essa concentração, mas interferiram consideravelmente na velocidade com que as radículas se desenvolviam.

A concentração de 2 mg/mL do extrato diclorometano (figura 5d) foi responsável pela queda na velocidade de germinação das raízes; no caso da concentração de 5 mg/mL, afetada no índice de germinação (figura 4d), as sementes germinadas não apresentaram modificação no tempo em que isso aconteceu.

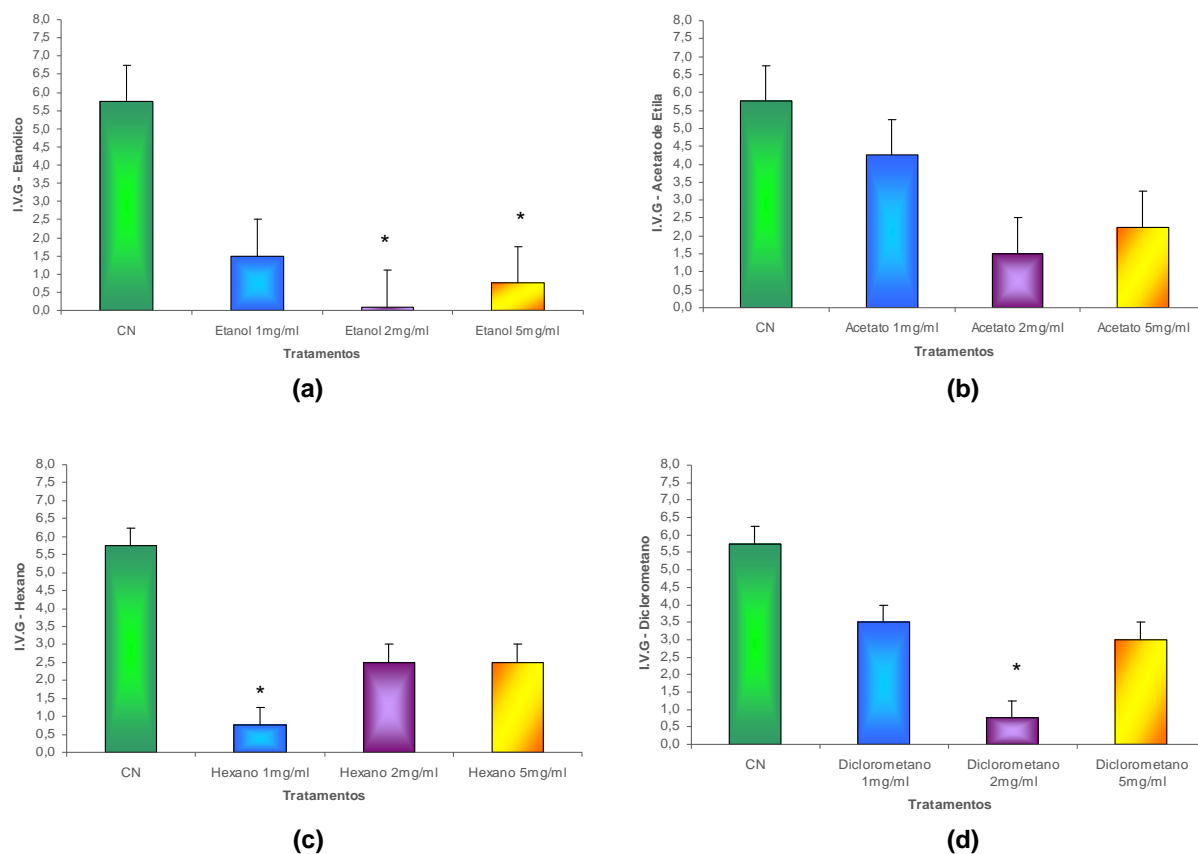


Figura 5 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de *P. edulis* (1, 2 e 5 mg/mL). **(a)** - extrato etanólico; **(b)** – extrato de acetato de etila; **(c)** – extrato hexânico; e **(d)** – extrato diclorometano. (* significativo a $p < 0,05$).

Como no presente estudo, Blanco (2007) relata que efeitos de aleloquímicos podem levar à queda no índice de germinação, fato também observado por Gatti (2003) e Periotto (2003) ao testarem extratos aquosos de diferentes plantas nativas do cerrado brasileiro sobre o desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa*) e rabanete (*Raphanus* sp), sendo que, em ambas as plantas-teste, verificou-se redução na capacidade de germinação conforme as concentrações dos extratos aumentavam, indicando um efeito alelopático concentração-dependente.

Esses mesmos autores relatam que, apesar desse declínio na porcentagem de germinação, não havia mudança no tempo em que as sementes emitiam suas radículas, evidenciando que, nem sempre alterações no índice de germinação são acompanhadas por mudanças na velocidade de germinação, corroborando os resultados expostos nas figuras 4 e 5.

Ducca e Zonetti (2008) evidenciaram bem este fato, uma vez que, em seus ensaios envolvendo extrato aquoso de folhas de aveia, observaram que, apesar do índice de germinação das sementes de soja permanecer inalterado quando comparado ao controle, o índice de velocidade de germinação sofreu queda acentuada.

Efeitos distintos de diferentes extratos foliares obtidos de uma mesma planta foram relatados por Balestrini (2006) em seus estudos com extratos etanólico, hexânico e acetato de etila de *Dorstenia multiforme* sobre a germinação de alface. O primeiro extrato apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas, reduzindo a germinação; todavia, o mesmo resultado só foi obtido nas duas maiores concentrações testadas para o extrato hexânico, enquanto o extrato acetato de etila, por sua vez, não afetou em nada a emissão radicular das sementes de alface, situações similares às expostas nas figuras 4 e 5 do presente estudo.

Em relação aos tratamentos com os infusos mesocárpico e foliar, as tabelas 2 e 3 (respectivamente) indicam os resultados obtidos para o índice de alelopatia das sementes expostas às três concentrações testadas (10, 50 e 100%).

Tabela 2. Índice de Alelopatia para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 10, 50 e 100% do infuso mesocárpico de *P. edulis*.

Concentrações do Infuso Mesocárpico	Nº. total de sementes	Nº. sementes germinadas	Índice de Germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
CN	25	23	92	-
10%	25	18	72	21,74
50%	25	21	84	8,70
100%	25	18	72	21,74

As porcentagens de alelopatia ficaram abaixo de 22%, valor insuficiente para causar alterações consideráveis no índice de germinação (figura 6) e na velocidade de emissão radicular das sementes tratadas (figura 7).

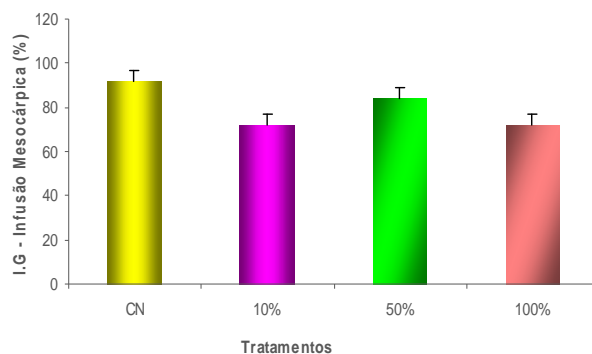


Figura 6 – Porcentagem de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

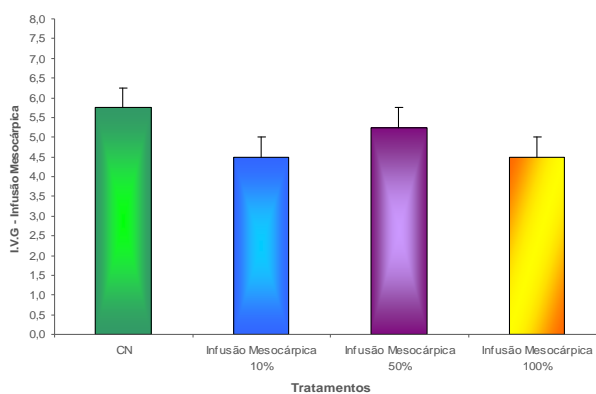


Figura 7 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P.edulis* (10, 50 e 100%).

O mesmo pode ser observado nas figuras 8 e 9, as quais avaliam os mesmos parâmetros para os tratamentos com a infuso foliar. Isso é respaldado pelo fato de que as diferentes partes vegetais podem apresentar composições metabólicas diferenciadas ou mesmo concentrações distintas de metabólitos (SIMÕES et al., 2000), podendo, assim, exercer ou não efeitos alelopáticos sobre outros organismos.

Tabela 3. Índice de Alelopatia para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento contínuo com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 10, 50 e 100% do infuso foliar de *P. edulis*.

Concentrações do Infuso Foliar	Nº. total de sementes	Nº. sementes germinadas	Índice de Germinação (%)	Índice de Alelopatia (%)
CN	25	23	92	-
10%	25	18	72	21,74
50%	25	23	92	0
100%	25	15	60	34,80

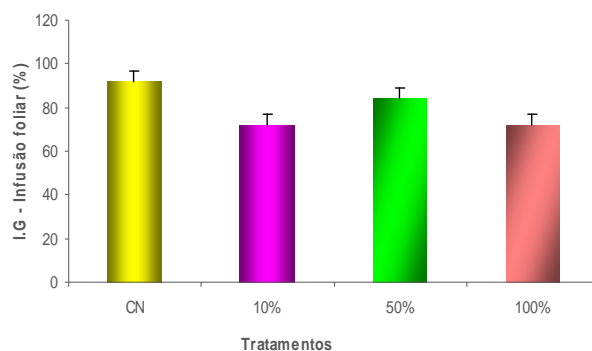


Figura 8 – Porcentagem de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%)

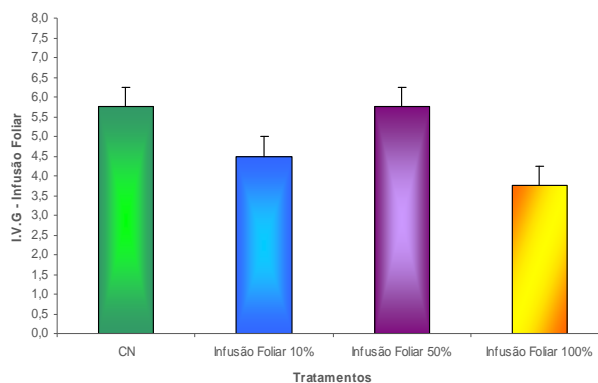


Figura 9 – Índice de Velocidade de Germinação das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

Alves et al. (2004) trabalharam com extratos voláteis de óleo essencial de diferentes plantas medicinais, dentre elas o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), utilizando alface (*Lactuca sativa*) como organismo-teste; não houve nenhuma alteração no índice de germinação, porém o crescimento das radículas foi acelerado.

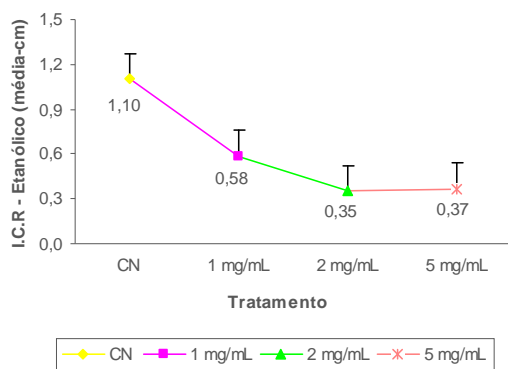
5.2 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA:

A avaliação do índice de germinação é um dos parâmetros mais investigados ao se estudar os efeitos alelopáticos exercidos por uma espécie sobre o desenvolvimento inicial de outra (FERREIRA; AQUILA, 2000); todavia, há uma tendência cada vez maior em explorar essa interferência sobre o crescimento das radículas, uma vez que podem ocorrer anomalias durante a extensão da mesma.

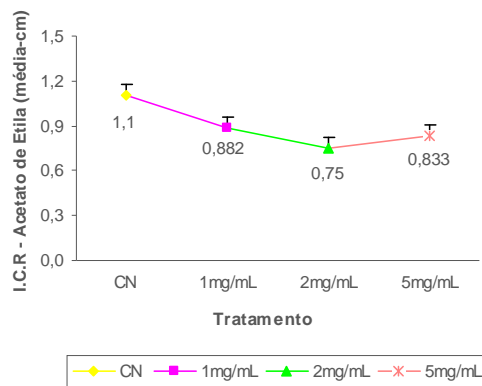
Ao analisar o crescimento das radículas submetidas ao tratamento com os quatro extratos foliares estudados (hexânico, acetato de etila, diclorometano e etanólico), observa-se que nem sempre resultados positivos para o índice de germinação se refletem no desenvolvimento radicular. Os resultados mostrados na figura 10a retratam fielmente este fato; embora a exposição ao extrato etanólico tenha afetado significativamente a germinação das sementes de *A. cepa* em todas as concentrações testadas (figura 4), não houve diferenças significativas no crescimento das radículas, apesar de ser perceptível uma relação entre aumento na concentração testada e queda no tamanho da radícula. Isso indica que, as sementes que conseguiram vencer a barreira de germinação se desenvolveram normalmente.

Quanto aos extratos acetato de etila (figura 10b) e hexano (figura 10c), as concentrações de 2 e 5 mg/mL, responsáveis pelo declínio na porcentagem de germinação (figura 4), não interferiram de forma significativa no crescimento daquelas sementes que chegaram a germinar. Para a concentração de 1 mg/mL de ambos os extratos, a ausência de efeitos sobre a germinação foram ratificadas nos dados de crescimento radicular.

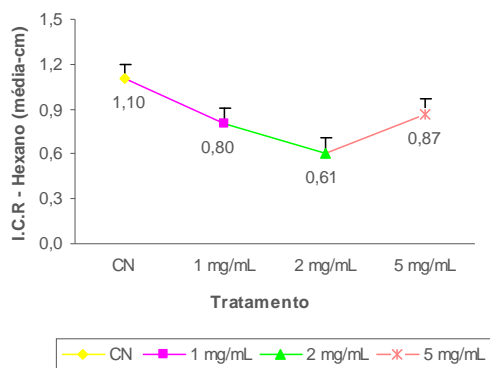
Nenhuma concentração do extrato diclorometano (figura 10d) evidenciou significativas mudanças no crescimento das radículas em relação ao controle negativo.



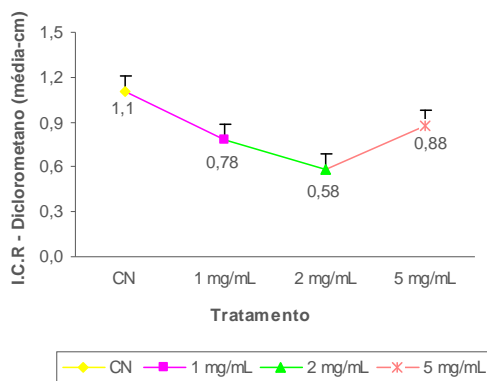
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 10 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato (1, 2 e 5 mg/mL) de *P. edulis*: **(a)** - extrato etanólico; **(b)** - extrato de acetato de etila; **(c)** - extrato hexânico e **(d)** - extrato diclorometano.

Em relação aos testes realizados com os infusos mesocárpico (figura 11) e foliar (figura 12) de *P. edulis*, os dados obtidos corroboram a ausência de efeitos alelopáticos sobre as radículas, em todas as três concentrações.

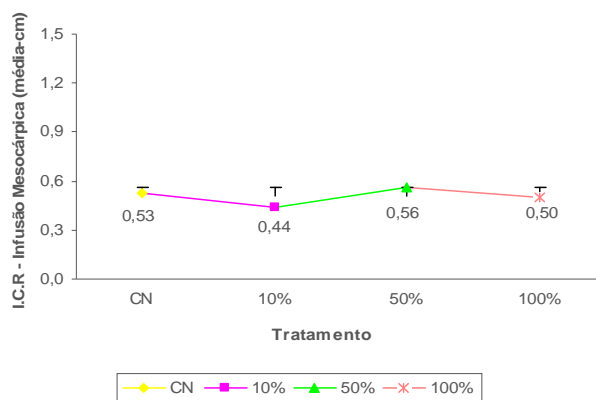


Figura 11 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

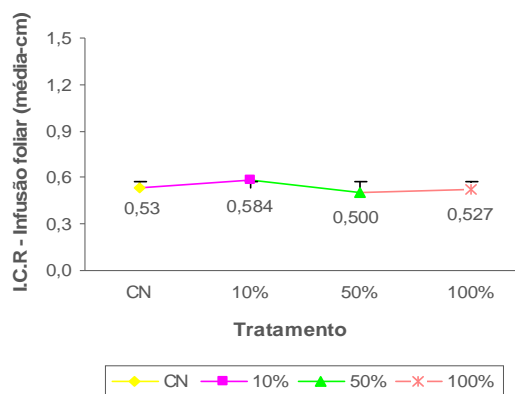


Figura 12 - Índice de Crescimento da radícula das sementes de *A. cepa* em resposta ao Tratamento Contínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

Ensaio que envolvam a relação entre índice de germinação e crescimento radicular de sementes submetidas a tratamento com plantas medicinais vêm crescendo a cada ano e evidenciam a importância de estudar todos os parâmetros para uma melhor caracterização dos efeitos alelopáticos de uma planta sobre outros organismos. Corrêa (2008) testou extrato aquoso de folhas e raízes de *Psychotria leuocarpa*, muito utilizada na medicina tradicional brasileira e, ao relacionar a porcentagem de germinação, a velocidade com que as sementes germinavam e o crescimento das radículas, observou que, ao contrário dos dados obtidos no presente trabalho, o extrato foliar reduziu todos os parâmetros analisados, porém, o

extrato radicular elevou o crescimento das radículas sem afetar os índices de germinação e velocidade de germinação.

Para testes com extrato foliar de *Plantagum* sp., quedas na porcentagem de germinação foram acompanhadas por aumento no comprimento radicular (STEIN et al., 2008). Já extratos de *Magnolia grandiflora* (ABDELGALEIL; HASHINAGA, 2007) inibiram em mais de 50% a germinação de sementes de *A. cepa* e reduziram o comprimento de seus comprimentos.

A alelopatia, processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas (SOARES, 2000), é característica de muitas espécies vegetais; todavia, os dados para *Passiflora edulis* são escassos e, na maioria absoluta dos casos, se restringem ao arilo de suas sementes. Balsalobre et al. (2006) afirmou que esses efeitos alelopáticos podem ser exercidos sobre as sementes de outras espécies vegetais e, até mesmo, sobre sementes de sua própria espécie, como forma de controle sobre sua germinação para que esta ocorra em condições propícias.

Diversos grupos de metabólitos secundários já foram atribuídos ao maracujá, contudo, estudos recentes referentes à sua composição química evidenciam como classes majoritárias os alcalóides, flavonóides e glicosídeos cianogênicos (MÜLLER, 2006).

Zucoloto (2005), em seus estudos sobre a composição química de folhas e mesocarpo de *P.edulis* abordou os compostos presentes nos extratos etanólico e acetato de etila, confirmando a presença de flavonóides dos tipos C-glicosídeos e isoflavonas (dentre outros) em ambos os extratos, tanto os obtidos através das folhas, quanto através do mesocarpo; contudo, esses compostos estavam presentes em maior quantidade no extrato acetato de etila, o que poderia explicar os resultados obtidos para o índice de germinação, uma vez que é bem documentado na literatura que as diversas classes de flavonóides são potencialmente alelopáticas (SIMÕES et al., 2000).

Para o mesocarpo, trabalhos de Lutomski e Malek (1975) relataram também a presença de alcalóides, que, segundo Simões et al. (2000), são capturados pelo extrato diclorometano, podendo ser o responsável pelos efeitos exercidos sobre a germinação das sementes expostas à concentração de 5 mg/mL deste extrato.

A demonstração de que o extrato etanólico foi o que mais restringiu a germinação das sementes de *A. cepa* pode ser atribuído ao fato de que o mesmo captura a maior quantidade de grupos químicos devido a sua polaridade. É sabido que, a maioria dos aleloquímicos apresentam seus efeitos potencializados quando em contato com outra(s) classe(s) de compostos (LARCHER, 2006), o que pode explicar a alta toxicidade demonstrada para o índice de germinação; desta forma, os diversos compostos nele presentes podem ter interagido e potencializado o efeito alelopático negativo sobre as sementes à ele expostas. À medida que as concentrações do extrato aumentam, percebe-se também uma queda significativa na capacidade de germinação, indicando que quanto maior a dose testada, maiores as concentrações de aleloquímicos e, conseqüentemente, menos sementes conseguirão emitir radícula.

Contudo, é interessante observar que seus efeitos sobre a germinação não se refletiram de maneira significativa na extensão radicular das sementes que germinaram, porém, é inegável que – ao se observar atentamente – os aleloquímicos presentes no extrato, à medida que as concentrações foram sendo elevadas, levaram a um retardo no crescimento, embora nada que afetasse o desenvolvimento normal das sementes.

A semelhança de resultados para os extratos hexânico e acetato de etila pode ser atribuída ao fato de que ambos possuem grupos químicos de metabólitos secundários semelhantes; contudo, a porcentagem de germinação nas duas maiores concentrações do extrato acetato de etila foi inferior ao obtido para as mesmas concentrações do extrato hexânico, provavelmente devido à presença de flavonóides somente no primeiro extrato e cuja concentração aumentou à medida que a concentração aplicada foi elevada.

A ausência de efeitos alelopáticos para as infusões mesocárpico e foliar de *P. edulis*, tanto para o índice de germinação quanto para o índice de velocidade de

germinação e desenvolvimento radicular, pode ser reflexo da diferença no tempo de exposição ao solvente (quinze minutos, em detrimento das setenta e duas horas no caso dos extratos) e das baixas concentrações das mesmas em relação aos extratos, uma vez que foram feitas diluições com água; além disso, os grupos químicos por ela extraídos podem ser distintos àqueles retidos pelos solventes utilizados no preparo dos extratos orgânicos(etanol, acetato de etila, hexano e diclorometano).

Isto reafirma a necessidade de testar diferentes formas de preparo para uma mesma planta, pois, dependendo da concentração e tipo de solvente utilizado para extrair os compostos, os resultados gerados podem ser divergentes, o que – no mínimo – oferece maiores informações sobre a atuação de seus metabólitos secundários.

5.3 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO

Todas as células, sejam elas provenientes de animais ou vegetais, precisam sair da interfase (fase de repouso) e passar pelo ciclo celular para se dividirem (figura 10). Metabólitos secundários podem interferir nas etapas de divisão, impedindo que a célula entre em divisão, cessando o crescimento do organismo, ou ainda, afetar o funcionamento do fuso mitótico, gerando anomalias nas fases do ciclo celular.

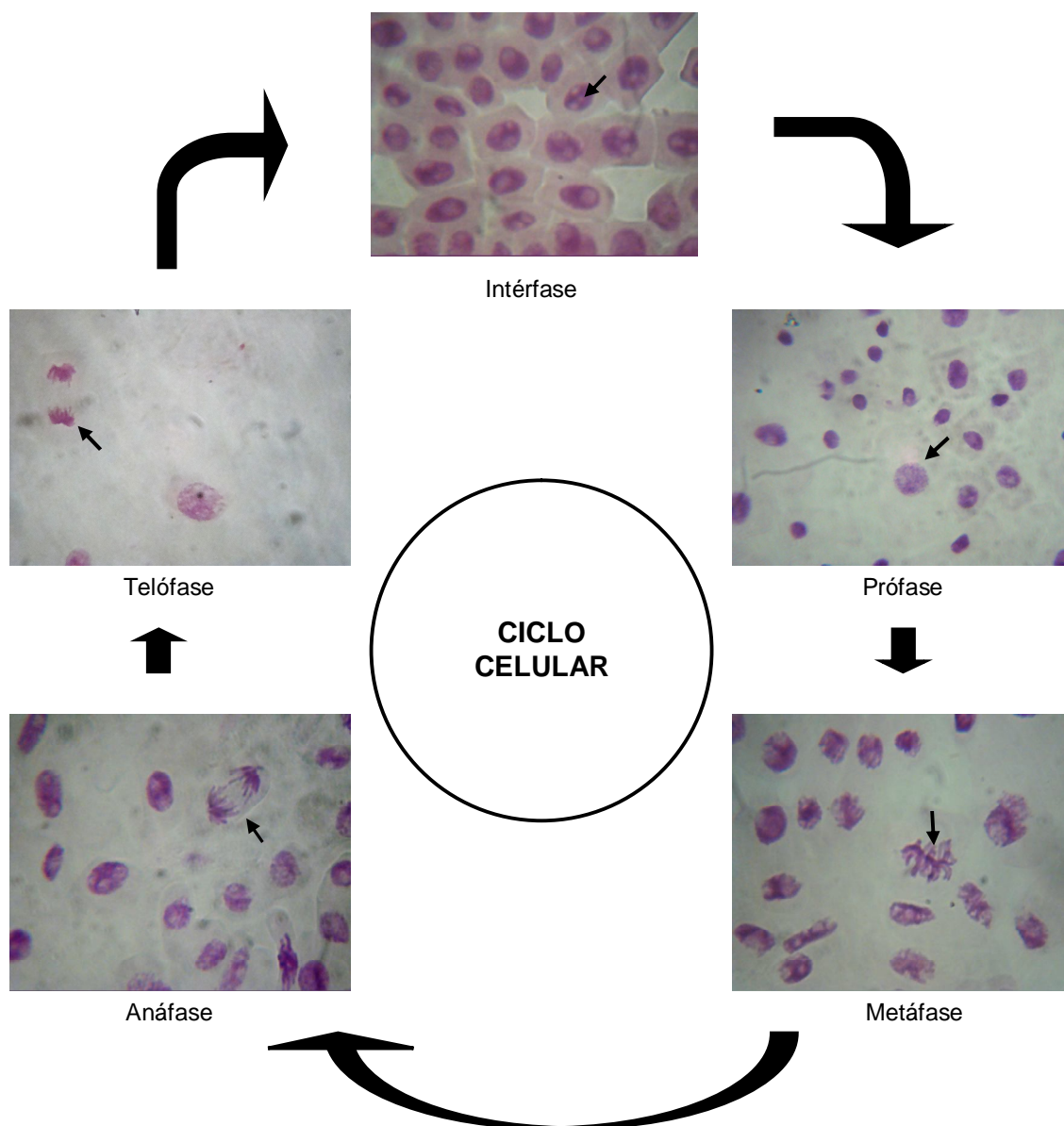


Figura 13 – Fotomicrografia esquematizando um ciclo de divisão celular normal, com suas respectivas fases. Aumento: 400X.

As radículas submetidas a tratamento com os extratos etanólico (figura 14a), acetato de etila (figura 14b), hexânico (figura 14c) e diclorometano (figura 14d), apresentaram alteração significativa no índice mitótico em todas as concentrações testadas. Em relação ao acetato de etila, o tratamento descontínuo crônico (72h), nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, não puderam ser avaliados uma vez que as células não responderam à coloração com reativo de Schiff.

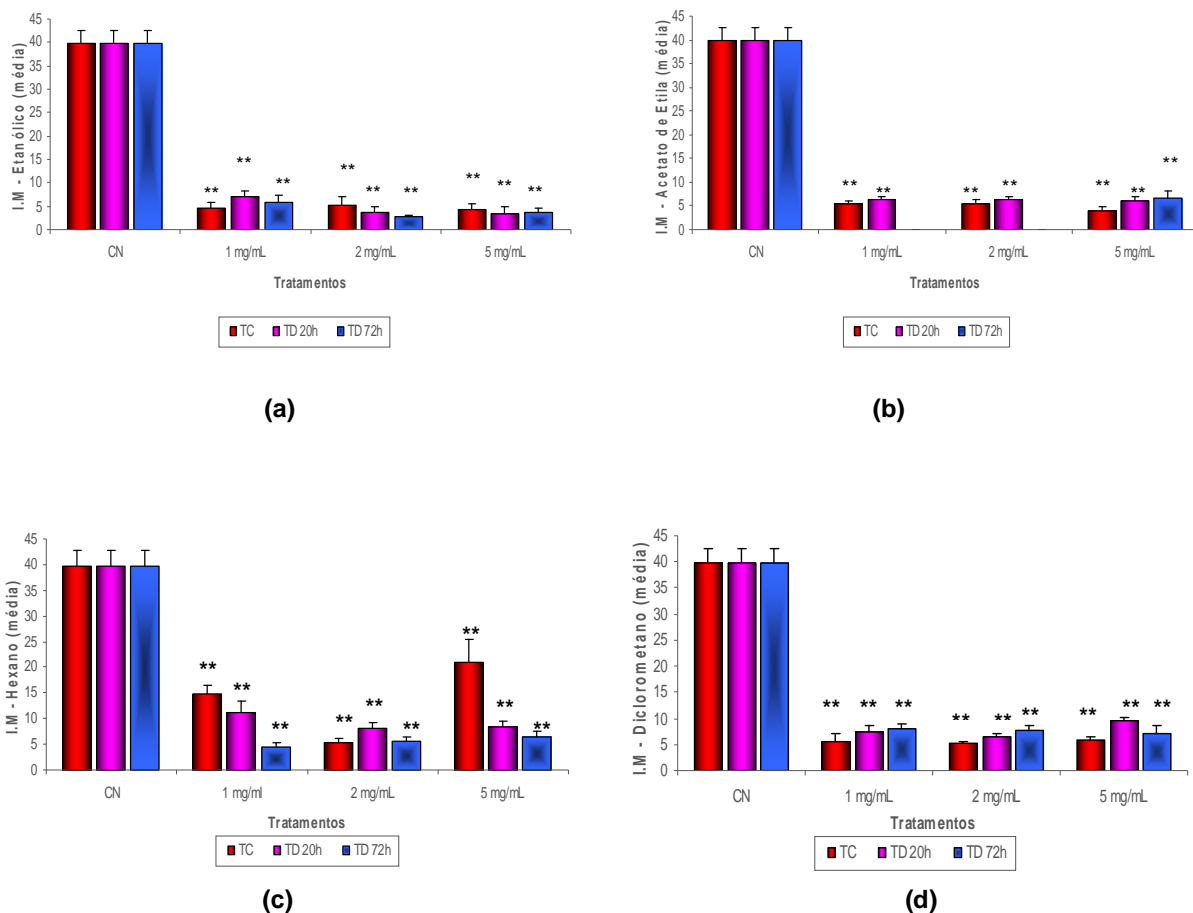


Figura 14 - Índice Mitótico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato foliar de *P. edulis* (1, 2 e 5 mg/mL). **(a)** - extrato etanólico; **(b)** – extrato de acetato de etila; **(c)** – extrato hexânico; e **(d)** – extrato diclorometano (** significativo a $p < 0,01$).

Em relação às radículas submetidas à germinação em meio contendo o infuso mesocárpico (figura 15), observou-se que somente a máxima concentração testada (100%) do tratamento contínuo influenciou significativamente o ciclo celular, reduzindo a capacidade das células de saírem do repouso e entrarem em divisão; já para o tratamento descontínuo agudo (20h), esse efeito foi observado em todas as concentrações testadas, evidenciando que a exposição aos compostos presentes no infuso, desde o início do processo germinativo, altera o bom funcionamento do ciclo. O mesmo não ocorreu para o tratamento descontínuo crônico (72h), pois resultados positivos só foram obtidos nas concentrações de 10 e 100% do infuso.

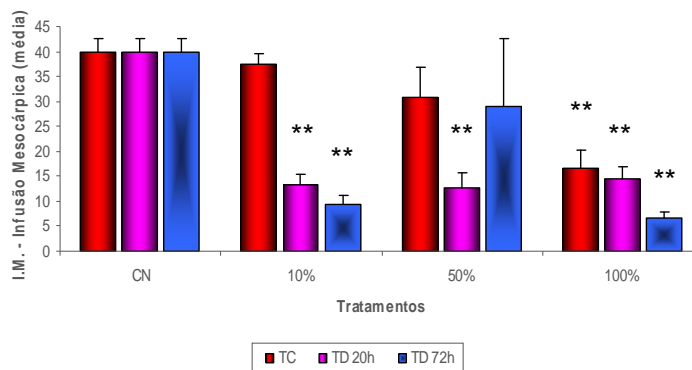


Figura 15 - Índice Mitótico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P. edulis* (10, 50 e 100%) (** significativo a $p < 0,01$).

O índice mitótico das sementes de *A. cepa* tratadas com o infuso foliar foi alterado em todos os tratamentos (contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico) e em todas as concentrações testadas (figura 16). Para a concentração máxima do tratamento descontínuo crônico, observa-se um pico na atividade mitótica, indicando que, ao permanecer mais tempo em contato com as substâncias ali concentradas, a célula passa a se dividir descontroladamente, em uma tentativa desesperada de sobrevivência do indivíduo frente às agressões imposta em seu meio.

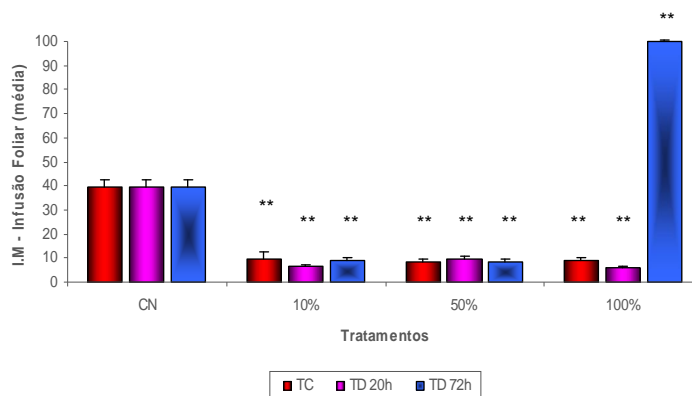


Figura 16 - Índice Mitótico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%) (** significativo a $p < 0,01$).

As alterações no índice mitótico das células que receberam o tratamento com os extratos foliares corroboram os efeitos alelopáticos obtidos para o índice de germinação, porém demonstram que, apesar de não terem afetado o crescimento das radículas, os aleloquímicos agiram em nível celular, restringindo a divisão. Nos infusos, a redução na capacidade celular de iniciar o ciclo de divisão comprova a importância de estudar os efeitos mutagênicos associando-os aos efeitos alelopáticos obtidos para o crescimento radicular e índice de germinação; neste caso, a ausência de efeitos para esses parâmetros não pode descartar a ocorrência de alelopatia, uma vez que a toxicidade se refletiu na divisão das células.

Almeida et al. (2008) são categóricos em afirmar que é preciso relacionar os efeitos alelopáticos sobre o crescimento com as alterações no índice mitótico e/ou rompimento de estruturas celulares como o núcleo e essa correlação é explorada por muitos autores, como Bagatini et al. (2007), que relataram queda na capacidade das células tratadas com infusos de diversas plantas medicinais em iniciar a divisão celular, associada à declínio no crescimento radicular.

Souza et al. (2005) investigaram a influência do extrato aquoso de folhas de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) e estévia (*Stevia rebaudiana*) sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) e perceberam que, conforme a concentração testada para o capim-cidreira aumentava, tanto o índice de germinação quanto o índice mitótico decaíam; já para extrato de estévia, a alteração ficou restrita à capacidade germinativa das sementes, não ocorrendo nenhuma anomalia no índice mitótico.

Tais resultados ratificam, portanto, aqueles descritos no presente estudo, reforçando a indicação de uma relação direta entre o índice mitótico e as alterações na porcentagem e velocidade de germinação, o que indica que muitas das alterações alelopáticas podem ser atribuídas às distorções no comportamento e no metabolismo celular.

5.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE EFEITO ANEUGÊNICO:

Os efeitos aneugênicos encontrados foram caracterizados por células em divisão portadoras de c-metáfase (figura 17a), anáfases multipolares (figura 17b), telófases com atrasos (figura 17c) e perdas cromossômicas (figuras 17d-e).

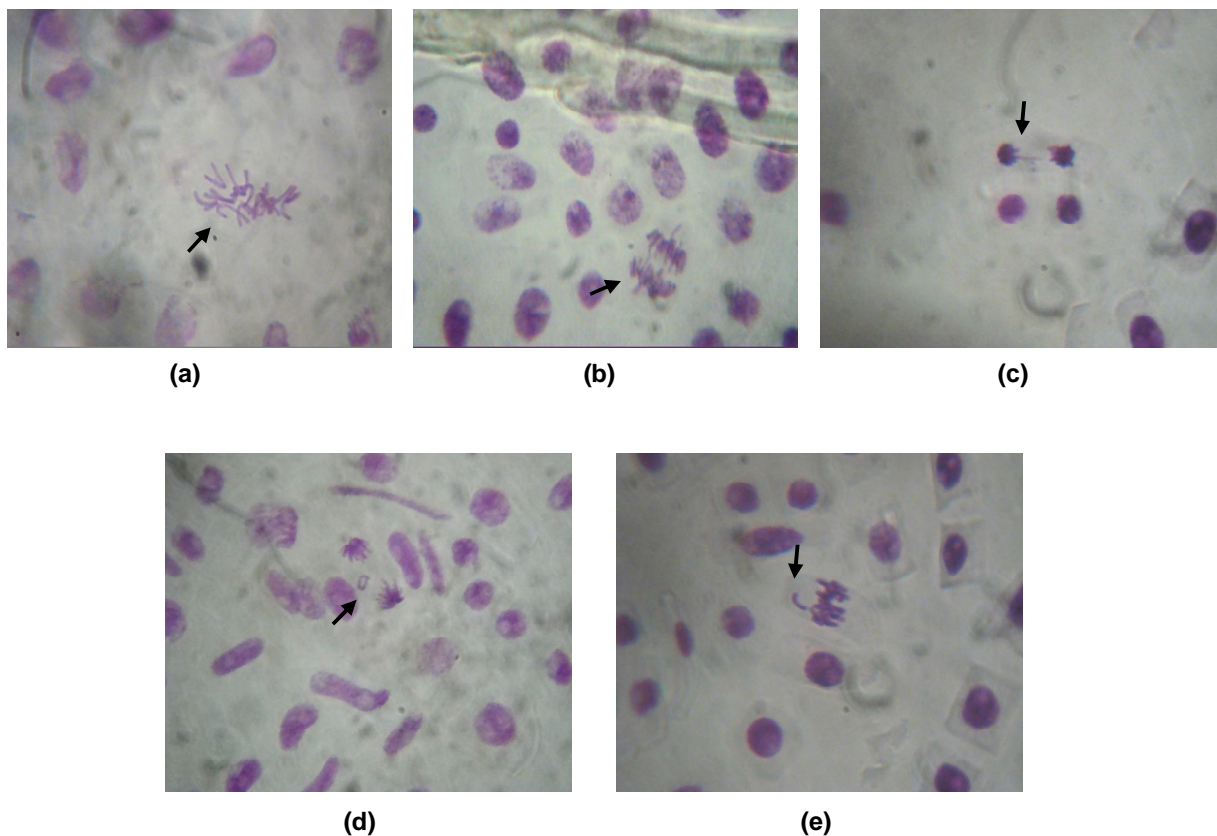


Figura 17 – Fotomicrografia representando alterações no ciclo celular que caracterizam efeito aneugênico; as setas destacam **(a)** – C-metáfase; **(b)** – anáfase multipolar; **(c)** – telófase com atraso; **(d)** - anáfase com perda cromossômica; e **(e)** – metáfase com perda cromossômica. Aumento: 400X.

Os resultados obtidos para os quatro extratos testados mostram que, somente o tratamento contínuo na concentração de 1 mg/mL do extrato diclorometano apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (figura 18), evidenciando que, as poucas células que conseguiram sair da interfase, seguiram o curso de divisão sem muitas anomalias. As demais concentrações dos outros extratos não refletiram alterações no índice de efeito aneugênico, porque – como visto no índice mitótico – as células nem chegaram a se dividir. Em relação ao

acetato de etila, o tratamento descontínuo crônico (72h), nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, não puderam ser avaliados porque as células não responderam à coloração com reativo de Schiff.

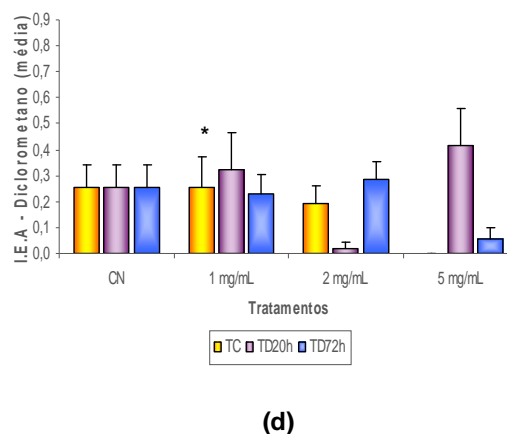
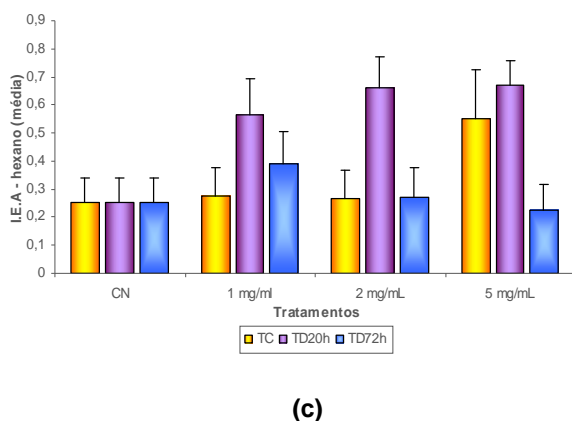
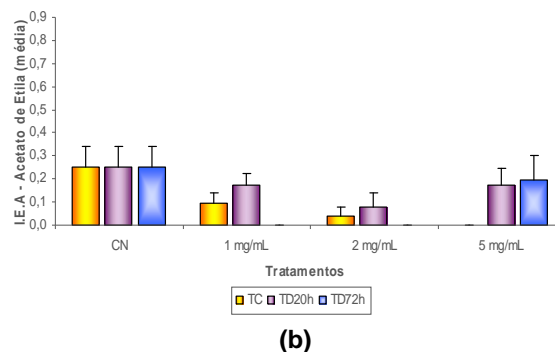
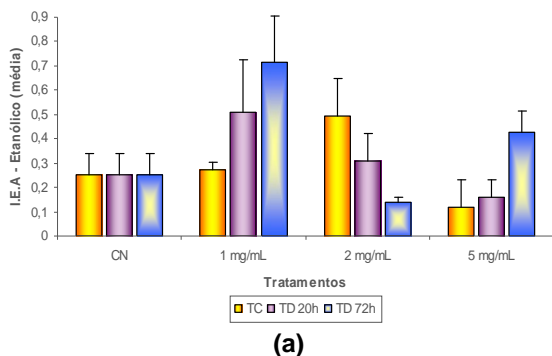


Figura 18 – Índice de Efeito Aneugênico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato de *P. edulis* (1, 2 e 5 mg/mL): (a) - extrato etanólico; (b) – extrato de acetato de etila; (c) – extrato hexânico; e (d) – extrato diclorometano (* significativo a $p < 0,05$).

Quanto ao infuso mesocárpico, as três concentrações testadas (10, 50 e 100%) em todos os tratamentos comportaram-se de maneira semelhante ao controle negativo, não apresentando, portanto, diferenças consideráveis entre os tratamentos (figura 19).

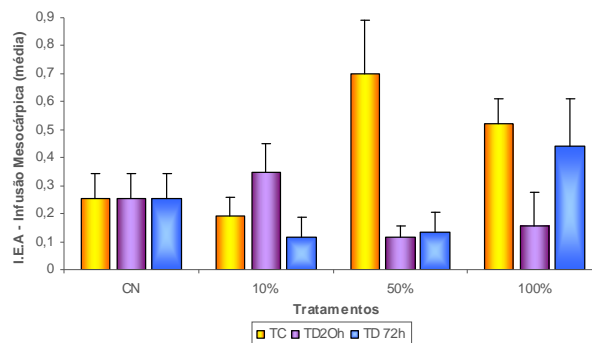


Figura 19 – Índice de Efeito Aneugênico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

Já para o infuso foliar concentrada (figura 20), as células das sementes submetidas ao tratamento descontínuo crônico apresentaram aumento nas anormalidades do ciclo celular, como anáfases e telófases com atraso, C-metáfases e perdas cromossômicas. O aumento de atividade mitótica das radículas expostas a esse tratamento (figura 16) foi acompanhado de elevado grau de anormalidades nas células-filhas.

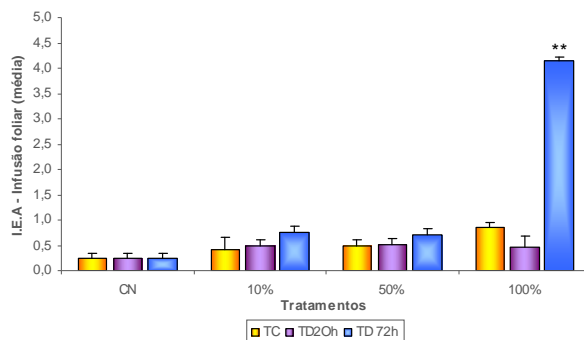


Figura 20 - Índice de Efeito Aneugênico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%). (* significativo a $p < 0,05$).

Evidências de efeitos aneugênicos ocasionados por aleloquímicos foram obtidos por Bharathi et al. (2006), quando investigaram os efeitos de seis espécies de *Gloriosa* sobre o ciclo celular de vegetais; eles encontraram elevado número de células portadoras de C-metáfase, além de perda cromossômica.

5.5 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE EFEITO CLASTOGÊNICO

Para avaliação dos efeitos clastogênicos, foram consideradas as células portadoras de alterações como aderência (figura 21a), micronúcleos (figuras 21b-c), pontes cromossômicas (figuras 21d-e) e morte celular (figura 21f).

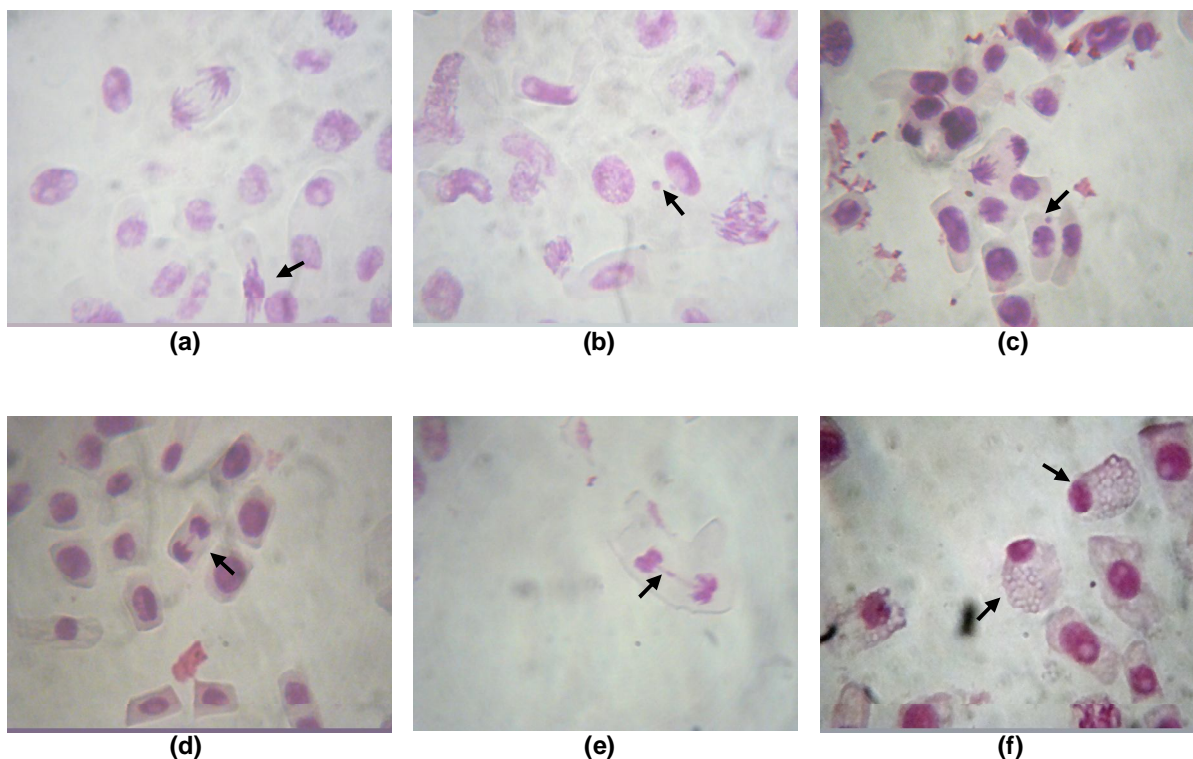


Figura 21 – Fotomicrografia representando alterações no ciclo celular que caracterizam efeito clastogênico; as setas destacam **(a)** – aderência; **(b)** – micronúcleo em prófase; **(c)** – micronúcleo em interfase; **(d - e)** – telófase com ponte cromossômica; e **(f)** – morte celular. Aumento: 400X.

De maneira geral, os extratos testados não apresentaram efeitos clastogênicos, provavelmente pelos mesmos motivos expostos anteriormente, quando tratou-se dos efeitos aneugênicos, com exceção dos extratos etanólico (tratamento contínuo,

concentração de 2mg/mL) e acetato de etila (na concentração de 2mg/mL do tratamento descontinuo agudo), que exibem alterações clastogênicas (figura 22).

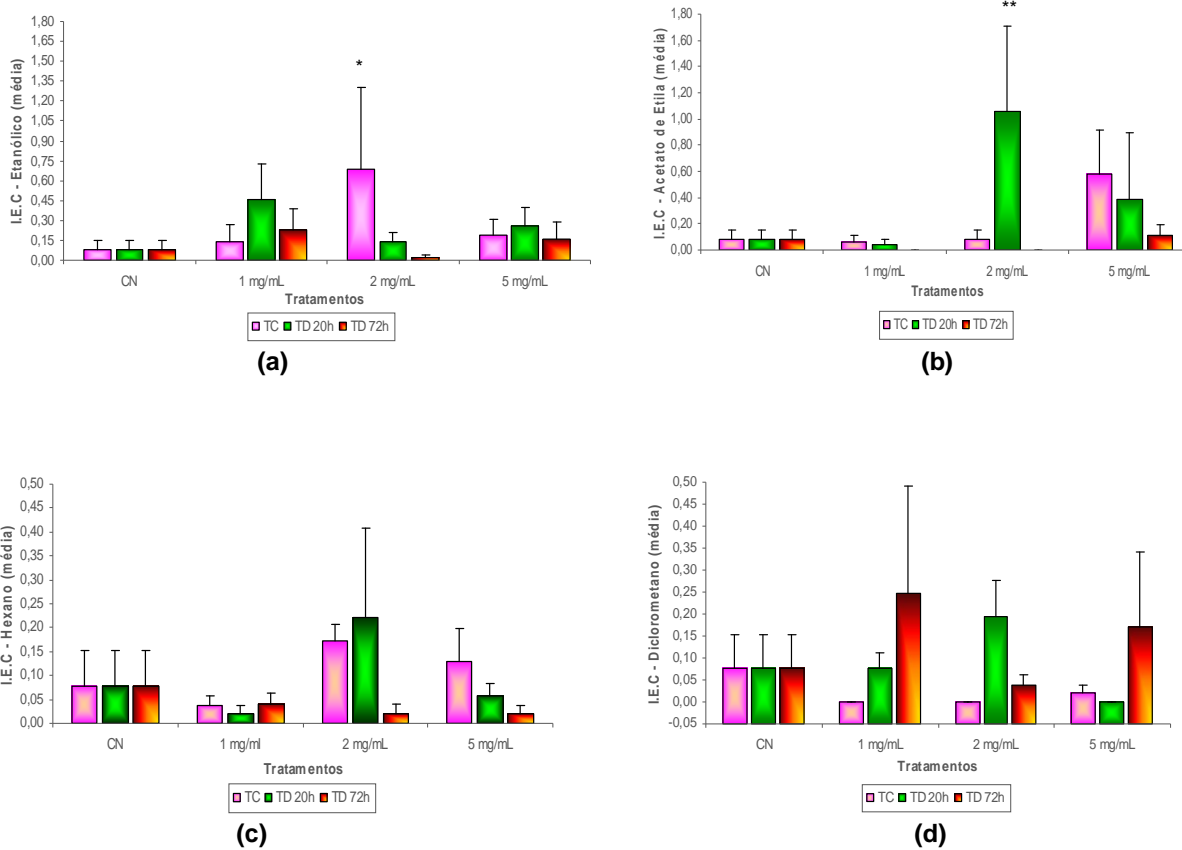


Figura 22 – Índice de Efeito Clastogênico nas sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuo com o controle negativo (CN) e três concentrações do extrato (1, 2 e 5 mg/mL). **(a)** - extrato etanólico; **(b)** - extrato de acetato de etila; **(c)** - extrato hexânico; e **(d)** - extrato diclorometano (* significativo a $p < 0,05$ e ** significativo a $p < 0,01$).

Em contraposição aos dados expostos acima, Souza (2005) encontrou elevados índices de clastogenicidade, caracterizados - principalmente - por formação de micronúcleos e pontes de anáfase, quando submeteu sementes de *A. cepa* à tratamento com 40 mg/mL do extrato aquoso de sálvia, espécie nativa do Rio Grande do Sul.

Também para os infusos mesocárpico (figura 23) e foliar (figura 24), não houve nenhuma alteração em relação ao controle. No caso da primeira, embora não significativamente, houve aumento deste parâmetro para os tratamentos contínuo e tratamento descontínuo agudo, enquanto ocorreu queda do índice de efeito clastogênico do tratamento contínuo crônico. Em relação ao extrato acetato de etila, o tratamento descontínuo crônico (72h), nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, não puderam ser avaliados pois as células não responderam à coloração com reativo de Schiff, provavelmente porque os aleloquímicos nele presentes afetaram a permeabilidade celular, fazendo com que as radículas crescessem além do normal.

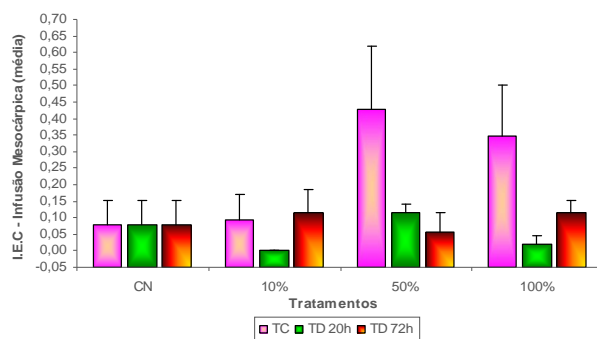


Figura 23 - Índice de Efeito Clastogênico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso mesocárpico de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

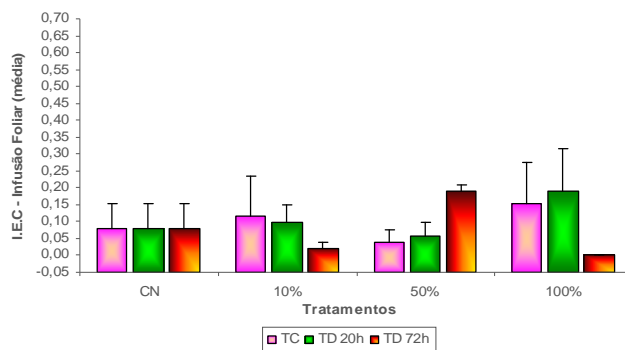


Figura 24 - Índice de Efeito Clastogênico das sementes de *A. cepa* em resposta aos Tratamentos Contínuo e Descontínuos agudo e crônico, com o controle negativo (CN) e três concentrações do infuso foliar de *P. edulis* (10, 50 e 100%).

De fato, todas as concentrações testadas para o tratamento descontínuo crônico, tanto para os extratos quanto para os infusos, apresentaram uma aceleração

anormal no crescimento à partir de 50h de exposição ao tratamento, porém, apenas as sementes tratadas com acetato de etila não responderam à coloração (figura 25).

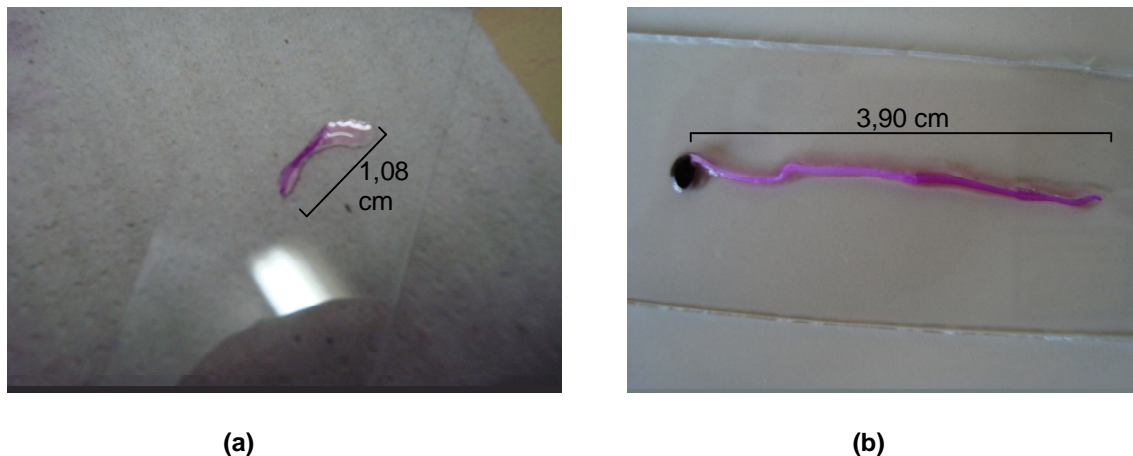


Figura 25 – Comparação entre o tamanho de (a) - uma radícula sem alteração e (b) - a radícula de uma semente submetida ao tratamento descontínuo crônico com extrato acetato de etila.

Anormalidades no crescimento radicular de plântulas de alface foram, também, relatadas por Mairesse et al. (2007) ao submetê-las a crescimento em contato com extratos aquosos de falso-boldo (*Plectranthus barbatus*), tiririca (*Cyperus esculentus*), babosa (*Aloe vera*) e açoita-cavalo (*Luehea divaricata*).

As radículas que não crescem demasiado apresentavam necrose ou bifurcação da região alelopática, inviabilizando a possibilidade de realização da coloração (figura 26).

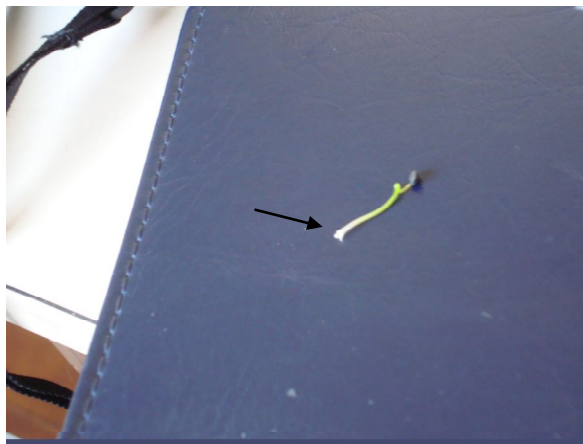


Figura 26 – Semente de *A. cepa* tratadas com o extrato acetato de etila, apresentando bifurcação da região meristemática.

Blanco (2007) afirma que a morfologia da raiz pode mudar com ação dos aleloquímicos; Pawlowski e Soares (2008) citam que a necrose da região meristemática de sementes expostas à metabólitos secundários é um dos sintomas mais comuns de alelopatia, contudo, muitas vezes esse acontecimento é negligenciado pelos pesquisadores. Eles ainda relatam que a necrose pode estar associada à alterações na permeabilidade celular, o que condiz com os resultados obtidos para a coloração das sementes submetidas ao tratamento descontínuo crônico com as concentrações de 1 e 2 mg/mL do extrato acetato de etila (figura 27b).

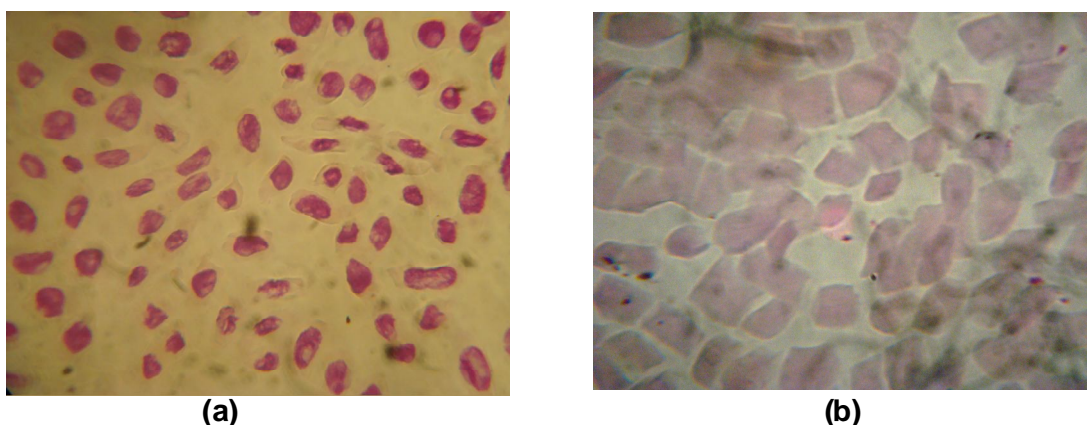


Figura 27 – Fotomicrografia de células meristemáticas de *A. cepa* **(a)** – células normais, com núcleo diferenciado pela coloração com Reativo de Schiff; **(b)** – células submetidas ao tratamento descontínuo crônico com as concentrações de 1 e 2 mg/mL do extrato acetato de etila, onde se observa alteração na permeabilidade celular, não sendo possível diferenciar o núcleo. Aumento 400X.

Segundo Blanco (2007), dentre os inúmeros efeitos celulares da alelopatia, um deles se refere à influência na permeabilidade celular, que – geralmente se reflete em alterações no crescimento radicular.

Em todas as concentrações do tratamento descontínuo crônico, para todos os extratos e infusos testadas, houve um aumento na quantidade de células mortas e micronúcleos; foi observado – também – a existência de células que, mesmo após terminada a divisão celular, permaneceram conectadas uma a outra por uma ponte (figura 28).

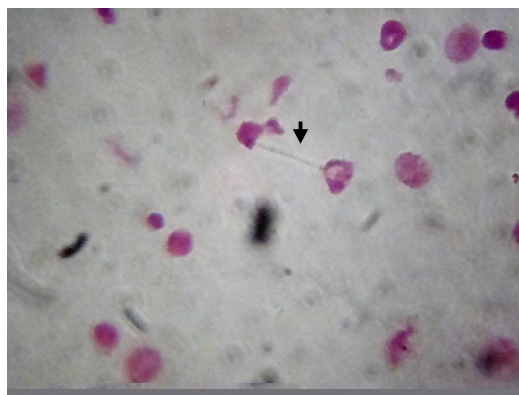


Figura 28 – Fotomicrografia de células radiculares de *A. cepa* submetidas ao tratamento descontínuo crônico, que continuam unidas por ponte. Aumento 400X.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É inegável o fato de que as espécies nativas necessitam de mais pesquisas que explorem todas as facetas de suas potencialidades; infelizmente, entretanto, não há uma tradição em unir diversas áreas de conhecimento na busca de resultados mais amplos e confiáveis. O estudo dos efeitos alelopáticos exercidos por um vegetal são, na maioria das vezes, desvinculados de análises celulares que aprofundem a investigação.

Os dados relatados neste trabalho reforçam a importância de relacionar os efeitos alelopáticos sobre o índice de germinação, índice de velocidade de germinação e crescimento radicular, com as alterações no ciclo de divisão celular, pois anomalias na capacidade de emissão das radículas e em seu desenvolvimento podem ser reflexo de anomalias no funcionamento celular.

Além disso, para ratificar o uso seguro para humanos das preparações aqui testadas, serão necessários testes que explorem mutagenicidade em animais; os resultados obtidos não deixam de ser extremamente importantes somente porque o organismo-teste foi um vegetal, uma vez que o código genético é universal e que o processo de divisão celular é semelhante em plantas e animais. Todavia, a metabolização dos compostos alelopáticos podem seguir rotas diferenciadas no corpo humano.

7 CONCLUSÕES

- O extrato etanólico foi responsável pelas maiores porcentagens de alelopatia registradas no estudo.
- Esse elevado índice de alelopatia se refletiu na capacidade de germinação das sementes, que foi drasticamente reduzida em todas as concentrações testadas deste extrato, evidenciando sua alta toxicidade.
- Observou-se uma inibição significativa na germinação das sementes tratadas com as duas maiores doses testadas (1 e 2 mg/mL) dos extratos hexânico e acetato de etila, que – também – mostraram os maiores índices de alelopatia.
- Para o extrato diclorometano, não houve uma considerável porcentagem de alelopatia, mas a capacidade de emissão radicular foi afetada na maior concentração (5 mg/mL), evidenciando um efeito alelopático negativo dos aleloquímicos ali presentes.
- O índice de velocidade de germinação foi reduzido significativamente apenas para os tratamentos com as duas maiores concentrações testadas do extrato etanólico, na concentração de 1 mg/mL do extrato hexânico e na concentração de 2 mg/mL do extrato diclorometano.
- Nenhuma concentração dos infusos mesocárpico e foliar foi capaz de afetar o índice de germinação, nem a porcentagem de germinação.
- Para os dois infusos testados, a porcentagem de alelopatia foi baixa e não houve alterações no tempo em que as sementes levavam para germinar.
- A análise do comprimento das radículas de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações dos quatro extratos testados e das infusões não revelou diferença significativa em relação ao controle negativo.

- Todas as concentrações testadas para extrato etanólico, acetato de etila, hexânico e diclorometano, tanto no tratamento contínuo quanto descontínuos agudo e crônico apresentaram significativa diminuição no índice mitótico.
- Para as sementes tratadas com o infuso mesocárpico, o índice mitótico foi afetado somente na concentração máxima da mesma (100%) no tratamento contínuo; todas as sementes expostas às três concentrações do tratamento descontínuo agudo e nas concentrações de 10 e 100% do tratamento descontínuo crônico, sofreram redução em suas taxas de divisão.
- O índice mitótico das sementes submetidas à exposição ao infuso foliar foi alterado em todos os tratamentos e em todas as concentrações testadas; a concentração máxima do tratamento descontínuo crônico caracterizou-se por aumento na atividade mitótica.
- No índice de efeito aneugênico (IEA), apenas a concentração de 1 mg/mL do tratamento contínuo do extrato diclorometano e a concentração de 100% no tratamento descontínuo crônico da infuso foliar apresentaram alteração significativa.
- Os extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e o infuso mesocárpico não alteraram o funcionamento do fuso em nenhuma concentração testada.
- Quanto ao índice de efeito clastogênico (IEC), somente os tratamentos com 2 mg/mL do extrato acetato de etila no tratamento descontínuo agudo e 2mg/mL do extrato etanólico no tratamento contínuo, apresentaram mudanças significativas.
- Nenhuma substância presente nos infusos foi capaz de gerar alterações no material genético.
- Não foi possível análise de índice mitótico, efeitos aneugênico e clastogênico nas concentrações 1 e 2 mg/mL do tratamento descontínuo crônico do

extrato acetato de etila, pois as células não responderam à coloração com reagente de Schiff, ficando com o meristema incolor; este fato indica que tratamento mais prolongado com acetato de etila altera a permeabilidade celular.

- Em todas as concentrações do tratamento descontínuo crônico, para todos os extratos e infusos testados, houve um aumento na quantidade de células mortas e micronúcleos; foi observado, também, a existência de células que, mesmo após terminada a divisão celular, permaneceram conectadas uma a outra por ponte.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDELGALEIL, S.A.M; HASHINAGA, F. Allelopathic potential of two sesquiterpeno lactones from *Magnólia grandiflora* L. **Systematics and ecology**, v.35, 2007.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALMEIDA, G.D. et al. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin**, v.61, n.1, p. 4237-4247, 2008.

ALMEIDA NETO, J. X. de et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) in vivo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.5, n.2, segundo semestre, 2005.

ALVES, M.C.S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação e no comprimento da raiz de alface. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, nov., 2004.

ALVES, S.S. **Potencial alelopático de espécies nativas do cerrado na germinação e desenvolvimento inicial de invasoras**. Dissertação – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, D.F., 2007.

BAGATINI, M.D. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, 2007.

BALESTRINI, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

* Formatação segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV).

BALSALOBRE, L. C. *et al.* Ação alelopática do arilo das sementes de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Dryand. In: **19ª RAIB**, v.68, suplemento 2, 2006.

Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/283.PDF>.

Acesso em: 01 dez. 2006.

BHARATHI, P. *et al.* Antimitotic effects of colchicine from six different species of *Gloriosa* in Onion roots (*A. cepa*). **Journal of medical science**, v.6, n.3, 2006.

BIESKI, I. G. C.; **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá- MT**. Monografia (Graduação *Lato Sensu* em Plantas Medicinais: manejo, uso e manipulação) - Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BLANCO, J. A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling**, n.209, 2007.

BRASIL. Diário Oficial da União. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.

Disponível em: <www.brasil.gov.br>. Acesso em: 16 out. 2006.

CARVALHO, J. E. de. **Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde**. 2004. Disponível em:

<www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf>. Acesso em: 15 out. 2006.

CIRAD/IPGRI. ***Passiflora edulis* Sims. (Passifloraceae)**. 2000. Project for Neotropical Fruits, 2000. Disponível em:

<http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/Ficha%20Passiflora%20edulis.htm>. Acesso em: 18 out. 2006.

CORRÊA, L.R. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understory species of subtropical forests. **South African Journal of Botany**, 2008.

COSTA, A. de F. S. da *et al.* **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória: Incaper, 2005.

DANDELLOT, S. et al. Allelopathic potential of two invasive alien *Ludwigia* spp.

Aquatic Botany, n.88, 2008.

DHAWAN, K. et al. Passiflora: A review update. **Journal of ethnopharmacology**,

v.94, p. 1-23, 2004.

DUCCA, F; ZONETTI, P.C. Efeito alelopático do extrato aquoso de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) na germinação e desenvolvimento de soja (*Glycine max* L.

Merril). **Revista em agronegócios e meio ambiente**, v.1, n.1, jan-abr, 2008.

FAGUNDES, F. A et al. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos.

Revista eletrônica de farmácia, Goiás, vol.2, n.1, p. 24-29, 2005.

FERREIRA, S. H. et al. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.**

Local: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da

ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n.12, 2000.

FERREIRA, M. A.; FERREIRA, M. B. **O novo aurélio século XXI**: dicionário da

língua portuguesa. Aplicativo do windows, versão 3.0. Nova fronteira. 2001. 1CD ROOM.

FERRO, D. **Fitoterapia**: conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 2006.

FISKEJO, G. The *Allium* test. As a standard in environmental monitoring. **Hereditas**

(Lund) v.102, p. 99-112, 1985.

FONSECA, V.B. **Avaliação do potencial toxicogenético e quimioprotetor do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L. in vivo.** Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

FONSECA, C.A. PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em plantas com atividade medicinal. **Informa**, v.39, n.11, nov., 2004.

FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.43, n.5, p. 487-492, 2000.

GATTI, A.B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *ocotea odorífera* (VELL) Rohwer**. Dissertação (Pós Graduação em Ecologia de Recursos Naturais), São Carlos, 2003.

GILMAN, E.F. Passion fruit. **Fact Sheet - Environmental Horticulture Department**. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, 1999.

GOBLO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

GRIFFITHS A.J.F et al. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, n.27, p.1-96, 2006. Disponível em: <www.sciencedirect.com> . Acesso em: 15 out. 2006.

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. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.79-82, jan./mar. 2006.

JARDIM, M. A. G.; MENDONÇA, L. F. R. de; FERREIRA, M. M. D. Os produtos naturais para o desenvolvimento sustentável e biotecnológico: um estudo sobre plantas antimaláricas no estado do Pará. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**, Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011213_02.pdf>. Acesso em: 16 out. 2006.

KLEIN, D. **Maracujá**. 2002. Página desenvolvida pelos alunos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, do ICTA da UFRGS, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/Alimentus/feira/afeira.htm>>. Acesso em: 20 set. 2006.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Editora, 2006.

LEME, DM et al. Comparação das respostas de sistemas testes de *Allium cepa*, utilizando sementes e bulbos para obtenção de meristemas radiculares, frente à exposição a metilmetano sulfonato, a trifluralina e a diferentes tratamentos de controle negativo. In: **51º Congresso Brasileiro de Genética**, 2005, Águas de Lindóia. Rio Claro: UNESP, 2005. 1 CD ROOM GENÉTICA.

LIMA, A. de A.; FANCELLI, M. Maracujá: uso medicinal. Cruz das Almas: **EMBRAPA**, n. 25, ago. 2003.

LIMA, A. de A. et al. Manejo de plantas infestantes na cultura do maracujá amarelo. Cruz das Almas. **Embrapa**, ago., 2004. Disponível em <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/circulares/circular_70.pdf>. Acesso em 01 dez. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische Untersuchungen der Drogen der Gattung *Passiflora*. IV. **Planta Medica**, v.27, p.381-384, 1975

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais : A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAIRESSE, L. A. S. et al. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.2, 2007.

MARASCHIN-SILVA, F.; ÁQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.4, jul./ago. 2006.

MARTINS, E.R et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995.

MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MELO, G. A. R. et al. **Polinizadores de maracujás no Paraná**. 2005. Projeto de pesquisa do Laboratório de Biologia Comparada de Hymenoptera do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Disponível em:
<<http://zoo.bio.ufpr.br/hymenoptera/maracuja.htm>> Acesso em: 27 nov. 2006.

MÜLLER, S. D. **Determinação de alcalóides e flavonóides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtos, *Passifloraceae* – maracujá doce**.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

NAN, C. et al. Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory cultures. **Aquatic Botany**, 2008.

PAWLOWSKI, A; SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicial de alface (*Lactuca sativa* cv Grand Rapids) por extratos alcoólicos de espécies de *Schinus* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, suplemento 2, p. 666-668, 2007.

PEREIRA, FC et al. Avaliação do potencial mutagênico de esgotos tratados, através do teste em células meristemáticas de *Allium cepa*. In: **51º Congresso Brasileiro de Genética**, 2005, Águas de Lindóia. Goiás: UCG, 2005.1 CD ROOM GENÉTICA.

PERIOTO, F. **Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth. E de *Anacardium humile* Mart. Na germinação e no crescimento de *L. sativa* L. e de *R. sativus* L.** Dissertação (Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

RAMOS, E.R.F. **O uso de *Passiflora* sp. no controle do diabetes mellitus: Estudo qualitativo preliminar**. Monografia (Graduação em Farmácia), Centro Universitário de Maringá, 2004.

RAVEN, P.R. et al. **Biologia Vegetal**. 6 ed. R.J. Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, L. R. , et al. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

SANO, S.M. et al. **Cerrado – Ecologia e flora. Vol.2**. Embrapa Cerrados. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1279p.

SÁ, U. M. de et al. Avaliação da água do canal São Gonçalo através do teste de *Allium cepa*. In: **XIV Congresso de Iniciação Científica**, 2005, Pelotas. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/xivcic/arquivos/CB_00392.rtf>. Acesso em: 17 out. 2006.

SCHNEIDER, E . **A cura e a saúde pelos alimentos**. Santo André: Casa, 1984.

SHRESTHA, P.M.; DHILLION, S.S. Medical plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p. 81-96, 2003.

SILVA, M.I.G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.4, p. 455-462, 2006.

SILVA, U.C. **Análise de flavonóides de *Acacia longifolia* Leguminosae-Mimosoideae**, 2001.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2000.

SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface por extratos aquosos de cinco espécies de *Gleichemiaceae*. **Floresta e Ambiente**, v. 7, p. 190-197, 2000.

SOUZA, J. R. P. de et al. Ação de extratos aquoso e etanólico de espécies vegetais na germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf. **Revista Semina**, Londrina, v. 23, n.2, terceiro trimestre, 2002. Disponível em: <http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_23_2.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2006.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul.** Monografia (Graduação de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Meio Ambiente) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

STEIN, V. et al. **GERMINAÇÃO E ÍNDICE MITÓTICO DE SEMENTES TRATADAS COM EXTRATO DE *Plantago australis* Lam.** 2008.

STELATO, L.M.N. et al. Avaliação do potencial mutagênico de resíduos processados da farinha de mandioca (*Manihot esculenta*) em ratos Wistar. **Arq. Mudi.**, Maringá, v.11, supl. 1, n.11, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 2 ed. Porto Alegre, Artmed, 2003. 7197p.

TEIXEIRA, I. R. et al. Consórcio de Hortaliças. **Revista Semina**, Londrina, v. 26, n.4, quarto trimestre, 2005. Disponível em:
<http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_26_4_19_10.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2006.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289-306, abr./jun., 2006.

VALSA, J. O.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of the effect of *Thuya occidentalis* tinctures. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.61, n.2, p. 329-332, mai. 2001.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

<http://www.agrapapaya.com>

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p. 147-152, jan./fev. 2001.

ZANINI, R.V. et al. Influência da dieta suplementada com farinha de maracujá amarelo (*P. edulis*) no metabolismo de *Rattus norvegicus* Wistar. **XVI CIC – IX ENPOS**, 27-29 nov/2007. Universidade Federal de Pelotas.

ZUCOLOTO, S.M. **Estudo fitoquímicos das folhas, frutos e raízes de *P. edulis* forma *flavicarpa* Degener**. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.