UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

TATIANE LEMOS PERDIGÃO

AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, FITOQUÍMICA E MUTAGÊNICA DE *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg EXPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

VITÓRIA

2012

TATIANE LEMOS PERDIGÃO

AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, FITOQUÍMICA E MUTAGÊNICA DE *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg EXPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal, linha de pesquisa em Comportamento Ecofisiológico de Vegetais.

Orientadora: Profª DSc. Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Co-orientadora: Prof ª DSc. Cláudia Masrouah Jamal

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Perdigão, Tatiane Lemos, 1979-
P433a Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg exposta a diferentes concentrações de alumínio / Tatiane Lemos Perdigão. – 2012.
82 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Coorientadora: Cláudia Masrouah Jamal.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Solos - Teor de alumínio. 2. Testes de mutagenicidade. 3. Nucleolo. 4. Flavonoides. I. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II. Jamal, Claudia Masrouah. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

TATIANE LEMOS PERDIGÃO

AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, FITOQUÍMICA E MUTAGÊNICA DE *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg EXPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof.ª DSc. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – UFES
Orientadora

_____

Prof.ª DSc. Cláudia Masrouah Jamal
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

_____

Prof. DSc. Antelmo Ralph Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

_____

Prof.ª DSc. Marciene Ataíde de Andrade
Universidade Federal do Pará
Examinador Externo

Ao meu marido Clayton, que sempre me incentivou.

À minha família por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À CAPES que a partir de seu fomento possibilitou a realização deste trabalho.

À profª. DSc. Maria Do Carmo Pimentel Batitucci, pela sua amizade, orientação e por ser um exemplo de vida.

À profª. DSc. Cláudia M. Jamal, pela co-orientação e todo apoio nos experimentos de prospecção fitoquímica e quantificação de flavonoides.

Ao prof. DSc. Antelmo Falqueto, pelas sugestões feitas ao longo do trabalho.

À profª. DSc. Marciene Ataíde Andrade, pela participação na banca.

A todos os professores e funcionários do PPGBV que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Ao pesquisador do Incaper, Inorbet de Melo Lima pela sua disponibilidade em ajudar e ao técnico da Coopruj Rafael.

Ao Sr. Israel Ewald pela doação de sementes.

A Irany e Raquel que tornaram a minha jornada mais leve, foi um prazer fazer parte desta equipe, levarei a amizade de vocês para sempre.

As minhas colegas de mestrado por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de laboratório e de outros laboratórios.

Aos colegas Gledyson e Leonardo por toda ajuda.

Ao Clayton meu marido e melhor amigo, que esteve presente em todos os momentos, agradeço pelo amor, apoio, amizade, paciência, carinho e por sempre me esperar.

À minha família, que mesmo distante sempre me apoiou.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desde trabalho,

Muito obrigada.

RESUMO

O estudo da influência do alumínio (Al) em duas cultivares da espécie *Passiflora edulis* foi apresentado para melhor compreensão deste trabalho em dois capítulos, sendo abordado o experimento com a cultivar (cv.) FB 100 e FB 200 respectivamente. O estudo com a cv. FB100 em casa de vegetação teve como objetivo verificar alterações morfofisiológicas após 15 dias de tratamento com Al. Para as plantas da cv. FB 200 avaliou-se a relação entre a ação mutagênica e a concentração de flavonoides produzidos por estas, quando cultivadas em solos com diferentes concentrações de Al. Foram realizadas análises de massa fresca e seca dos órgãos, comprimento do caule, área foliar, análise nutricional e verificação de Al nas folhas e raízes da cv. FB100. Para a prospecção fitoquímica dos extratos das folhas das cv. FB100 e FB200 utilizaram-se reações de coloração e precipitação para identificação das principais classes químicas presentes. A concentração de flavonoides foi determinada através da quantificação espectrométrica. Para o teste de mutagenicidade verificou-se a frequência de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos utilizando o extrato das folhas da cv. FB200. Todos os parâmetros morfológicos analisados para a cv. FB100 não diferiram estatisticamente dos controles. Entretanto foi observada maior concentração de Al nas raízes no tratamento de 5,32 mM. Todos os tratamentos indicaram a presença de alcaloides, flavonoides e esteroides nas folhas das plantas. No extrato hexano/diclorometano a maior concentração de flavonoides, foi observada no tratamento 0,33 mM de Al. Os resultados observados para a cv. FB200 apresentou maior concentração de Al foliar no campo com 0,33mM de Al (T2), os grupos majoritários encontrados foram saponinas, esteroides e flavonoides. O tratamento T2 apresentou a maior concentração de flavonoides e maior potencial mutagênico. Esses resultados indicam que o Al não promoveu alterações significativas nos parâmetros morfofisiológicos da cv. FB 100. Em *P. edulis* cv. FB 200 saponinas, esteróides e flavonoides ocorrem independentemente da concentração de Al disponível e provavelmente a maior concentração de flavonoide pode ter induzido a mutagenicidade em células de medula óssea de camundongos.

Palavras-chave: Alumínio no solo, metabólitos secundários, flavonoides, mutagenicidade, micronúcleo

ABSTRACT

The influence of aluminum (Al) in two cultivars of *Passiflora edulis* is presented in two chapters: first a discussion on the experiment with the cultivar (cv.) FB 100 and second with the cultivar (cv.) FB 200. The study with cv. FB100 in greenhouse aimed to verify morphophysiological changes after 15 days of treatment with Al. For cv. FB 200 plants was evaluated the relationship between the mutagenic and the concentration flavonoids produced by them, when grown in soils with different concentrations aluminum. Analyses of fresh and dry weight organs, stem length, leaf area, nutritional analysis and verification of Al in leaves and roots were studied on cv. FB100. For the leaves of cv. FB100 and cv. FB200 phytochemical screening of extracts were used staining and precipitation reactions for identification of the main chemical classes present. The concentration of the flavonoids was determined by spectrometric measurement. To mutagenicity test was found the frequency of micronucleus in 2000 polychromatic erythrocytes using the cv. FB200 leaves extract. All cv. FB100 morphological parameters analyzed did not differ from controls. However a higher Al concentration was presented in the treatment of 5.32 mM roots. All treatments showed the presence of alkaloids, flavonoids and steroids in leaves. The extract hexane/dichloromethane at a higher flavonoid concentration, has been observed in treating 0.33 mM Al. The cv. FB200 results showed higher foliar Al concentration in the field with 0.33 mM Al (T2), and saponins, steroids and flavonoids were the major groups found. The T2 treatment had the highest flavonoids concentration and higher mutagenic potential. These results indicate that Al did not promote significant changes in cv. FB 100 morphophysiological parameters. In *P. edulis* cv. FB 200 saponins, flavonoids and steroids occur regardless of the Al available and possibly the largest concentration of flavonoid mutagenicity can be induced in cells of mouse bone marrow.

Key words: Soil aluminium, secondary metabolics, flavonoids, mutagenicity, micronucleus

SUMÁRIO

RESUMO 6

ABSTRACT.....7

ÍNDICE DE FIGURAS.....13

ÍNDICE DE TABELAS.....15

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....16

I INTRODUÇÃO.....17

CAPÍTULO I: Análises morfológicas, nutricionais e fitoquímica de *Passiflora edulis* (FB100) submetidas a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva..22

1 APRESENTAÇÃO 23

2 OBJETIVOS.....24

2.1 Objetivo geral.....24

2.2 Objetivos específicos.....24

3 MATERIAL E MÉTODOS.....25

3.1 Local de realização dos experimentos.....25

3.2 Delineamento experimental em casa de vegetação.....25

3.2.1 Solução nutritiva.....26

3.2.2 Solução estoque de alumínio/ EDTA.....26

3.2.3 Tratamento.....27

3.3 Avaliações morfológicas.....29

3.3.1 Massa fresca e seca das folhas, caules e raízes.....29

3.3.2 Comprimento do caule.....29

3.3.3 Área foliar.....29

3.4 Análise de alumínio.....30

3.5 Análise nutricional das plantas.....30

3.6 Obtenção dos extratos.....30

3.6.1 Extrato Bruto Etanólico (EBE).....30

3.6.2 Extrato Hexano/ Diclorometano (HEX/D).....31

3.7 Prospecção fitoquímica.....31

3.7.1 Determinação de alcaloides.....31

3.7.2 Determinação de flavonoides.....32

3.7.2.1 Reação de cianidina.....32

3.7.2.2 Reação de $AlCl_3$.....32

3.7.3 Determinação de saponina.....33

3.7.4 Determinação de triterpenos e esteroides.....33

3.7.5 Determinação de taninos.....34

3.7.6 Determinação de cumarina.....34

3.7.7 Determinação de antraquinonas.....34

3.7.8 Determinação de naftoquinona.....35

3.8 Determinação do teor de flavonoides através de analise espectrométrica.....36

3.8.1 Curva padrão para flavonoides.....36

3.8.2 Quantificação de flavonoides nos extratos EBE e hexano/diclorometano.....37

3.9 Análise estatística dos dados.....38

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39

4.1 Massa fresca e seca das folhas, caules e raízes.....39

4.2 Comprimento do caule e área foliar.....40

4.3 Análise de alumínio nas folhas e raízes.....41

4.4 Análise química das plantas.....42

4.5 Prospecção fitoquímica.....42

4.6 Quantificação de flavonoides.....44

5 CONCLUSÃO.....46

CAPÍTULO II: Relação entre a ação mutagênica e concentração de flavonoides totais de plantas de *Passiflora edulis sims* f. *flavicarpa* Deg cv. FB 200 "YELLOW MASTER" coletadas em campos com diferentes concentrações de alumínio.....47

1 APRESENTAÇÃO 48

2 OBJETIVOS.....51

2.1 Objetivo geral.....51

2.2 Objetivos específicos.....51

3 MATERIAL E MÉTODOS.....52

3.1 Localização da área de cultivo.....52

3.2 Escolha da área de coleta.....52

3.2.1 Delineamento experimental.....53

3.3 Obtenção dos extratos.....54

3.3.1 Extrato Bruto Etanólico (EBE).....54

3.3.2 Extrato Hexano/ Diclorometano (HEX/ D).....55

3.4 Determinação da massa seca.....56

3.5 Análise química das folhas da cultivar FB 200.....56

3.6 Prospecção fitoquímica.....56

3.7 Quantificação espectrométrica de flavonoides.....57

3.8 Teste do micronúcleo.....57

3.8.1 Animais.....57

3.8.2 Tratamentos dos animais.....57

3.8.3 Etapas para a realização do teste do micronúcleo.....58

3.8.4 Análise das lâminas.....60

3.8.5 Análise estatística.....61

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....62

4.1 Análise de nutrientes e de alumínio no solo.....62

4.2 Análise nutricional e de alumínio das folhas da cultivar FB 200.....63

4.3 Prospecção fitoquímica das folhas da cultivar FB 200.....64

4.4 Quantificação de flavonoides utilizando extrato hexano/diclorometano.....66

4.5 Análise mutagênica.....67

5 CONCLUSÃO.....70

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....71

7 REFERÊNCIAS.....72

ANEXO 1 Solução nutritiva de Hoagland (1/2 força).....80

ANEXO 2 Análise química de solos FB 200.....81

ANEXO 3 Análise nutricional e de alumínio das folhas da cv. FB 200.....82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do Al trocável deslocando-se para a solução do solo (Modificado de Neto, 2001). 19

Figura 2: Representação dos cinco tratamentos. 26

Figura 3: Preparo da solução estoque de alumínio. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 27

Figura 4: Etapas do tratamento. (A) aplicação de solução nutritiva; (B) ajuste do pH. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 28

Figura 5: Medidor de bancada utilizado na avaliação da área foliar. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 30

Figura 6: Tubos de ensaio com os fragmentos de zinco. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 32

Figura 7: Teste para identificação do grupo saponina. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 33

Figura 8: Análise qualitativa para identificação de esteroides e triterpenos, com destaque para coloração verde, indicando resultado positivo para esteroides. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 34

Figura 9: Funil de decantação utilizado para a identificação de heterosídeo antracênico. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 35

Figura 10: Ausência de um anel vermelho na parte superior, indicando resultado negativo para naftoquinonas. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 36

Figura 11: Etapas da quantificação de flavonoides utilizando o extrato hexano/diclorometano. (Fonte: arquivo fotográfico do autor) 37

Figura 12: Curva padrão construída com rutina (0,5 mg/mL) a 420 nm, onde a equação de correlação e o coeficiente de determinação obtidos foram $y = 0,0273x - 0,0394$ e $R^2 = 0,9993$. 44

Figura 13: Divisão mitótica da linhagem eritrocitária com formação de micronúcleo, induzida pela substância teste. Após a expulsão do núcleo principal observa-se a permanência do micronúcleo no citoplasma das células filhas (Modificado de Almeida, 2008). 49

Figura 14: Vista parcial da área de cultivo Campo 2. (A) local onde foram coletadas folhas da cv. FB200 para prospecção fitoquímica, quantificação de flavonoides e mutagênese; (B) detalhe da coleta do solo das áreas estudadas para posterior análise laboratorial da concentração de alumínio (Fonte: arquivo fotográfico do autor). 52

Figura 15: Esquema da 1ª parte do trabalho realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Departamento de Farmácia da UFES onde **A** representa a prospecção fitoquímica e **B** a quantificação de flavonoides..... 53

Figura 16: Esboço da 2ª parte do trabalho, realizado no Laboratório de genética vegetal e toxicológica- UFES..... 54

Figura 17: Procedimento de secagem dos extratos em estufa. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 55

Figura 18: Acondicionamento dos extratos devidamente identificados e armazenados sob a proteção de luz por 72 horas. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 55

Figura 19: Sequência das etapas de tratamento e retirada de material para análise de micronúcleo. (A) pesagem para estabelecimento da dose administrada; (B) preparo da substância teste; (C) administração por via oral (gavage); (D) extração do fêmur; (E) retirada da medula óssea com auxílio de seringa preenchida com soro fetal bovino; (F) centrifugação da suspenção; (G) porção da medula sedimentada no fundo do tubo de ensaio. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 59

Figura 20: Preparação de lâminas para a análise de micronúcleos. (A) adição de 2 gotas de suspensão contendo as células da medula óssea; (B)aplicação do método do esfregaço; (C) etapa de secagem das lâminas ao ar; (D) lâminas na cuba de coloração contendo leishman (vista superior). (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 60

Figura 21: Fotos das análises das lâminas de células da medula óssea de camundongos. (A) setas indicam os eritrócitos policromáticos (EPC); (B) seta indicando micronúcleo em eritrócitos policromáticos; (C) seta indicando o eritrócito normocromático. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)..... 60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise físico-química e mineral da água utilizada na irrigação 28

Tabela 2 Efeito das concentrações de alumínio na produção de massa fresca das folhas, caule, raiz, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)]. 39

Tabela 3 Efeito das concentrações de alumínio na produção de massa seca das folhas, caule, raiz, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)]. 40

Tabela 4 Efeito das concentrações de alumínio no comprimento do caule e na área foliar, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)]. 40

Tabela 5 Quantidade de Al presente nas folhas e raízes[(1)] da cultivar FB 100 cultivadas em solução nutritiva contendo alumínio 41

Tabela 6 Teores de nutrientes para *Passiflora edulis* modificado de Costa et al. (2008) 42

Tabela 7 Análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Passiflora. edulis* cultivar FB100 tratadas com solução nutritiva de Hoagland 43

Tabela 8 Concentração de flavonoides nos EBE e extratos hexano/diclorometano 45

Tabela 9: Resultado da análise química dos solos coletados nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo. 62

Tabela 10: Resultado da análise nutricional das folhas de plantas coletadas nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo. 63

Tabela 11: Resultado da quantificação de Al nas folhas de plantas coletadas nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo. 64

Tabela 12: Análise fitoquímica do EBE das folhas de *Passiflora. edulis* cultivar FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al 65

Tabela 13: Concentração de flavonoides utilizando o extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cultivar FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al 66

Tabela 14: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) machos tratados com três concentrações do extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cv. FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al e os respectivos controles 68

Tabela 15: Relação de EPC/(EPC+ENC) analisados em 200 eritrócitos por animal para verificação da citotoxicidade 69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	Área foliar
Al	Alumínio
$AlCl_3$	Cloreto de alumínio
ARR	Área radicular relativa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CC	Comprimento do caule
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cv.	Cultivar
CDMSO	Controle do solvente dimetilsulfoxido
CH_3OH	Metanol
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DMSO	dimetilsulfoxido
EBE	Extrato bruto etanólico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
ERR	Elongação radicular relativa
FB 100	Cultivar Maguary do maracujazeiro
FB 200	Cultivar Yellow Master do maracujazeiro
HCA	Ácidos hidroxicinâmicos
HEX/D	Extrato hexano/diclorometano
IAC	Instituto agronômico de Campinas
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
Mg	Miligramas
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NH_4OH	Hidróxido de amônio
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Volume
µmol	Micromol

I INTRODUÇÃO

A distribuição da família Passifloraceae ocorre, principalmente, nas regiões tropicais das Américas (VARGAS et al., 2007; ZERAIK, & YARIWAKE, 2010) sendo a espécie *Passiflora edulis,* uma planta herbácea, encontrada em várias regiões do Brasil onde é conhecida como maracujá, maracujá-preto maracujá-mirim, maracujá de suco, maracujá-azedo, maracujá-liso, maracujá-peroba e maracujazeiro (CORRÊA et al., 2008; LORENZI & MATOS, 2008; ARAÚJO, 2005).

A produção de maracujá no Brasil tem crescido a cada ano. Em 2005 a área colhida foi de 35.820 hectares com uma produção de 479.813 toneladas e um rendimento de 13,40(t/ha) no ano. Em 2009 a área colhida cresceu para 50.795(ha) com uma produção de 718.798 (t), e rendimento de 14,15 t/ha (EMBRAPA, 2009; IBGE, 2009). O estado do Espírito Santo ocupou o 4º lugar na produção nacional em 2009.

Devido à grande demanda por polpa e suco de frutas para o consumo, tanto no mercado nacional quanto no internacional, a fruticultura do maracujá no estado do Espírito Santo apresenta grande potencial de crescimento, uma vez que, o estado possui excelentes condições para o cultivo comercial, com grande parte da área geográfica possuindo condições de clima e solo propícias para o desenvolvimento do maracujazeiro (COSTA & COSTA, 2005).

Tem sido comercializado no estado sementes das cultivares: seleção Maguary (FB100), híbrido Flora Brasill (FB200), híbridos IAC e seleção regional do Espírito Santo da espécie *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Degener (COSTA et al., 2005). As cultivares FB 100 e FB 200, foco desde trabalho, são principalmente destinadas às indústrias e ao mercado de frutas frescas, respectivamente.

Além do potencial mercantil do fruto, existe a relevância comercial na área fitoterápica, tendo, neste caso, as folhas grande importância. A aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas por meio do Decreto nº5. 813, e a criação de programas com objetivos voltados para promover a inclusão da agricultura familiar na produção das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos, (BRASIL, 2009) pode se tornar uma alternativa na diversificação do aproveitamento de sua cultura, além disso, *P. edulis* está incluída na relação nacional de plantas

medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) tornando o seu estudo relevante. Esta espécie tem sido amplamente empregada na área fitoterápica e tem ação ansiolítica, sedativa, anti-inflamatória, diurética, anti-helmíntico, no tratamento de hipertensão e sintomas da menopausa (SIMÕES et al., 2000; DHAWAN et al., 2004; BENINCA et al., 2007; DENG et al., 2010; LI et al., 2011).

Para o aproveitamento da matéria-prima vegetal, alguns aspectos agronômicos são importantes, como a área para cultivo, sistema de cultivo, colheita, secagem e beneficiamento (REIS & MARIOT, 2000). Sabe-se que o Alumínio (Al) é um elemento abundante na crosta terrestre e um fator limitante no desenvolvimento normal da planta em solos ácidos. Um dos primeiros sintomas de toxicidez de alumínio é a inibição no crescimento da raiz, devido a interferência do Al no processo de divisão celular, este se liga ao fosfato da molécula de DNA ocassionando a reduçao na atividade de replicação e de transcrição (NETO et al., 2001;RONG et al., 2010). Os valores de pH dos solos variam na faixa de 3 a 10 e a maior disponibilidade de nutrientes ocorre na faixa de pH entre 6.0 a 7.0. No Brasil aproximadamente 70% dos solos cultivados apresentam acidez excessiva (NETO et al., 2001).

Em estudos realizados por Pires et al. (2003), observou-se que 44% dos solos do Estado do Espírito Santo apresentaram acidez ativa elevada e 47% acidez ativa média, cerca de 89% das amostras de solos apresentaram média a alta acidez potencial sendo justificado pela alta proporção (89,1%) dos solos observados apresentarem teores de alumínio (Al^{+3}) trocável na faixa de médio a alto.

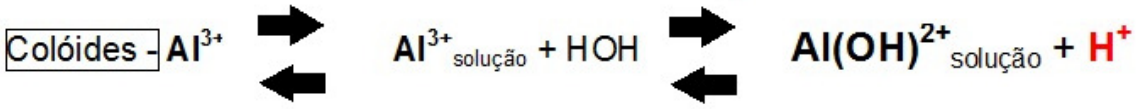

Figura 1: Representação do Al trocável deslocando-se para a solução do solo (Modificado de Neto, 2001).

O alumínio trocável, além de gerar acidez ativa, é um elemento altamente fitotóxico (Figura 1). Entre vários problemas o alumínio atua no meristema apical da raiz, interrompendo a divisão celular, portanto paralisando o crescimento das raízes (NETO et al., 2001). Os sintomas da toxicidade do alumínio surgem nas raízes, estas se tornam curtas, grossas, quebradiças e adquirem coloração amarronzada (FAQUIN, 2001). Peixoto et al. (2007), relatam este tipo de problema em estudo feito com plantas de sorgo expostas ao alumínio. Ao final de 10 dias de tratamento, foram observados decréscimos no crescimento do sistema radicular e da parte aérea, como também redução na formação de raízes laterais.

Os efeitos do alumínio no sistema radicular ainda foram relatados em cultivares de arroz por Vasconcelos et al. (2002) que observaram redução da área radicular relativa (ARR) quando adicionou alumínio à solução nutritiva, da mesma forma a elongação radicular relativa (ERR) também se mostrou afetada. Em plântulas de soja, Nolla et al. (2007) verificaram que além da redução do crescimento radicular esperado no pH mais baixo, o aumento da concentração de alumínio na solução resultou em uma maior espessura das raízes. Contudo, Salvador et al. (2000), observaram em seus estudos com mudas de goiabeiras que as ações fitotóxicas do alumínio estavam mais relacionadas a parte aérea, contrariando a maioria dos relatos que observam os primeiros sintomas de toxidez no sistema radicular. Também verificaram que concentrações de até 10 mg L^{-1} de Al proporcionou efeitos positivos de crescimento.

De acordo com Faquin (2001) espécies de plantas e, até mesmo, cultivares dentro de uma mesma espécie, têm demonstrado variação no comportamento em relação a sensibilidade da toxidez de alumínio, o que poderia ser explicado por alguns mecanismos de tolerância que sugerem exclusão do alumínio pelas plantas (por alteração do pH na rizosfera diminuindo a solubilidade do Al; ou complexação do Al por muscilagem no sistema radicular) ou tolerância interna (por complexação do elemento por compostos orgânicos).

A adubação e a nutrição do maracujazeiro influenciam na alta produtividade do cultivo (COSTA et al, 2005), portanto é importante, em solos como encontrado no Estado do Espírito Santo, a prática da calagem, visando diminuir a toxicidade de Al e aumentar a disponibilidade de macronutrientes no solo. Entretanto as condições ideais para o desenvolvimento e produção de biomassa nem sempre são as mesma para a produção de substâncias de interesse, uma vez que muitas espécies produzem determinados metabólitos quando submetidas a condições limitadas de disponibilidade de recursos (REIS & MARIOT, 2000; FERRO, 2006).

Fatores como irrigação e fertilização interferem significativamente no acúmulo de metabólitos, podendo ser responsável pelo aumento ou diminuição nas suas concentrações, interferindo assim, na qualidade do produto final (BASSO; PISANTE apud CAROLLO, 2008). Além disso, quando as plantas são produzidas por cultivo pode-se monitorar os principais metabólitos secundários, o que permite definir o melhor período de colheita da espécie (CALIXTO apud CAROLLO, 2008).

O produto originário do metabolismo secundário para o organismo produtor não é necessariamente essencial. Entretanto, poderá trazer vantagens para sua sobrevivência e a perpetuação de sua espécie (SIMÕES et al., 2000). Este metabolismo secundário demonstra uma importante função na interação das plantas com o meio ambiente, levando em consideração fatores bióticos e abióticos, sendo que alguns produtos dos compostos secundários são de interesse comercial em diversas áreas (SALOMÉ, 2007).

Os compostos químicos de *P. edulis* compreende os flavonoides glicosilados, alcalóides, flavonoides, álcoois, ácidos graxos, taninos e resinas (CORRÊA et al., 2008). Araújo (2005) também descreve alguns outros constituintes químicos do maracujá como; esteróides, glicosídeos de aglicona triterpenóide, aglicona cianogênica, prunasina, oxicumarinas, sais minerais, saponina e pectina.

Em *P.edulis* o grupo flavonoides é bastante estudado, por se acreditar que a ação medicinal dessa planta possa estar associada a ele. Os flavonoides encontram-se em maior concentração nas partes aéreas das plantas medicinais, e apresentam várias propriedades terapêuticas como, antinflamatória, antioxidantes, ação contra infecções virais, fúngicas e bacterianas, diurético entre outras (FERRO, 2006).

Para que as plantas medicinais sejam utilizadas com segurança e eficácia comprovadas devem ser realizados estudos pré-clíncos, toxicológicos e clínicos. Entre os testes recomendados pelas agências internacionais e nacionais para estabelecer a avaliação e registro de novos produtos químícos, o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito (RIBEIRO et al., 2003).

Os testes de mutagenicidade detectam agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações, que são mudanças que ocorrem na sequência do DNA. No teste do micronúcleo, são observados nos eritrócitos policromáticos (EPC) anucleados, o surgimento de fragmentos cromossômicos (micronúcleos) resultante de quebras. Os EPC possuem tempo de vida curto, logo o aparecimento dos micronúcleos indicam danos recentes (RIBEIRO et al., 2003). A frequência de micronúcleos nos EPC, que indicara se o resultado do teste foi positivo ou negativo para determinada substância.

As plantas medicinais são bastante utilizadas pela população e podem apresentar propriedades terapêuticas, mas também podem causar risco à saúde. Por isso de acordo com Moreira et al., (2002) avaliar o potencial mutagênico dos compostos provenientes da planta, é de grande importância para diminuir os riscos de se expor a essas substâncias.

Este trabalho propôs testar a hipótese de que cultivos de *Passiflora edulis* apresentarão maior teor de flavonóides, capazes de provocar atividade mutagênica, quanto maior for a acidez provocada pela alta concentração de alumínio disponível no solo.

CAPÍTULO I

Análises morfológicas, nutricionais e fitoquímica de *Passiflora edulis* (FB100) submetidas a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva

1 APRESENTAÇÃO

O cultivo de plantas em solução nutritiva para avaliar os efeitos do Alumínio (Al) é relatado em vários estudos (SALVADOR et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2002; PEIXOTO et al., 2007; CRUZ et al., 2008; PEREIRA et al., 2008) e se caracteriza por ser uma técnica relativamente simples, com os efeitos de variáveis minimizadas, possibilizando o isolamento do fator alumínio a ser analisado .

Estudos de avaliação da tolerância ao Al em plântulas de maracujazeiro em solução nutritiva completa e simples indicaram que a toxidez do Al foi observada em curto prazo e com menores concentrações de Al que a solução nutritiva completa (SILVA, 2009). Entretanto, Macedo et al. (2011), trabalharam com o efeito do Al em plântulas de pinhão-manso cultivadas em solução nutritiva completa e verificaram que a presença do Al, mesmo em baixa concentração, afetava o crescimento da espécie. Outros estudos mostram que o uso da solução nutritiva completa caracteriza uma técnica bem adotada para a avaliação dos efeitos do Al em plantas cultivadas, bem como a seleção de plantas tolerantes ao Al (SIVA et al., 2006; SANTOS et al., 2010; GUERCIO & CAMARGO, 2011).

São vários os efeitos causados pelo Al tóxico. Contudo, o alvo primário de sua ação é o sistema radicular das plantas, que se apresentam curtas, grossas e quebradiças, levando a alterações na absorção de nutrientes e água (VASCONCELOS et al., 2002; CRESTANI et al., 2009). Danos na parte aérea da planta podem vir a ocorrer posteriormente dependendo do tempo de exposição e da concentração de alumínio. Entretanto Salvador et al. (2000) relata que ações fitotóxicas do Al em mudas de goiabeiras relacionaram-se mais com a parte aérea da planta, contrariando certas linhas de evidência.

Além das alterações morfológicas que o alumínio pode causar, existem as alterações fisiológicas que podem ocorrer, visto que variações nas condições ambientes podem interferir na produção de substâncias pelas plantas.

Assim, objetivo do trabalho foi verificar alterações morfofisiológicas em plantas de *Passiflora edulis* cultivar FB 100 (Maguary) submetidas a diferentes concentrações de Al em solução nutritiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar alterações morfofisiológicas em *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg cultivar FB 100 (Maguary) submetidas a diferentes concentrações de Al em solução nutritiva.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva sobre as variáveis massa fresca e massa seca de folhas, caule e raiz; os comprimentos do caule e da área foliar em plantas de *Passiflora edulis*;

- Verificar a presença de Al nas folhas e raízes de *P. edulis*;

- Realizar análise nutricional das folhas de *P. edulis;*

- Realizar prospecção fitoquímica dos extratos obtidos das folhas de *P. edulis*, submetidas a diferentes concentrações de Al em solução nutritiva;

- Quantificar flavonoides presentes no extrato etanólico e no extrato hexano/diclorometano das folhas de *P. edulis.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação do Departamento de Ciências Biológicas, com temperatura média 28 °C (±2), irrigação controlada e radiação média de 414 µmol m^2 s^{-1}, localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES. Os experimentos do ensaio fitoquímico e da quantificação de flavonoides foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES.

3.2 Delineamento experimental em casa de vegetação

As sementes de *Passiflora edulis* cv. FB100- Maguary foram germinadas em março de 2011 em bandejas com areia lavada e esterilizada com solução de ácido clorídrico 5%. Uma observação deve ser feita em relação a este cultivar, que também é denominada FB 300. Estes cultivares (FB 100 e FB 300) eram distintos, porém foram mesclados em experimentos agronômicos, originando um único cultivar. Então optamos neste trabalho em utilizar apenas a terminologia FB 100. No 12º dia após a germinação as plântulas foram transplantadas para vasos de 10 L com areia lavada, sendo uma planta por vaso. No início do experimento aplicou-se solução nutritiva de Hoagland (½ força), três vezes na semana, utilizando-se 100 mL da solução por vaso. Entretanto, com o crescimento das plantas a força da solução nutritiva foi duplicada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos para a cultivar (Figura 2). Após 116 dias do transplantio das plântulas iniciou-se o tratamento com três concentrações de alumínio (de 0,33 mM, 2,66 mM e 5,32 mM de $AlCl_3$). Os tratamentos controle (T1) e pH 4 (T2) não apresentavam Al na solução nutriva. O pH do tratamento controle foi ajustado a 5,5 a 6,5 a cada aplicação da solução nutritiva. O tratamento pH foi incluído para verificar se os possíveis efeitos dos tratamentos seriam causados pelo Al ou pela acidez da solução. Os demais tratamentos apresentavam concentrações de 0,33 mM, 2,66 mM e 5,32 mM de

cloreto de alumínio/EDTA ($AlCl_3$/EDTA). Cada tratamento foi composto de 18 plantas expostas durante 15 dias a diferentes concentrações de alumínio.

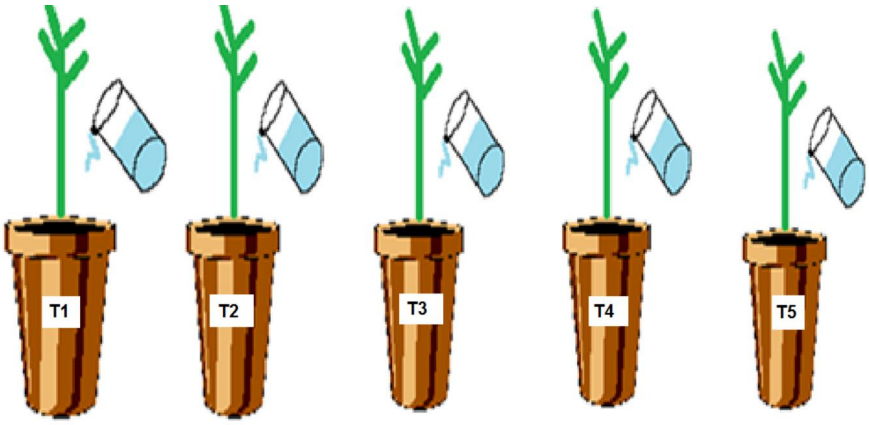

Figura 2: Representação dos cinco tratamentos.

T1: Solução nutritiva com pH ajustado 5,5 a 6,5

T2: Solução nutritiva com pH ajustado 4,0 a 4,3

T3: Solução nutritiva com 0,33 mM, de Al/EDTA e pH ajustado 4,0 a 4,3

T4: Solução nutritiva com 2,66 mM de Al/EDTA e pH ajustado 4,0 a 4,3

T5: Solução nutritiva com 5,32 mM de Al/EDTA e pH ajustado 4,0 a 4,3

3.2.1 Solução nutritiva

Utilizou-se solução nutritiva modificada (HOAGLAND & ARNON, 1950), constituída por KH_2PO_4; KNO_3; $MgCl_2$. $6H_2O$; $MgSO_4$. $7H_2O$; $CaCl_2$. $2H_2O$; $CaSO_4$. $2H_2O$; $NaNO_3$; NH_4NO_3; Fe-EDTA; H_3BO_3; ZnSO4. $7H_2O$; $CuSO_4$. $5H_2O$; $MnCl_2$. $4H_2O$ e $NaMoO_4$. $2H_2O$ (Anexo 1). Ao final de cada preparação da solução nutritiva, o pH foi verificado e ajustado conforme cada tratamento com soluções de 1 M de NaOH ou 1M de HCl.

3.2.2 Solução estoque de alumínio /EDTA

Preparou-se a solução estoque com 20 mM de alumínio na forma $AlCl_3$. $6H_2O$ e 20 mM EDTA (Figura 3). O cloreto de alumínio e o EDTA foram diluído em 400 mL de

água destilada e reservado. Misturou-se o alumínio e o EDTA e completou-se o volume para 1L. Esta mistura foi colocada em uma placa aquecedora e aguardou-se a fervura, para assegurar à completa complexação do alumínio seguindo a metodologia proposta por Mendham et al. (2002). Logo após a fervura retirou-se a mistura da placa aquecedora. A solução foi utilizada a temperatura ambiente.

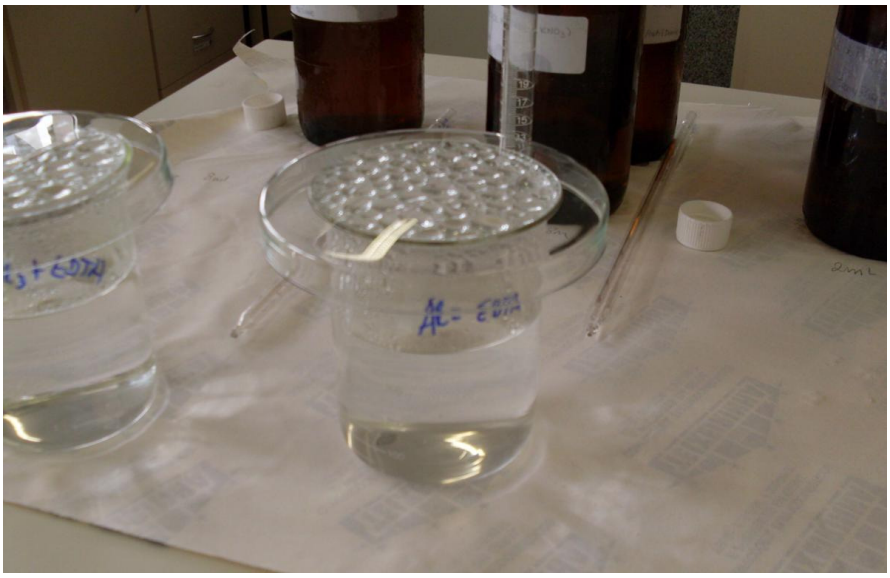

Figura 3: Preparo da solução estoque de alumínio. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.2.3 Tratamento

As plantas foram expostas a solução nutritiva contendo alumínio por um período quinze dias e esta foi aplicada três vezes por semana (Figura 4 A). Para o tratamento controle o pH foi ajustado entre 5,5 a 6,5 (Figura 4 B). O tratamento pH e os tratamentos com as diferentes concentrações de alumínio (0,33 mM, 2,66 mM e 5,32 mM de $AlCl_3$) tiveram seu pH ajustado entre 4 a 4,3. Foi utilizada água destilada para preparo da solução nutritiva com alumínio. A água da irrigação foi analisada pelo Laboratório de Análise Agronômica e Consultoria Ltda - FULLIN na cidade de Linhares – ES e suas características estão apresentadas na Tabela 1.

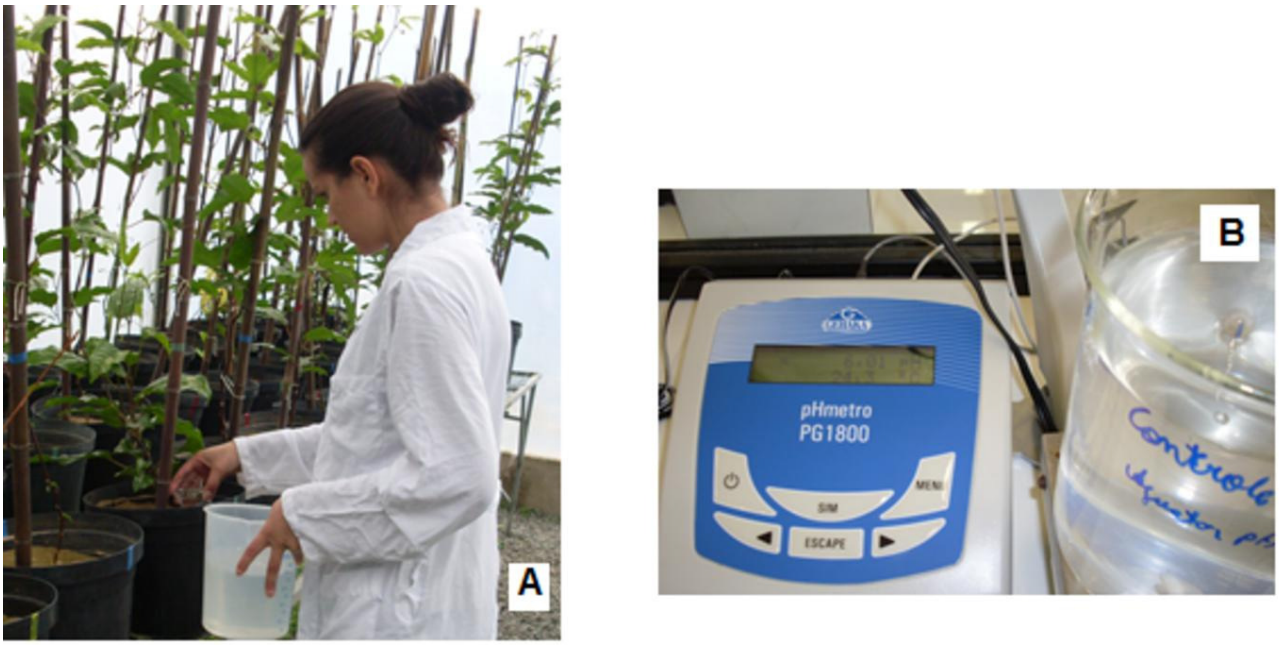

Figura 4: Etapas do tratamento. (A) aplicação de solução nutritiva; (B) ajuste do pH. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

Tabela 1: Análise físico-química e mineral da água utilizada na irrigação

Parâmetro	Amostra
Condutividade Elétrica dS/m	0,09
pH	6
Razão de Adsorção de Sódio	0,29
Ferro Reduzido (mg L^{-1})	Nd
Ferro Oxidado (mg L^{-1})	Nd
Ferro Total (mg L^{-1})	0,06
Sódio (meq/L)	0,16
Cloro (meq/L)	0,1
Carbonato (CO_3^{-2}) (mg L^{-1})	Nd
Dureza ($CaCO_3$) (mg L^{-1})	32,47
Bicarbonato (HCO_3^{-2}) (mg L^{-1})	Nd
Sulfato (SO_4^{-2}) (meq/L)	0,22
Fosfato (PO_4^{-2}) (mg L^{-1})	0,09
Potássio (mg L^{-1})	1,8
Cálcio (meq/L)	0,51
Magnésio (meq/L)	0,14
Boro (mg L^{-1})	0,02
Manganês (mg L^{-1})	0,01
Zinco (mg L^{-1})	0,01
Cobre (mg L^{-1})	0,01
Alumínio (mg L^{-1})	0,08
Nitrogênio (mg L^{-1})	0,38

Fonte: Laboratório FULLIN

3.3 Avaliações morfológicas

As avaliações morfológicas foram realizadas após os quinze dias de exposição ao alumínio. Para análise morfológica foram utilizadas seis repetições de cada tratamento. Foram realizadas medidas de massa fresca e seca das folhas, caule, raiz e comprimento do caule. A área foliar foi avaliada utilizando o medidor de bancada modelo LI-3100 C (LI-COR, Biosciences).

3.3.1 Massa fresca e massa seca das folhas, caules e raízes

Foi determinada a massa fresca das folhas, caule e raízes de cada grupo-tratamento com seis repetições utilizando-se uma balança de precisão. O material foi armazenado em estufa, sendo acondicionado em sacolas de papel previamente identificadas. Após a secagem a massa seca foi determinada, usando uma balança de precisão.

3.3.2 Comprimento do caule

Foi determinado o comprimento do caule por planta de cada grupo-tratamento com 6 repetições utilizando-se uma trena milimetrada, mediu-se da base do caule até o ápice .

3.3.3 Área foliar

Foi avaliado a área foliar de cada grupo-tratamento com 6 repetições e utilizou-se o medidor de bancada modelo LI-3100 C LI-COR, Biosciences (Figura 5).

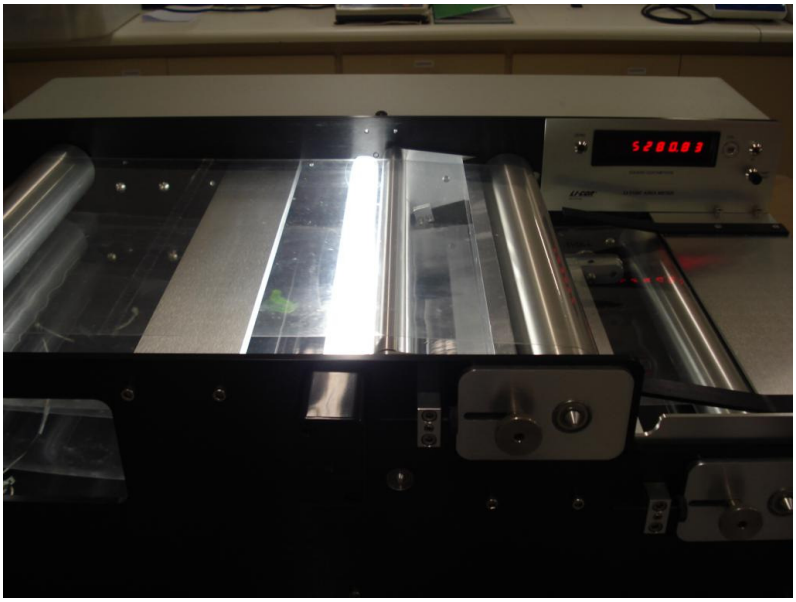

Figura 5: Medidor de bancada utilizado na avaliação da área foliar. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.4 Análise de alumínio

A análise de alumínio em material vegetal (folhas e raízes) foi realizada ao final do tratamento pelo Laboratório de Análise Agronômica e consultoria LTDA- FULLIN na cidade de Linhares – ES, segundo metodologia proposta por Malavolta (1997).

3.5 Análise nutricional das plantas

Para análise nutricional, as folhas de cada tratamento foram secas, identificadas e enviadas ao Laboratório da FULLIN. Foram analisados: nitrogênio; fósforo; potássio; cálcio; magnésio; enxofre; ferro; zinco; cobre; manganês e boro.

3.6 Obtenção dos extratos

3.6.1 Extrato Bruto Etanólico (EBE)

As folhas foram submetidas à secagem em estufa e posteriormente trituradas até a obtenção de um pó. Este material foi submetido ao processo de maceração utilizando álcool etílico como solvente extrativo por 72 horas, a temperatura

ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente o material foi filtrado e o solvente foi eliminado sob vácuo, através de evaporador rotativo (Tecnal modelo TE- 210). Os extratos obtidos foram armazenados em baixa temperatura.

3.6.2 Extrato Bruto Hexano/Diclorometano (HEX/D)

O pó obtido por trituração das folhas após secagem em estufa foi submetido a solvente extrativo 1:1 (V: V) de hexano e diclorometano por 72 horas, a temperatura ambiente, e protegida da luz, posteriormente o material foi filtrado e o solvente foi eliminado sob vácuo, através de evaporador rotativo (Tecnal modelo TE- 210). Os extratos obtidos foram armazenados em baixa temperatura.

3.7 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada com o intuito de identificar grupos de metabólitos secundários como alcalóides, flavonoides, saponina, triterpenos, esteróides, taninos, cumarina, heterosídeo antracênico e naftoquinona. Para tanto foram utilizadas alíquotas do EBE de cada tratamento que foram submetidas à metodologia sugerida por Costa (1982). O detalhamento de cada uma destas etapas encontra-se em sequência.

3.7.1 Determinação de alcaloides

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em etanol, adicionou-se 1mL de HCl concentrado e gotas do reagente de Draggendorf, reservou e aguardou-se a reação. Em presença de alcalóide desenvolve precipitado laranja.

3.7.2 Determinação de flavonoides

3.7.2.1 Reação de cianidina

Diluiu-se 20 mg de extrato em 12 mL de etanol, e em seguida colocou-se 2,5 mL desta solução em um tubo de ensaio conforme descrição abaixo:

Tubo de ensaio: Extrato etanólico + 1 mL de HCl + fragmentos de zinco, onde a reação com mudança de cor identificará o tipo de composto (Figura 6);

3.7.2.2 Reação de $AlCl_3$

Diluiu-se 20 mg de extrato em 12 mL de etanol, e em seguida colocou-se uma alíquota desta solução em uma cápsula conforme descrição abaixo:

Cápsula: Extrato etanólico + $AlCl_3$ + aquecimento (até secar completamente), e posterior observação da fluorescência sob luz U.V. A observação de fluorescência de coloração amarela, indica resultado positivo para flavonoides.

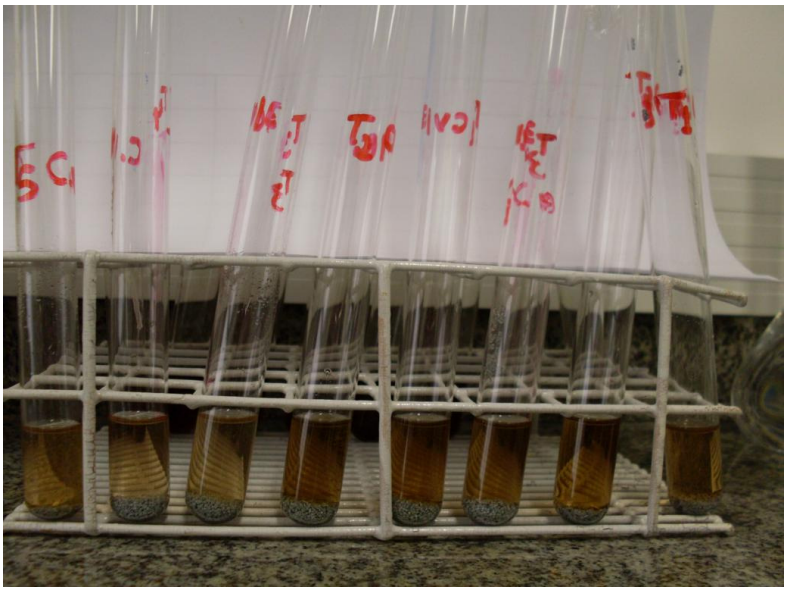

Figura 6: Tubos de ensaio com os fragmentos de zinco. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.7.3 Determinação de saponina

No extrato bruto etanólico (EBE) diluído adicionaram-se gotas de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) até obtenção da neutralidade. A cada adição de (Na_2CO_3) ao extrato foi verificado o pH com uma fita teste. Após atingir o pH neutro a mistura foi aquecida até a ebulição. Aguardou-se o resfriamento e completou-se o volume para 100 mL. O tubo fechado foi agitado energicamente por 40 segundos. Após repouso, observou-se o aparecimento de espuma persistente com mais de 1cm de altura, indicando a presença de saponina (Figura 7).

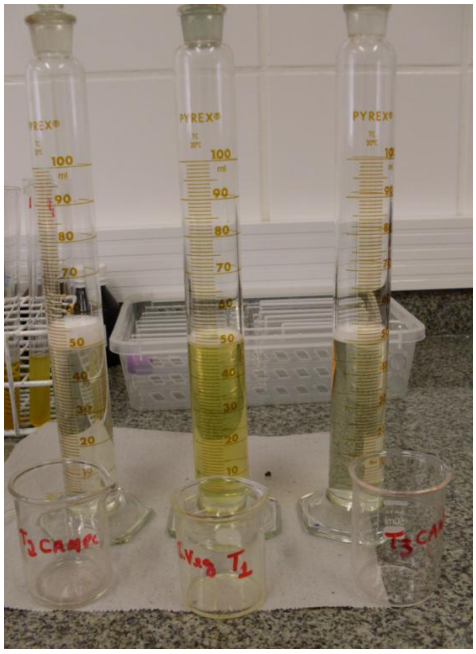

Figura 7: Teste para identificação do grupo saponina. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.7.4 Determinação de triterpenos e esteróides

Em um tubo de ensaio colocou-se uma alíquota do extrato com 10 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 2 mL de anidrido acético, o tubo foi agitado suavemente e por último foi adicionado gotas de ácido sulfúrico puro. A formação de uma coloração verde indica presença de esteroides (Figura 8), a coloração variando de castanho a vermelho é indicativo da presença de triterpenos.

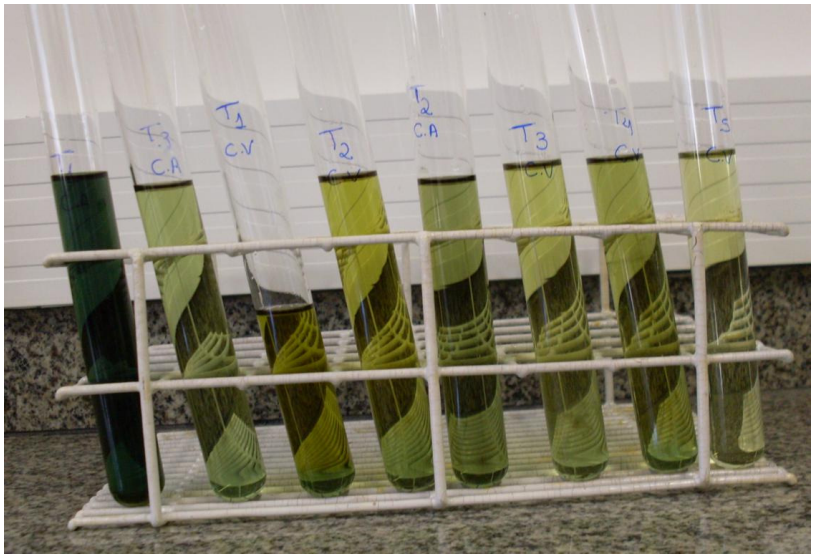

Figura 8: Análise qualitativa para identificação de esteroides e triterpenos, com destaque para coloração verde, indicando resultado positivo para esteroides. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.7.5 Determinação de taninos

Solubilizou-se uma alíquota do EBE em 5mL de água destilada e acrescentou-se gotas de cloreto férrico 10%. Os taninos pirogálicos apresentam coloração azul ou violeta enquanto os taninos pirocatéquicos desenvolvem a cor verde.

3.7.6 Determinação de cumarina

Aplicou-se uma gota do EBE em uma tira de papel filtro, depois de seco observa-se a mancha sob luz U.V. Aplicou-se uma gota de hidróxido de potássio (KOH) a 10% na mancha observada anteriormente e novamente se observa em luz U.V. A fluorescência azul ou amarela na parte exposta da mancha indica a presença de cumarina.

3.7.7 Determinação de antraquinonas

Diluiu-se uma alíquota do extrato com etanol sendo acrescentado 10mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 10%. Verteu-se a mistura para um funil de decantação (Figura 9)

e adicionou-se éter etílico para a extração de possível heterosídeo que pudesse existir no extrato. O funil foi agitado e em seguida a fase aquosa foi filtrada sendo a fase orgânica reservada em um tubo de ensaio. Na fase aquosa foi acrescentado novamente éter a fim de se fazer outra filtração, tendo ao final do procedimento 3 tubos de ensaio com fase orgânica e 1 tubo de ensaio com a fase aquosa. Por fim acrescentou-se nos 4 tubos 2mL de KOH 10% e avaliou mudança de coloração na parte inferior do líquido.

Figura 9: Funil de decantação utilizado para a identificação de heterosídeo antracênico. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.7.8 Determinação de naftoquinona

Solubilizou-se uma alíquota do EBE em 3 mL de clorofórmio e adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH). Avaliou-se a formação de um anel vermelho na parte superior que seria o indicativo da presença de naftoquinona (Figura 10).

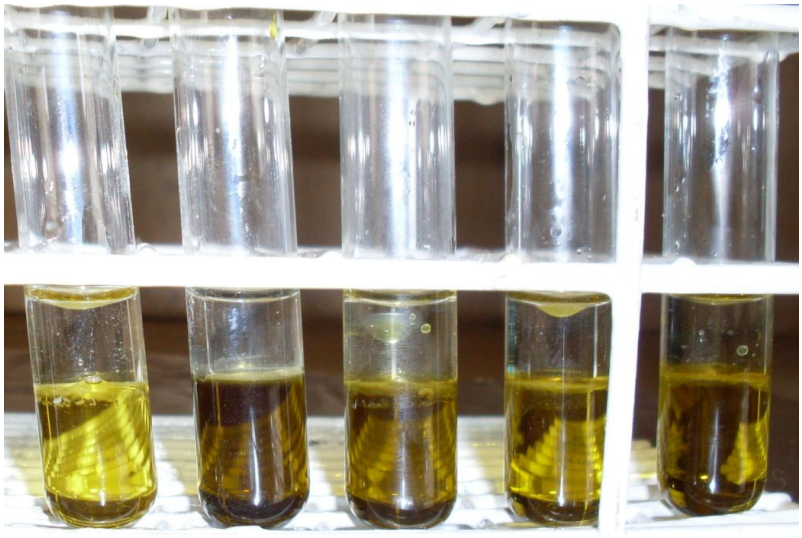

Figura 10: Ausência de um anel vermelho na parte superior, indicando resultado negativo para naftoquinona. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.8 Determinação do teor de flavonoides através de análise espectrofotométrica

A concentração de flavonoides foi determinada através da quantificação espectrofotométrica, segundo metodologia proposta por Costa (1982) e Rusak et al (1993) com algumas adequações.

3.8.1 Curva padrão para flavonoides

Foi dissolvido 25 mg de rutina em metanol, completou-se o volume para 50 mL, obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL. Desta solução foram retiradas 4 alíquotas de 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL e colocadas em balões volumétricos de 25 mL. Cada um destes volumes foi completado para 2 mL com metanol e em seguida foram acrescentados em cada balão volumétrico 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL da solução de piridina e água (20:80), 2,5 mL de solução a 6,5% cloreto de alumínio em metanol, completou-se o volume para 25 mL com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se como solução branco todos os reagentes anteriores (exceto rutina

e o cloreto de alumínio) para zerar o aparelho. As análises foram feitas em triplicatas.

3.8.2 Quantificação de flavonoides nos extratos EBE e Hexano/Diclorometano

Pesou-se 50 mg do extrato que na sequência foi diluído em 15 mL de etanol e completou o volume para 50mL com metanol. Desta solução (Figura 11) foi retirada uma alíquota de 250 µl, verteu-se em um balão de 25 mL e completou seu volume para 2 mL com metanol, em seguida foram acrescentados: 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL da solução de piridina e água (20:80), 2,5 mL de solução a 6,5% cloreto de alumínio em metanol, completou-se o volume para 25 mL com água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se como solução branco todos os reagentes anteriores (exceto rutina e o cloreto de alumínio) para zerar o aparelho. O procedimento acima descrito foi realizado utilizando-se os extratos etanólico e hexano/ diclorometano de cada tratamento (controle, pH 4, 0,33 mM, 2,66 mM e 5,32 mM de Al).

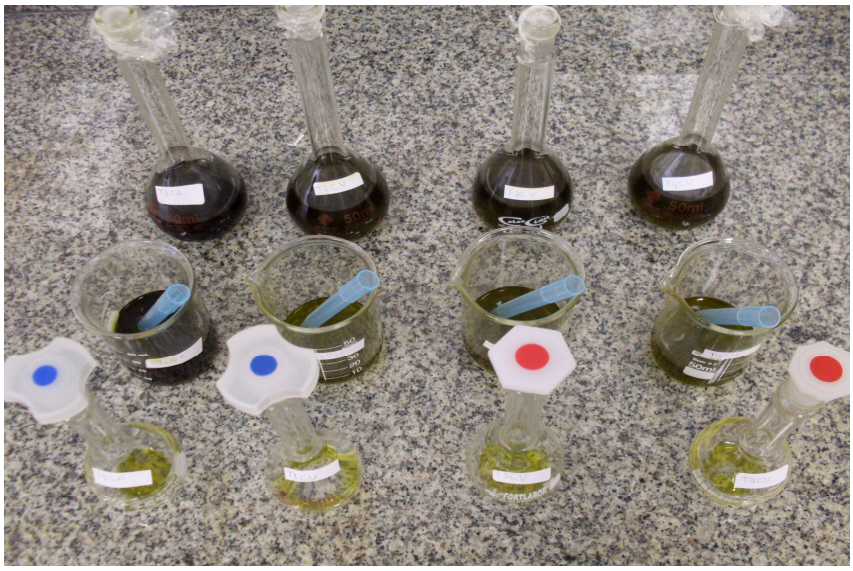

Figura 11: Etapas da quantificação de flavonoides utilizando o extrato hexano/diclorometano. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.9 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram submetidos a testes de normalidade. Para os dados com distribuição normal foram aplicados testes paramétricos (análise de variância, ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011). Para os dados com distribuição anormal foram aplicados testes não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Massa fresca e seca das folhas, caules e raízes

Os resultados da massa fresca- MF (Tabela 2) e massa seca - MS (Tabela 3) das folhas, caules e raízes não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os controles e as concentrações de Al testadas. Porém quando observado as médias da MF e MS de folhas, caule e raízes do tratamento de 5,32 mM, estas apresentaram menores valores. A MF e MS totais também apresentaram menores valores para o tratamento com a maior concentração de Al. Macedo et al. (2011), estudando *Jatropha curcas* L. cultivado em solução nutritiva observaram um decréscimo da massa fresca da raiz com o aumento das concentrações de Al, afetando o crescimento das raízes.

Tabela 2 Efeito das concentrações de alumínio na produção de massa fresca das folhas, caule, raiz, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)].

Alumínio mM de $AlCl_3$	pH	Folhas	Caule	Raízes	Total
		---------- g/ planta ----------			
0	5,5 a 6,5	23,80	29,11	39,45	92,37
0	4,0 a 4,3	25,50	31,72	38,50	95,74
0,33	4,0 a 4,3	27,60	32,67	33,71	93,99
2,66	4,0 a 4,3	27,14	31,87	36,93	95,95
5,32	4,0 a 4,3	22,91	26,55	27,26	76,73

[(1)] Os dados são médias de seis espécimes por tratamento; não houve diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade entre as concentrações de alumínio testadas.

Cruz et al. (2008), trabalhando com plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, verificaram uma redução nos valores de massa seca das folhas e raízes com aumento das concentrações de Al na solução nutritiva. Diferenças significativas foram observadas na massa seca das folhas e raízes no tratamento controle e de 50 µM de Al, porém nos tratamentos de 100 e 150 µM estas diferenças não foram significativas entre si. Também foi observado um decréscimo significativo na produção de massa seca total, diretamente proporcional ao aumento da concentração de Al na solução.

Tabela 3 Efeito das concentrações de alumínio na produção de massa seca das folhas, caule, raiz, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)].

Alumínio mM de $AlCl_3$	pH	Folhas	Caule	Raízes	Total
		---------- g/ planta ----------			
0	5,5 a 6,5	4,60	6,64	4,49	15,73
0	4,0 a 4,3	4,60	7,49	4,01	16,10
0,33	4,0 a 4,3	5,21	7,26	3,47	15,94
2,66	4,0 a 4,3	5,25	7,28	3,83	16,36
5,32	4,0 a 4,3	4,08	5,62	2,96	12,66

[(1)] Os dados são médias de seis espécimes por tratamento; não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade entre as concentrações de alumínio testadas.

4.2 Comprimento do caule e área foliar

Na Tabela 4 estão apresentados os valores do comprimento do caule (CC) e a área foliar (AF). Os resultados se comportam de maneira similar, estatisticamente os valores do CC e a AF não diferem entre os tratamentos, porém verifica-se que na maior concentração de Al, o comprimento do caule e a área foliar apresentam as menores médias. Em estudos realizados por Salvador et al. (2000) com mudas *Psidium guajava* L., observaram que concentrações relativamente baixas de Al promoveram resposta positiva de crescimento, contudo doses de 20 e 25 mg L^{-1} de Al diminuíram significativamente a altura da planta, o comprimento e a largura da folha, a área foliar e o diâmetro do caule.

Tabela 4 Efeito das concentrações de alumínio no comprimento do caule e na área foliar, da cultivar FB 100 em solução nutritiva contendo alumínio [(1)].

Alumínio mM de $AlCl_3$	pH	Comprimento do caule (mm)	Área foliar (mm)
0	5,5 a 6,5	1133,00	1008,37
0	4,0 a 4,3	1121,16	993,68
0,33	4,0 a 4,3	1200,00	1191,79
2,66	4,0 a 4,3	1248,66	1120,56
5,32	4,0 a 4,3	1036,66	947,01

[(1)] Os dados são médias de seis espécimes por tratamento; não houve diferença significativa a 5% de probabilidade entre as concentrações de alumínio testadas.

Os primeiros efeitos do Al observados nas plantas são a redução do crescimento radicular e o aumento da espessura das raízes, sendo que a redução do crescimento da parte aérea pode ocorrer posteriormente (Vasconcelos et al., 2002; Nolla et al., 2007; Crestani et al., 2009).

4.3 Análise de alumínio nas folhas e raízes

Na Tabela 5 pode-se verificar que os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si e quando comparados aos controles, em relação à quantidade de Al encontrado nas raízes, contudo os tratamentos controle não diferiram entre si. A quantidade de Al nas folhas (Tabela 5) foi menor que os valores observados para raiz. Contudo estes valores são inferiores aos encontrados por Braccini et al.(1998) em estudo realizado com 9 genótipos de café cultivadas em solução nutritiva com 0 e 0,296 mmol L^{-1} de alumínio, as concentrações médias de Al encontrado nas raízes e folhas superiores foram respectivamente 73,04 mg Kg^{-1}, 4648,01 mg Kg^{-1}, 46,98 mg Kg^{-1} e 75,01 mg Kg^{-1} .

A concentração de 5,32 mM de $AlCl_3$ na solução nutritiva resultou no maior acúmulo de Al nas raízes deste tratamento, porém o mesmo não foi observado no tecido foliar. Provavelmente existe algum mecanismo que impede a translocação do Al para as folhas.

Tabela 5 Quantidade de Al presente nas folhas e raízes[(1)] da cultivar FB 100 cultivadas em solução nutritiva contendo alumínio

Tratamentos (mM de $AlCl_3$)	**pH**	**Quantidade de Al nas folhas (mg Kg^{-1})**	**Quantidade de Al nas raízes (mg Kg^{-1})**
0	5,5 a 6,5	20,56	47,80 b
0	4,0 a 4,3	17,68	44,07 b
0,33	4,0 a 4,3	16,06	31,75 c
2,66	4,0 a 4,3	20,74	30,63 d
5,32	4,0 a 4,3	17,68	71,80 a

Fonte: Laboratório FULLIN
Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%, pelo teste t.
[(1)] Os dados são médias de três espécimes por tratamento.

4.4 Análise química das plantas

Os teores adequados para nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S em (g Kg^{-1}) e Fe, Mn, B, Cu e Zn em (mg kg^{-1}) para *Passiflora edulis*, segundo Costa et al. (2008), estão representados na (Tabela 6). O teor de N para o tratamento 0,33 mM de Al e os teores de cálcio nos 5 tratamentos foram inadequados considerando as concentrações sugeridas por Costa et al. (2008), porém quando considerados os valores referência da própria análise química das plantas, as concentrações apresentaram adequadas.

O fósforo e o magnésio analisados apresentaram teores elevados em relação aos valores referência da análise bem como os sugeridos por Costa et al. (2008), já para o cobre e o zinco foram verificados valores abaixo da faixa adequada. Contudo as plantas ao término do experimento não apresentavam aspectos macroscópicos de deficiência ou toxidez nutricional.

Tabela 6 Teores de nutrientes para *Passiflora edulis* modificado de Costa et al. (2008)

Nutrientes	Teores
Nitrogênio (g kg^{-1})	47,5 - 52,5
Fósforo (g kg^{-1})	2,5 - 3,5
Potássio (g kg^{-1})	20,0 - 25,0
Cálcio (g kg^{-1})	5,0 - 15,0
Magnésio (g kg^{-1})	2,5 - 3,5
Enxofre (g kg^{-1})	2,0 - 4,0
Boro (mg kg^{-1})	25 – 100
Cobre (mg kg^{-1})	5 – 20
Ferro (mg kg^{-1})	100 – 200
Manganês (mg kg^{-1})	50 – 200
Zinco (mg kg^{-1})	45 – 80

Fonte: Costa et al. (2008)

4.5 Prospecção fitoquímica

Os resultados da prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico (EBE) das folhas de *Passiflora edulis* (Tabela 7) indicaram a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides para todos os tratamentos, não sendo detectada a presença de saponina

apenas nos tratamentos controle pH e no tratamento 5,32 mM de Al. A cumarina apenas não foi observada no tratamento controle pH, enquanto o heterosídeo antracênico foi observado apenas no tratamento controle pH.

Simões et al. (2000), relataram para *Passiflora* spp. a presença de ácidos fenólicos, cumarinas, fitosteróis e heterosídeos cianogênicos, alcalóides, harmol, harmina (derivados) e flavonoides. Em estudo fitoquímico, realizado em raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa* Zucolotto et al. (2006), identificou esteroides e o triterpeno (3β, 16β-diacetoxiurs-12-eno) sendo a primeira vez relatado para as espécies do gênero *Passiflora.*

De acordo com Gosmann et al. (2011), as saponinas são componentes presentes em especialmente *P. alata* e *P. edulis* , contudo esta substância não foi observada em estudo realizado por Martins et al. (2010), com extrato de arilo, provenientes de sementes de *P.edulis*.

Das substâncias analisadas (Tabela 7) apenas o tratamento pH e o tratamento 5,32 mM de Al apresentaram diferenças para os grupos: saponina, cumarina e heterosídeo antracênico, sabe-se que os metabólitos secundários podem ser influenciados pelo meio, principalmente em situações de falta ou excesso de algum fator de produção (Ferro, 2006).

Tabela 7 Análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Passiflora. edulis* cultivar FB100 tratadas com solução nutritiva de Hoagland

	Tratamentos				
Classe de Metabólito Secundário	0 mM de Al	0 mM de Al pH 4	0,33 mM de Al	2,66 mM de Al	5,32 mM de Al
Tanino	-	-	-	-	-
Cumarina	+	-	+	+	+
Saponina	+	-	+	+	-
Alcalóide	+	+	+	+	+
Esteroide/Triterpeno	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Flavonoide	+	+	+	+	+
Heterosídeo antracênico	-	+	-	-	-
Naftoquinona	-	-	-	-	-

4.6 Quantificação de flavonoides

Os valores de absorbância das amostras do extrato EBE e hexano/diclorometano foram comparados com a curva de calibração de rutina 0,5 mg/mL (Figura 12).

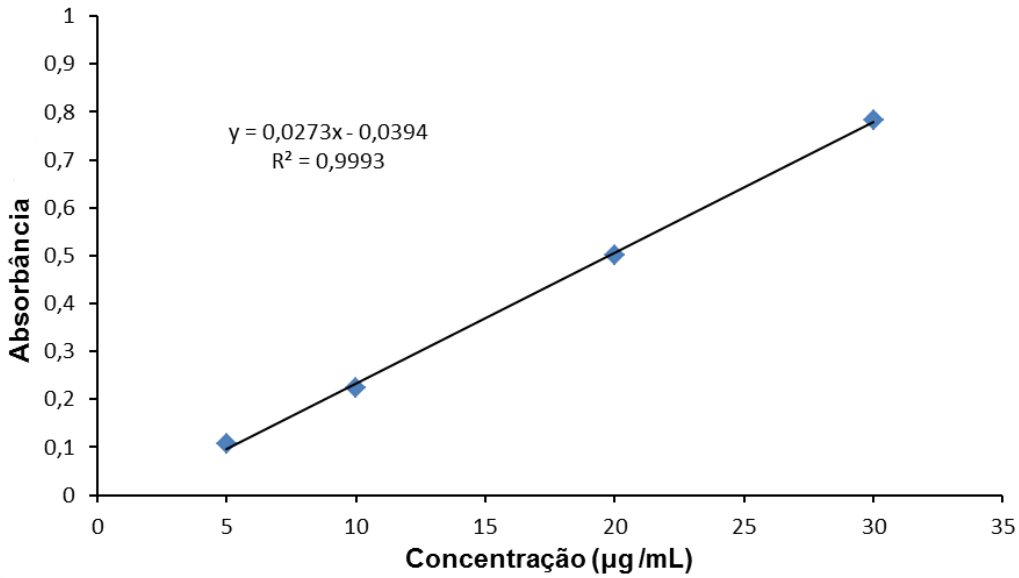

Figura 12: Curva padrão construída com rutina (0,5 mg/mL) a 420 nm, onde a equação de correlação e o coeficiente de determinação obtidos foram y = 0,0273x - 0,0394 e R^2 = 0,9993.

Analisando a Tabela 8 é possível verificar que as concentrações de flavonoides dos tratamentos com Al do EBE de *Passiflora edulis*, apresentaram reduções em relação aos controles. O controle 0 mM de Al apresentou 4,95 µg/mL de flavonoides enquanto no controle 0 mM de Al (pH 4) foi observado um valor de 3,16 µg/mL, uma redução de 1,79 µg/mL. No tratamento de 0,33 mM de Al observou-se a menor concentração com 2,07 µg/mL de flavonoides, porém os tratamentos 2,66 e 5,32 mM de Al apresentaram uma diferença menor que 0,3 µg/mL em relação a esse tratamento.

Bortolo et al. (2009), sugerem que condições de diminuição da disponibilidade de recursos pode promover o redirecionamento do carbono fixado da produção de metabólitos primários para a produção de metabólitos secundários como os flavonoides e outros compostos fenólicos. Entretanto os resultados encontrados neste trabalho demostraram relação inversa, pois quando as plantas foram submetidas a altas concentrações de Al houve menor produção de flavonoides.

Estudos realizados com *P. venusta* em mata e cerrado, com concentração de Al maior na mata, não apresentaram diferenças significativas nos teores de fenóis e flavonoides totais entre os indivíduos de mata e cerrado (Santos & Blatt, 1998).

As concentrações de flavonoides verificadas para extrato hexano/ diclorometano (Tabela 8) sugerem que este tipo de solvente pode ser mais eficiente na extração desse metabólito, uma vez que as concentrações encontradas neste extrato foram maiores que a do EBE. No extrato hexano/diclorometano a maior concentração de flavonoides, foi observada no tratamento 0,33 mM de Al, seguido pelos tratamentos 2,66 e 5,32 mM de Al.

Esta diferença na concentração de flavonoides observadas nos dois extratos, podem estar relacionada ao tipo de solvente utilizado na extração desse metabólito, estes resultados corroboram com os encontrados por Peixoto Sobrinho et al. (2010), que avaliou os teores de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* obtidos por diferentes sistemas extrativos sendo as extrações com acetona 80%, etanol 80% e metanol p.a. os mais eficientes.

Tabela 8 Concentração de flavonoides nos EBE e extratos hexano/diclorometano

Tratamentos mM de Al	Concentração de flavonoides (µg/mL)	Concentração percentual de flavonoides
Extrato etanólico		
0	4,95	49,5%
0(pH)	3,16	31,6%
0,33	2,07	20,75%
2,66	2,26	22,64%
5,32	2,31	23,11%
Extrato hexano/diclorometano		
0	12,85	64,2%
0(pH)	7,14	35,7%
0,33	17,41	87,0%
2,66	12,09	60,4%
5,32	8,12	40,6%

5 CONCLUSÃO

Para os parâmetros morfológicos (massa fresca e seca, de folhas, caule e raízes, comprimento do caule e a área foliar) não foram observadas interferências estatisticamente significativas do Al. Entretanto para a maior concentração de Al (5,32mM), constatou-se reduções em todos os parâmetros acima avaliados. O efeito secundário observado na parte aérea pode ser devido aos danos ocasionados nas raízes, visto que o Al acumulou-se preferencialmente neste órgão e a maior concentração dele nas raízes foi verificada para o tratamento de 5,32mM de $AlCl_3$.

Em relação à análise nutricional detectou-se, para alguns nutrientes, diferença nos valores estipulados como adequados para esta cultivar, porém estas variações não parecem estar relacionadas com o Al, visto que estas também foram verificadas nos dois controles. Constatou-se também na prospecção fitoquímica que os grupos tratados, controle (sem Al) e o controle pH apresentaram os mesmos grupos metabólitos para alcaloides, flavonoides e esteroides.

Contudo observou-se para o tratamento de 0,33mM de Al aumento na concentração de flavonoides do extrato hexano/diclorometano e reduções nos tratamentos com Al para o extrato etanólico, porém estas diferenças na concentração dos dois extratos podem ser justificadas pelo fato do solvente hexano /diclorometano ser mais seletivo na extração de flavonoides.

Em suma o Al não promoveu alterações morfológicas significativas no maracujazeiro cv. FB 100 cultivadas em solução nutritiva, porém apresentou alterações nos teores de flavonoides.

CAPÍTULO II

Relação entre a ação mutagênica e concentração de flavonoides totais de plantas de *Passiflora edulis sims* f. *flavicarpa* deg Cv. FB 200 "YELLOW MASTER" coletadas em campos com diferentes concentrações de alumínio

1 APRESENTAÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas cada vez mais não só no Brasil, como também em outros países (SARTI, 2006). O seu fácil acesso em feiras livres, mercados populares e o próprio cultivo em quintais (MACIEL et al., 2002) e baixo custo pode ser a razão desta utilização principalmente nas regiões mais pobre do país. Entretanto muitas vezes a população utiliza desse recurso natural de forma indiscriminada, acreditando que por ser um produto natural não possam ocorrer efeitos colaterais. Esse pensamento é equivocado, pois muitas plantas possuem reações alérgicas ou tóxicas. Junior et al. (2005) relatam que um dos efeitos colaterais mais observados pelo uso de plantas medicinais é a hipersensibilidade variando de uma dermatite até um choque anafilático. Por isso é importante a realização de estudos que identifiquem os componentes dessas plantas e seus possíveis efeitos toxicológicos, mutagênicos, para que a população possa utilizá-los com segurança.

Passiflora edulis, também conhecida popularmente por maracujá azedo é bem utilizada pela população por sua ação terapêutica sedativa, ansiolítica e anti-inflamatória (MONTANHER et al., 2007; BENINCA et al., 2007; DENG et al., 2010; LI et al., 2011). As propriedades terapêuticas das plantas estão relacionadas com os seus princípios ativos que, na maioria das vezes, são produtos do metabolismo secundário (FERRO, 2006). Os grupos de metabólitos podem sofrer variações na sua síntese devido a condições ambientais adversas como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes (GOBBO-NETO & LOPES, 2007) aos quais estão expostas.

Estudos realizados com *P.edulis* apontam os flavonoides como responsáveis pela ação terapêutica desta espécie (BENINCA et al., 2007; DENG et al., 2010). Existem trabalhos que relatam a ação dos flavonoides como anti-inflamatórios, antioxidantes, diuréticos e\\ ansiolíticos (FERRO, 2006; COLETA et al.,2008), sendo que algumas dessas ações são compatíveis com a indicação popular para o uso das folhas de maracujá. Porém na literatura a poucos relatos de estudos toxicológicos e mutagênicos para *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg. Um fato que deve ser considerado é a variação dentro da espécie, uma vez que cultivares diferentes

podem apresentar composição química diferente, portanto em estudos toxicológicos e mutagênicos deve se preocupar em especificar a cultivar ou variedades estudadas.

Existem vários testes para avaliar a atividade mutagênica como, ensaios de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* ou teste de Ames, sistema teste de *Allium cepa* e teste do micronúcleo em células humanas *in vitro* (RIBEIRO et al., 2003; VARANDA, 2006; BAGATINI et al., 2007; PERON et al., 2008; FACHINETTO & TEDESCO, 2009) contudo, o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é tido como um eficiente teste pelas agências internacionais e instituições governamentais para as avaliações de genotoxicidade.

O teste do micronúcleo em roedores *in vivo* detecta agentes clastogênicos e aneugênicos (RIBEIRO et al. 2003) que pode ocorrer quando substâncias danificam o material genético pela quebra de cromossomos ou pela segregação cromossômica anormal. Este evento ocorre durante mitose e os fragmentos cromossômicos originados são envolvidos por uma membrana nuclear e um pequeno núcleo (micro) se formará (Figura13). A quantificação desse micronúcleo poderá ser avaliada através da análise dos eritrócitos policromáticos (EPC). Como o tempo de vida dessas células é relativamente curto, o surgimento de micronúcleos deve ser resultante de danos cromossômicos recentes.

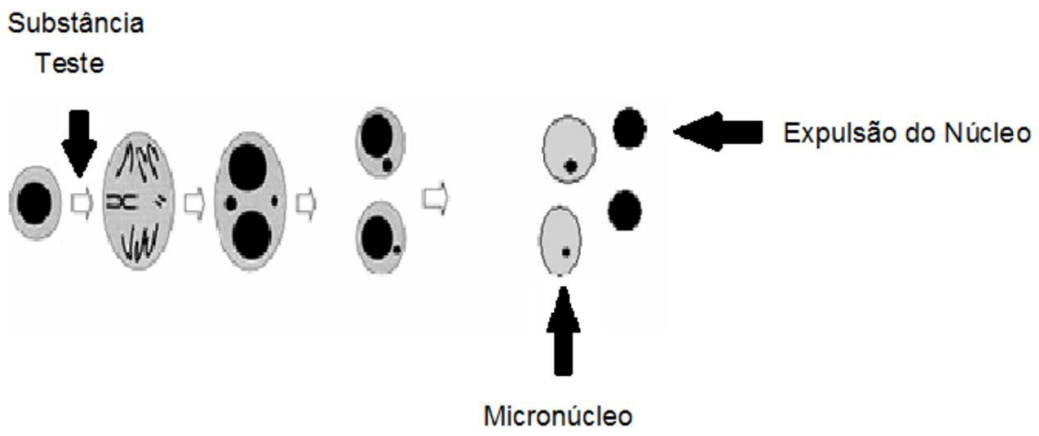

Figura 13: Divisão mitótica da linhagem eritrocitária com formação de micronúcleo, induzida pela substância teste. Após a expulsão do núcleo principal observa-se a permanência do micronúcleo no citoplasma das células filhas (Modificado de Almeida, 2008).

O aumento da frequência de micronúcleos (MNs) indica a genotoxicidade da substância testada e a verificação da citotoxicidade é observada pela relação de células policromáticas e normocromáticas (ENC) EPC/EPC+ENC (ALMEIDA, 2008).

Portanto o objetivo desse trabalho compreendeu, em relacionar a concentração de flavonoides nos extratos de folhas das plantas coletadas nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* cv. FB200 expostas a diferentes concentrações de Al com o seu potencial mutagênico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre a ação mutagênica e a concentração de flavonoides produzidos por plantas de *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg cv. FB200 “Yellow Master” quando cultivadas em solos com diferentes concentrações de alumínio.

2.2 Objetivos específicos

- Mensurar o alumínio e os nutrientes presentes no solo das plantações de maracujazeiro da cultivar FB 200;

- Verificar a presença de alumínio e de nutrientes nas folhas da cultivar FB 200;

- Realizar prospecção fitoquímica das folhas da cultivar FB 200 submetidas a solos com diferentes concentrações de Al;

- Determinar a concentração de flavonoides totais presentes no extrato hexano/diclorometano das folhas;

- Avaliar o potencial mutagênico dos extratos hexano/diclorometano das folhas de *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg cv. FB200, em três concentrações dos extratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da área de cultivo

Os espécimes da cultivar FB 200 utilizados neste estudo foram provenientes de cultivos de 3 fazendas localizadas no munícipio de Jaguaré-ES (Figura 14 A). As áreas foram plotadas através do sistema de coordenadas Unidade Transistor de Mercator UTM (WGS84), onde duas plantações de maracujá se localizam a X: 0390038 Y: 7903486 e a 52 m do nível do mar e a terceira plantação a X: 0387968 Y: 7901355 a 2m do nível do mar.

3.2 Escolha da área de coleta

A escolha da área trabalhada foi definida com visita as fazendas de cultivo do maracujazeiro cv. FB 200 (Figura 14 A)., onde foram realizadas observações visuais e coleta do solo para análise (Figura 14 B). Posteriormente as áreas foram definidas com base nas concentrações de alumínio disponível (Anexo 2), sendo:

-Campo 1: 0,0 mM de alumínio e pH 6

-Campo 2: 0,33 mM de alumínio e pH 5,6

-Campo 3: 2,6 mM de alumínio e pH 4,7

Figura 14: Vista parcial da área de cultivo Campo 2. (A) local onde foram coletadas folhas da cv. FB200 para prospecção fitoquímica, quantificação de flavonoides e mutagênese; (B) detalhe da coleta do solo das áreas estudadas para posterior análise laboratorial da concentração de alumínio (Fonte: arquivo fotográfico do autor).

O procedimento de coleta das folhas ocorreu manualmente por processo de catação durante o período da manhã. Posteriormente cada conjunto de folhas coletadas de cada espécime foi acondicionado em sacos de papéis individuais e devidamente identificados e, em seguida, submetidas à secagem em estufa aberta a 40 ºC.

3.2.1 Delineamento experimental

Na primeira parte do trabalho foi realizada a prospecção fitoquímica utilizando o extrato bruto etanólico (EBE) das folhas de *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg cv. FB200, cultivadas em solos contendo diferentes concentrações de Al (Figura 15 A). Posteriormente foi realizada a quantificação dos flavonoides utilizando o extrato hexano/diclorometano (HEX/D) das folhas da cultivar FB 200 provenientes de solos com alumínio presente em diferentes concentrações (Figura 15 B).

Campo 1: 0,0 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → EBE → Prospecção Fitoquímica **A**

Campo 2: 0,33 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → EBE → Prospecção Fitoquímica

Campo 3: 2,66 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → EBE → Prospecção Fitoquímica

---

B

Campo 1: 0,0 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → Extrato Hex/D → Quantificação de flavonóides

Campo 2: 0,33 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → Extrato Hex/D → Quantificação de flavonóides

Campo 3: 2,66 mM de Al → Folhas da cv.FB 200 → Extrato Hex/D → Quantificação de flavonóides

Figura 15: Esquema da 1ª parte do trabalho realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Departamento de Farmácia da UFES onde **A** representa a prospecção fitoquímica e **B** a quantificação de flavonoides.

A segunda parte do trabalho compreendeu a avaliação do potencial mutagênico do extrato das folhas de *Passiflora edulis* variedade FB 200 cultivadas em solos com variações em suas concentrações de Al. Para avaliar o potencial mutagênico destes extratos foi realizado o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores (*Mus musculus*) *in vivo*, tratados com extratos HEX/D preparados a partir das folhas da cv. FB 200. Selecionaram-se três concentrações do extrato (100, 250 e 500 mg) para a

realização do teste, sendo que para cada concentração, seis animais foram utilizados e duas lâminas por animal foram preparadas (Figura 16).

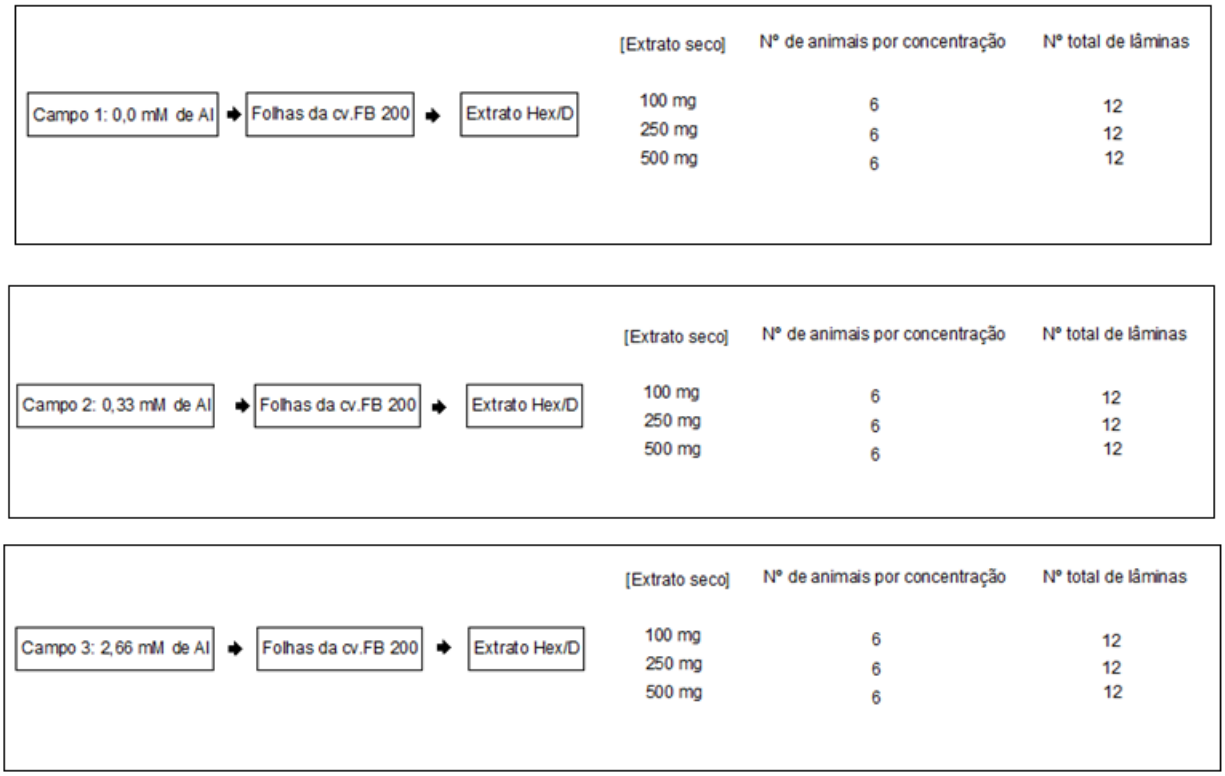

Figura 16: Esboço da 2ª parte do trabalho, realizado no Laboratório de genética vegetal e toxicológica- UFES.

3.3 Obtenção dos extratos

As folhas secas foram trituradas em um aparelho elétrico caseiro até a obtenção de um pó. Com este material foram produzidos dois tipos de extratos: o EBE e o HEX/D. O procedimento foi realizado no laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica do Departamento de Ciências Biológicas da UFES. Para facilitar a compreensão do trabalho os extratos das folhas da cultivar FB 200 exposta a 0; 0,33 e 2,66 mM de Al no solo foram designadas respectivamente de T1; T2 e T3.

3.3.1 Extrato Bruto Etanólico (EBE)

O pó das folhas de cada tratamento foi submetido à extração pelo solvente etanol P.A por 72 horas, depois foi filtrado utilizando-se papel filtro e o material obtido foi

levado à estufa para a completa secagem (Figura 17). Após este procedimento os extratos foram armazenados na geladeira até a realização dos experimentos.

Figura 17: Procedimento de secagem dos extratos em estufa. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.3.2 Extrato Hexano/Diclorometano (HEX/D)

O pó das folhas dos tratamentos (T1, T2 e T3) foi submetido à solvente extrativo 1:1 (V: V) de HEX/D por 72 horas, a temperatura ambiente e protegida da luz (Figura 18). Posteriormente a solução extrativa foi filtrada e seca em um evaporador rotativo e armazenado em geladeira até a realização dos experimentos.

Figura 18: Acondicionamento dos extratos devidamente identificados e armazenados sob a proteção de luz por 72 horas. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.4 Determinação da massa seca

A determinação da massa seca foi realizada através do aquecimento de 100 mg de extrato HEX/D em uma placa aquecedora até a completa evaporação da água ainda presente. Durante o processo de aquecimento o extrato foi submetido a pesagens até que o valor da massa não se alterasse por três vezes consecutivas. Em 100 mg de extrato fresco foram obtidos os seguintes valores:

- 34,1 mg de massa seca do extrato T1;
- 34 mg de massa seca do extrato T2;
- 37,9 mg de massa seca do extrato T3;

As concentrações dos extratos (100, 250, 500 mg) utilizadas para o teste do micronúcleo foram baseadas na massa seca.

3.5 Análise química das folhas da cultivar FB 200

As análises nutricional e de alumínio das folhas da cv.FB200 dos três tratamento, foram realizadas pelo Laboratório de Análise Agronômica e Consultoria LTDA-FULLIN na cidade de Linhares – ES. Os resultados encontram-se dispostos no Anexo 3.

3.6 Prospecção fitoquímica

Com a finalidade de identificar grupos de metabólitos secundários (alcalóides, flavonoides, saponina, triterpenos, esteróides, taninos, cumarina, heterosídeo Antracênico e naftoquinona) foram realizados testes qualitativos a partir do EBE de cada tratamento, segundo metodologia proposta por Costa (1982). Esta metodologia foi a mesma aplicada para a prospecção fitoquímica de *Passiflora edulis* (FB100) submetidas a diferentes concentrações de Al em solução nutritiva e encontra-se detalhadamente descrita no capítulo 1.

3.7 Quantificação espectrométrica de flavonoides

A partir dos extratos de HEX/D das folhas da cultivar FB200 foi determinada a concentração de flavonoides através da quantificação espectrométrica, segundo metodologia proposta por Costa (1982) e Rusak et al (1993) com algumas modificações. Esta metodologia encontra-se detalhadamente descrita no capítulo 1.

3.8 Teste do micronúcleo

3.8.1 Animais

Para a realização do teste do micronúcleo utilizou-se camundongos (*Mus musculus*) machos de 6 a 8 semanas de vida criados no biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES, após apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob o protocolo nº 076/2011. Os animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum* e temperatura controlada no biotério.

3.8.2 Tratamento dos animais

O experimento para análise da mutagenicidade foi realizado segundo metodologia proposta por Ribeiro et al. (2003). Para cada tratamento (T1; T2 e T3) foram determinadas três concentrações do extrato (100; 250 e 500 mg) e na realização dos teste utilizaram-se 6 animais para cada concentração. Os animais foram identificados, separados por grupos de tratamento ao acaso e pesados (Figura 19A) para determinação da dose (0,1 mL solução para cada 10 gramas peso corporal) a ser administrada por gavage. Após 24 horas do tratamento foram eutanasiados por deslocamento cervical e coletou-se a medula óssea para posterior análise de eritrócito policromático micronucleado.

Grupos de animais controle positivo (ciclofosfamida 50 mg kg^{-1}), negativo (solução de cloreto de sódio 0,9%) e do solvente (dimetilsulfoxido- DMSO) foram incluídos para os testes juntamente com os grupos tratados. No controle positivo (ciclofosfamida 50 mg kg^{-1}) foram utilizados seis camundongos previamente identificados, pesados para determinação da dose a ser aplicada, por via intraperitoneal. O mesmo número de animais foi-utilizado tanto no controle negativo (solução de cloreto de sódio 0,9%) e como no controle solvente (dimetilsulfoxido-DMSO), sendo as administrações das substâncias realizadas via gavage. O tempo de exposição, a substância e o método de eutanásia para todos os controles foram os mesmos usados para grupos tratados.

3.8.3 Etapas para a realização do teste do micronúcleo

Para cada concentração pré-determinada dos extratos (100, 250 e 500mg), pesou-se o extrato úmido e que em seguida foi diluído em 10 mL de DMSO. A preparação destas soluções (Figura 19B) foi realizada minutos antes de tratar os animais sendo administradas via gavage (Figura 19C). Após as 24 horas do tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures foram retirados (Figura 19D). Uma seringa contendo soro fetal foi injetada no fêmur para extração da medula óssea (Figura 19E) que foi depositada em tubo de ensaio e em seguida o material foi ressuspendido no soro bovino por várias vezes, com auxílio de uma pipeta de Pauster, obtendo-se uma solução homogênea. Esta foi centrifugada por 5 minutos, a 1000 rpm (Figura 19F) sendo o sobrenadante descartado e o sedimento (Figura 19G) novamente ressuspendido em 0,5 mL de soro bovino. Utilizaram-se duas gotas dessa suspensão (Figura 20A) para a preparação de cada lâmina pelo método do esfregaço (Figura 20B), que foram então secas ao ar (Figura 20C) e após 24 horas fixadas em metanol (CH_3OH) por 10 minutos.

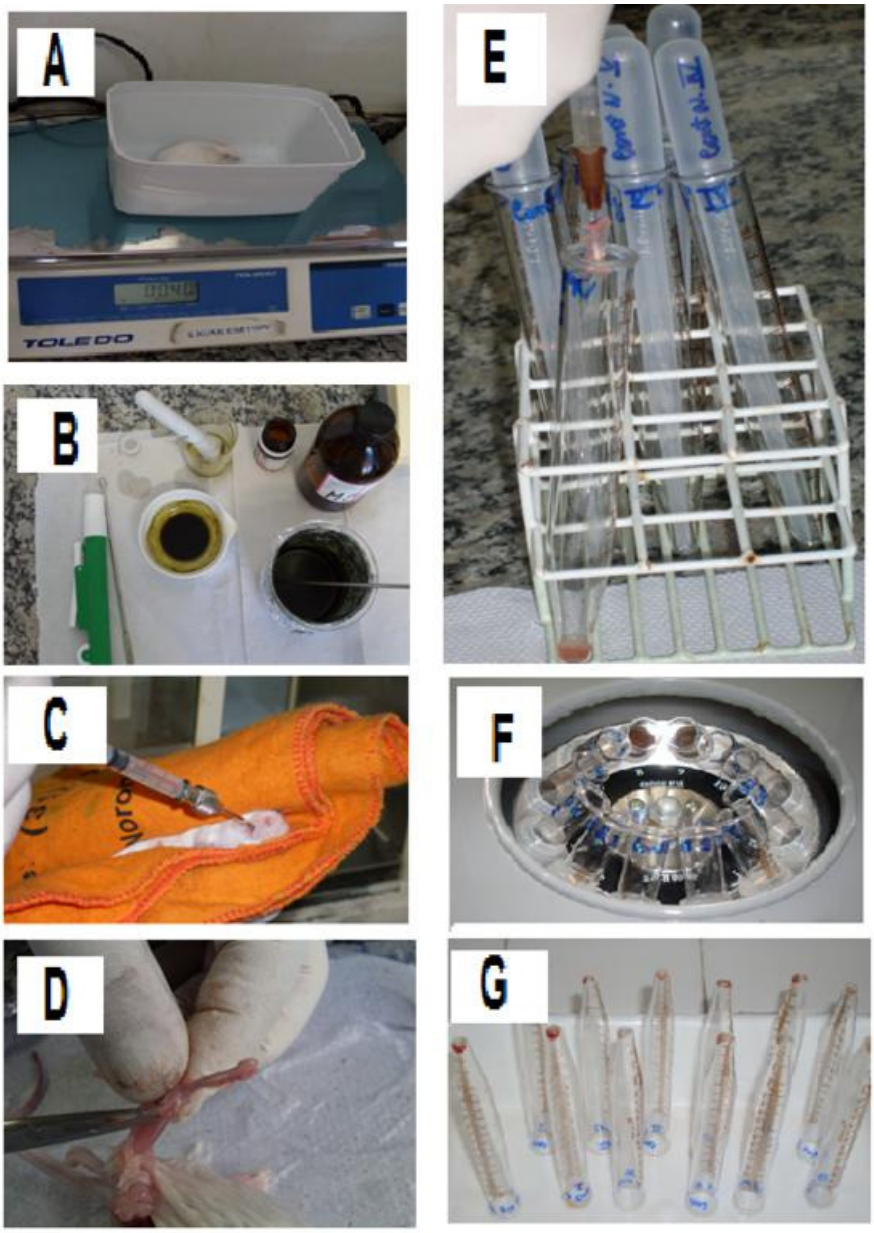

Figura 19: Sequência das etapas de tratamento e retirada de material para análise de micronúcleo. (A) pesagem para estabelecimento da dose administrada; (B) preparo da substância teste; (C) administração por via oral (gavage); (D) extração do fêmur; (E) retirada da medula óssea com auxílio de seringa preenchida com soro fetal bovino; (F) centrifugação da suspenção; (G) porção da medula sedimentada no fundo do tubo de ensaio. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

As lâminas foram coradas com corante Leishman puro por 3 minutos e em seguida transferidas para cuba de coloração contendo solução (1:6) de corante e água por 12 minutos (Figura 20D). Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada por várias vezes e colocadas para secar. Os eritrócitos policromáticos (EPC)

apresentaram coloração roxeada e os eritrócitos normocromáticos (ENC) coloração rosada.

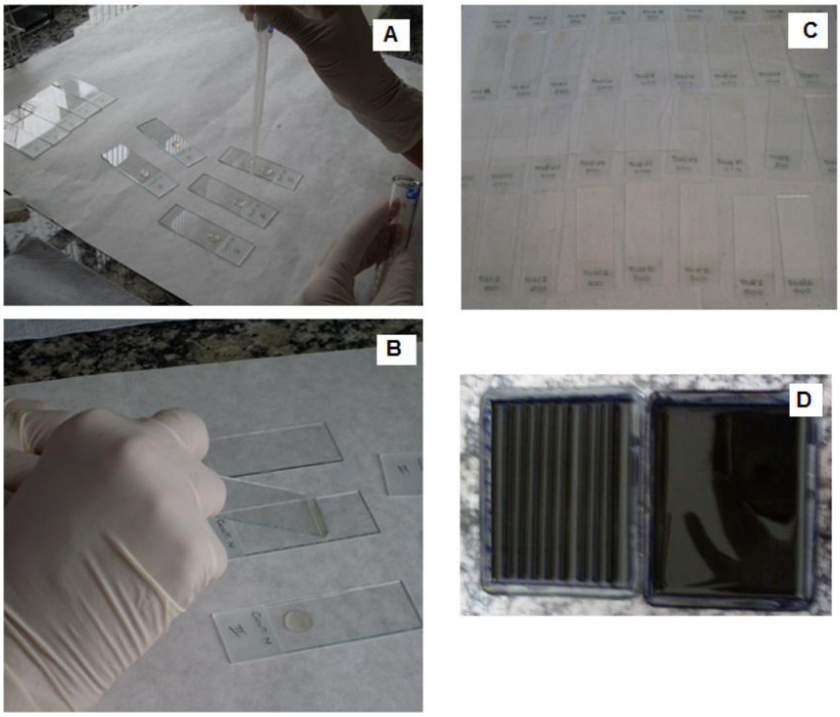

Figura 20: Preparação de lâminas para a análise de micronúcleos. (A) adição de 2 gotas de suspensão contendo as células da medula óssea; (B)aplicação do método do esfregaço; (C) etapa de secagem das lâminas ao ar; (D) lâminas na cuba de coloração contendo leishman (vista superior). (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.8.4 Análise das lâminas

As lâminas devidamente identificadas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon/Eclipse E 200) com aumento de 1000 vezes (objetiva) e a frequência de micronúcleos foi determinada pela análise de 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal (Figura 21). A citotoxicidade também foi avaliada considerando a relação de eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos pela razão EPC/EPC+ENC em 200 células contadas.

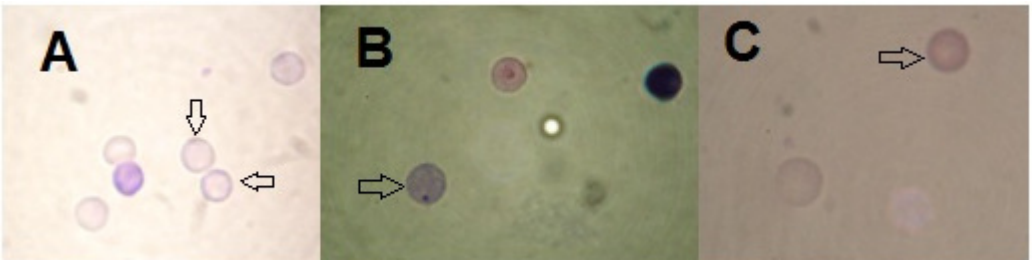

Figura 21: Fotos das análises das lâminas de células da medula óssea de camundongos. (A) setas indicam os eritrócitos policromáticos (EPC); (B) seta indicando micronúcleo em eritrócitos policromáticos; (C) seta indicando o eritrócito normocromático. (Fonte: arquivo fotográfico do autor)

3.8.5 Análise estatística

Para os dados paramétricos foram utilizados a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas usando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Já os dados não paramétricos foram submetidos a um tratamento estatístico utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ao nível de 1% de probabilidade. Foi utilizado o programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de nutrientes e de alumínio no solo

De acordo com a análise química dos solos (Tabela 9) foi verificado que os campos 1, 2 e 3 apresentaram respectivamente baixos valores para (K e Mg); (Ca, Mg e MO) e (K, Ca e Mg) e acidez média (5,1-6,0) a elevada(≤ 5) quando comparado com valores referência. Estes resultados corroboram os encontrados por Pires et al. (2003), onde observaram baixos teores de P, K, Ca, Zn e Cu e baixo pH ao avaliarem as principais unidades de solo no Espírito Santo. Candido et al. (2009) também verificaram na microrregião do caparaó (ES) solos com baixos teores de P, K, Ca, valores médios de Mg, acidez ativa elevada em 38% dos solos e 52% com acidez ativa média já os teores de Al^{+3} trocável foram observadas na faixa de baixo a médio.

Na análise química dos solos o campo 1 apresentou os melhores resultados em relação a quantidade de nutrientes verificados, o qual pode ser explicado por um valor de pH mais adequado para a absorção de nutrientes.

Tabela 9: Resultado da análise química dos solos coletados nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo.

Parâmetro analisado	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Valor referência (FULLIN) Classificação baixo
Fósforo-Mehlich mg/dm^3	11	35	10	< 10
Potássio mg/dm^3	30	68	37	< 60
Cálcio cmol$_c$/dm^3	2,3	1,4	1,0	< 1,5
Magnésio cmol$_c$/dm^3	0,5	0,3	0,2	< 0,6
Alumínio cmol$_c$/dm^3	0,0	0,1	0,8	< 0,4
H+Al cmol$_c$/dm^3	1,2	2,0	4,0	< 2,6
Matéria Orgânica (MO) dag/dm^3	1,6	1,5	2,1	< 1,6
pH em água	6,0	5,6	4,7	Acidez Elevada ≤ 5,0

Fonte: Laboratório FULLIN

O alumínio é um elemento que está relacionado com a acidez do solo, quando deslocado dos sítios de adsorção para a solução este hidrolisa produzindo íons H^+, logo o Al trocável gera acidez ativa que existia em potencial (NETO et al., 2001).

Essa relação foi observada nos solos com maior concentração de Al^{+3} trocável (campo 2 e 3) onde foi verificado a redução do pH (Tabela 9).

4.2 Análise nutricional e de alumínio das folhas da cultivar FB 200

Os resultados da análise foliar (Tabela 10) apresentaram variação em relação aos valores considerados adequados por Borges (2005). O campo 1 apresentou para o N, P, Ca e Cu valores de 2,97 $g.Kg^{-1}$,1,26 $g.Kg^{-1}$, 2 $g.Kg^{-1}$ e 28 $mg.Kg^{-1}$ acima do valor máximo considerado ótimo, já o K apresentou 1,1 $g.Kg^{-1}$ abaixo do valor mínimo. No campo 2 foram observados para o N, Ca e S respectivamente aumento de 3,6 $g.Kg^{-1}$, 2,63 $g.Kg^{-1}$ e 1,04 $g.Kg^{-1}$ do valor máximo estabelecido e redução de 9,22 $g.Kg^{-1}$ para o K em relação ao valor mínimo recomendado. Verificou-se no campo 3 reduções de 0,41 $g.Kg^{-1}$ e 5,47 $g.Kg^{-1}$ para P e K respectivamente considerando o valor mínimo da faixa adequada e valores de 7,23 $g.Kg^{-1}$ de Ca e 10 $mg.Kg^{-1}$ de Cu superiores aos ao valor máximo da faixa. Constatou-se que as demais concentrações de nutrientes dos campos apresentaram dentro das faixas consideradas adequadas por Borges (2005).

Tabela 10: Resultado da análise nutricional das folhas de plantas coletadas nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo.

Parâmetro analisado	**Campo 01**	**Campo 02**	**Campo 03**	**Faixas de teores ótimos Borges (2005)**
Nitrogênio $g.Kg^{-1}$	61,67	62,30	54,81	40,0 – 58,7
Fósforo-Mehlich $g.Kg^{-1}$	6,26	4,11	2,49	2,9 - 5,0
Potássio $g.Kg^{-1}$	25	16,88	20,63	26,1 - 45,0
Cálcio $g.Kg^{-1}$	22	22,63	27,23	5,5 - 20,0
Magnésio $g.Kg^{-1}$	3,56	3,62	4,50	2,9 – 5,6
Enxofre $g.Kg^{-1}$	4,96	6,24	5,11	3,0 – 5,2
Ferro mg Kg-1	150	172	150	76,2 – 200,0
Zinco $mg.Kg^{-1}$	52	44	38	25,0 – 80,0
Cobre $mg.Kg^{-1}$	48	14	30	3,9 – 20,0
Manganês $mg.Kg^{-1}$	326	223	94	84,5 – 600,0
Boro $mg.Kg^{-1}$	31	36	45	27,9 – 69,4

Fonte: Laboratório FULLIN

Variações nos teores dos nutrientes de mudas de *Lychnophora pinaster* também foram observados por Oliveira Junior et al. (2006) estudando o efeito da calagem e adubação no crescimento e acúmulo de nutrientes e alumínio na parte aérea desta espécie.

Nas análises de alumínio foliar foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os espécimes expostos a concentração de 0 e 0,1 $cmol_c/dm^3$ (ou 0,33mM) de Al e os espécimes expostos a 0,8 $cmol_c/dm^3$(ou 2,66mM) de Al (Tabela 11). A maior concentração de Al observada no campo 3 não resultou em maiores teores de Al nas folhas. Este efeito também foi observado por Veloso et al. (1995) em *Piper nigrum*, L., cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de Al, onde foram observados valores elevados de Al nas folhas nas doses de 5 e 10 mg L^{-1} e nas doses de 20 e 40 mg L^{-1} ocorreram reduções do Al foliar.

Tabela 11: Resultado da quantificação de Al nas folhas de plantas coletadas nos campos de cultivo de *Passiflora edulis* utilizadas neste estudo.

Tratamentos		pH	Quantidade de Al nas folhas ($mg.Kg^{-1}$)
Campo 1	0,0 mM de Al	6,0	47.613 a
Campo 2	0,33 mM de Al	5,6	58.273 a
Campo 3	2,66 mM de Al	4,7	24.686 b

Fonte: Laboratório FULLIN
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

No campo 1 mesmo na ausência de Al nos solos as folhas apresentaram valores elevados de Al foliar. Estes resultados foram similares ao de Veloso et al. (1995), em *Piper nigrum*, L., que relatou ser comum em plantas superiores encontrar cerca de 200 ppm de Al na matéria seca.

4.3 Prospecção fitoquímica das folhas da cultivar FB 200

A prospecção fitoquímica possibilita a identificação dos constituintes do vegetal, principalmente dos compostos originário do metabolismo secundários envolvidos ou não com a ação biológica (SONAGLIO et al., 2000). Na prospecção fitoquímica realizada com o EBE das folhas da cultivar FB200 coletadas em três campos expostos a diferentes concentrações de Al (Tabela 12) constatou-se a presença dos

grupos saponinas, esteroides e flavonoides para os três tratamentos, verificou-se para o tratamento 1e 2 a presença de heterosídeo antracênico. A função biológica dos flavonoides nas plantas esta relacionada com reações contra infeções virais e fúngicas, atração de insetos polinizadores, regulação do desenvolvimento vegetal e na ação antioxidante das células vegetais (FERRO, 2006; TAIZ et al., 2009).

Já no homem os flavonoides possuem atividade antimicrobiana, diurética, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, fortalecimento dos vasos capilares, ansiolítica entre outras funções (PENG et al., 2003; FERRO, 2006; DORNAS et al., 2007; COLETA et al., 2008). Os esteroides são utilizados como cardiotônicos, precursores de vitamina D, anticoncepcionais e agentes anti-inflamatórios (ROBBERS et al., 1997), as saponinas possuem atividade hemolítica, anti-inflamatória, diurética e formam complexos com esteroides possibilitando uma ação antifúngica (SCHENKEL et al., 2000; FERRO, 2006; OLIVEIRA & FIGUEIREDO, 2007). A presença de saponinas, esteroides e flavonoides nos extratos das folhas de *P. edulis* é responsável pelos efeitos terapêuticos do maracujá, uma vez que algumas das propriedades medicinais dessa planta são atribuídas a esses metabólitos.

Tabela 12: Análise fitoquímica do EBE das folhas de *Passiflora. edulis* cultivar FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al

	Tratamentos		
Classe de Metabólito Secundário	**T1** **0,0 mM de Al**	**T2** **0,33 mM de Al**	**T3** **2,66 mM de Al**
Tanino	-	-	-
Cumarina	-	-	-
Saponina	+	+	+
Alcalóide	-	-	-
Esteróide/ Triterpeno	+/-	+/-	+/-
Flavonoide	+	+	+
Heterosídeo antracênico	-	+	+
Naftoquinona	-	-	-

Na triagem fitoquímica de *Passiflora serratodigitata* L foram detectados alcalóides, flavonoides e taninos (STRASSER, 2011), as saponinas são observadas especialmente em *P.alata e P.edulis,* já os flavonoides *C*-glicosilados são frequentemente encontrados nas espécies de *Passiflora* (GOSMANN et al., 2011).

Segundo Zucolotto et al. (2006), as variedades de *P.edulis* (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener e *P. edulis* Sims) apresentam diferenças nos aspectos morfológicos e possivelmente nos constituintes químicos também, por isso a importância de especificar a variedade a ser estuda nos trabalhos.

4.4 Quantificação de flavonoides utilizando extrato hexano/ diclorometano

Os resultados da quantificação de flavonoides (Tabela 13) indicaram maior concentração da substância para o tratamento (T2), o tratamento (T1) e (T3) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, porém diferenciaram estatisticamente do tratamento (T2).

Tabela 13: Concentração de flavonoides utilizando o extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cultivar FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al

Tratamentos **Extrato hexano/diclorometano**	**Concentração de flavonoides (µg/mL)** [(1)]	**Concentração percentual de flavonoides**
T1 (0,00 mM de Al)	11,16 b	55,8%
T2 (0,33 mM de Al)	13,92 a	69,6%
T3 (2,66 mM de Al)	10,62 b	53,12%

[(1)] Os dados são médias das absorbâncias por tratamento. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Em estudo realizado com *Camellia sinensis,* Chen et al. (2011) verificaram que o aumento da concentração de Al em hidropônica promoveu maiores níveis na concentração total de substâncias fenólicas. Também observaram que o Al estimulou a absorção de Ca, Mg, K e Mn enquanto a absorção dos elementos Fe, Cu e Zn foi reduzida. Ao contrário este trabalho verificou para as folhas do tratamento (T3), os elementos Fe, Mg, Mn e Zn mantiveram-se dentro da faixa adequada, o Cu acima e o K abaixo.

Analisando o teor de flavonoides e nutrientes das folhas de *Passiflora edulis Sims* f**.** *flavicarpa* Freitas et al. (2007), obtiveram maiores teores de rutina, vitexina e flavonoides totais nas folhas mais jovens. Além disso, verificaram também para estas folhas maiores teores de N, P, K e Zn e menores quantidades para os elementos Ca, Mg, B, Cl e Mn nas folhas mais jovens.

Os compostos fenólicos, tais como os flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos (HCA) e seus precursores podem apresentar atividade antioxidante em células vegetais, porém também demonstram ação pró-oxidante em determinadas condições, como a presença do Al^{+3} nos tecidos vegetais que pode aumentar a capacidade de peroxidação lipídica de radicais fenoxil. Este radical pode exibir atividade citotóxica pró-oxidante quando o seu tempo de vida é prolongado por efeito desse metal designado de spin-estabilizante (SAKIHAMA et al., 2002).

4.5 Análise mutagênica

A DL 50 é a dose letal capaz de induzir o óbito de 50% da população. Utiliza-se este teste para avaliar a toxicidade aguda das substâncias, porém neste estudo não foi realizada, devido existência de trabalhos que já relataram a dose letal do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis.* O valor encontrado por Rojas et al. (2006) foi de 10 687 $mg.Kg^{-1}$ sendo classificada como não tóxica.

Na análise do teste de mutagenicidade o tratamento T1 (Tabela 14) para a concentração de 100 $mg.Kg^{-1}$ não diferiu dos controles negativo e solvente (CDMSO). Já as concentrações de 250 e 500 $mg.Kg^{-1}$ diferiram dos controles negativo, solvente e positivo e também diferiram entre si. Porém as médias observadas para estas duas concentrações em T1 foram menores que as verificadas para o controle negativo. Essa situação evidencia que os extratos do tratamento T1 nas três concentrações testadas não promoveram danos cromossômicos nos eritroblastos de camundongos (*Mus musculus*). Resultados similares foram encontrados por Remigio et al. (2001) em estudo com seis extratos de plantas medicinais, observaram que o extrato de *Passiflora incarnata* L não induzia o aumento de micronúcleos.

Para o tratamento T2 (Tabela 14) as concentrações de 100 e 500 $mg.Kg^{-1}$ diferiram dos controles negativo, solvente e positivo, a concentração de 250 $mg.Kg^{-1}$ apresentou-se no limiar entre o controle DMSO e a concentração de 500$mg.Kg^{-1}$. Os resultados para esse tratamento demonstram um aumento na incidência de micronúcleos quando comparado com o controle negativo, indicando potencial mutagênico, porém significativamente diferente do controle positivo. Este tratamento apresentou para seus extratos a maior concentração de flavonoides e potencial

mutagênico para todas as concentrações do extrato testado demostrando uma possível relação entre concentração de flavonoides e o potencial mutagênico. Barca (2008) estudando mutagênese induzida por flavonoides presentes decocto da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi relatou que os flavonoides são responsáveis pelo potencial mutagênico do extrato da aroeira e que as lesões geradas são oxidativas. O autor ainda propôs que os flavonoides possam gerar espécies reativas de oxigênio de duas formas, por mecanismo envolvendo metais ou pela presença de grupamento hidroxilas na molécula de flavonoides.

No tratamento T3 (Tabela 14) apenas a concentração de 500 mg.Kg $^{-1}$ apresentou diferença significativa em relação aos controles negativo, solvente e positivo. As concentrações de 100 e 250 mg.Kg $^{-1}$ não diferiram dos controles negativos. Portanto somente a maior concentração do extrato induziu danos cromossômicos nos eritrócitos policromáticos em medula óssea de camundongos. Um dos primeiros estudos a demonstrar um resultado similar para o gênero *Passiflora*, foi o trabalho de Boeira et al. (2010) com *Passiflora alata* Curtis, onde observaram o aumento da frequência de micronúcleos em células de sangue periférico de camundongos na maior dose testada.

Tabela 14: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) machos tratados com três concentrações do extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cv. FB200 cultivadas em campos com diferentes concentrações de Al e os respectivos controles

Tratamentos	**Nº de animais**	**Nº de células**	**Média de micronúcleos (EPCMNs)**		
			T1	**T2**	**T3**
CN	6	12.000	6,66 c	6,66 e	6,66 d
CDMSO	6	12.000	8,00 b	8,00 d	8,00 c
CP	6	12.000	60,33 a	60,33 a	60,33 a
Extrato hexano/diclorometano					
*100 mg.Kg^{-1}	6	12.000	7,16 bc	11,0 b	6,16 d
*250 mg.Kg^{-1}	6	12.000	5,5 d	8,33 cd	7,33 c
*500 mg.Kg^{-1}	6	12.000	5,0 e	9,33 c	9,33 b

T1: Extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cv.FB200 cultivada em campo com concentração 0 de Al; T2: Extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cv.FB200 cultivada em campo com concentração 0,33 mM de Al; T3: Extrato hexano/diclorometano de folhas de *P.edulis* cv.FB200 cultivada em campo com concentração 2,66 mM de Al CN: Controle negativo (solução de NaCl 0,9%); CDMSO: Controle do solvente (dimetilsulfoxido- DMSO); CP: Controle positivo (ciclofosfamida 50 mg kg^{-1}); * Tratamento agudo utilizando o extrato hexano/diclorometano em três concentrações por um período de 24 horas Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis ao nível de 1% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Para a determinação da citotoxicidade na medula óssea, foi analisada a relação EPC/ EPC+ENC em 200 células e os resultados observados não indicaram diferenças estatísticas entre os tratamentos e os controles (Tabela 15). Entretanto os valores dos tratamentos (T1; T2 e T3) para as concentrações de 100 e 250 mg.Kg $^{-1}$ apresentaram uma redução menor que 10% do controle negativo (NaCl 0,9%). As concentrações de 500 mg.Kg^{-1} dos tratamentos T2 e T3 apresentaram depressão dos EPC, porém não atingiram os valores do controle positivo. Segundo Ribeiro et al. (2003), a toxicidade excessiva está relacionada com a redução de 80% ou mais do valor do controle. Logo os resultados para estes tratamentos mostraram ausência de citotoxicidade, evidenciando que o extrato não interferiu no processo de maturação dos EPC. Em estudos realizados com *Passiflora alata*, observou-se que o extrato de *P. alata* não causou citotoxicidade significativa em nenhuma das doses testadas nem mesmo no controle positivo (BOEIRA, et al. 2010).

Tabela 15: Relação de EPC/(EPC+ENC) analisados em 200 eritrócitos por animal para verificação da citotoxicidade

Tratamentos	**Média da relação EPC/(EPC+ENC)**		
	T1	**T2**	**T3**
CN	0,86 a	0,86 a	0,86 a
CDMSO	0,79 a	0,79 a	0,79 a
CP	0,72 a	0,72 a	0,72 a
100 mg.Kg^{-1}	0,80 a	0,80 a	0,85 a
250 mg.Kg^{-1}	0,83 a	0,81 a	0,82 a
500 mg.Kg^{-1}	0,80 a	0,78 a	0,75 a

5 CONCLUSÃO

Em relação à análise química dos solos, o Mg foi o elemento encontrado em baixas concentrações nos três campos avaliados. Já o Ca mostrou valores baixo em solos com pH ácido. Apenas o campo 3 com as maiores concentrações de Al^{+3} disponível apresentou acidez elevada (4,7). As análises nutricionais das folhas apresentaram em geral uma variação acima ou abaixo, no entanto, com valores (bem próximos) dos adequados. Apenas para o campo 1 e 3 houve um aumento acentuado de Cu e uma redução de 38 % de K para o campo 2 em relação ao valor mínimo adequado.

Na prospecção fitoquímica os componentes majoritários para os três extratos das folhas de *P.edulis* coletadas em campos expostos a diferentes concentrações de Al, foram as saponinas, esteróides e os flavonoides. Verificou-se para o tratamento (T2) a maior concentração de flavonoides, este tratamento também apresentou para todas as concentrações do extrato potencial mutagênico. Os extratos das folhas do tratamento (T3) demonstraram potencial mutagênico apenas para a concentração de 500 mg. A citotoxicidade não foi observada nos extratos das folhas *P. edulis* cv. FB 200 coletadas em campos expostos a diferentes concentrações de Al

Em resumo, tanto os nutrientes do solo como os foliares apresentaram, de forma geral, pequenas variações. Os compostos químicos detectados para *P.edulis* cv. FB 200 foram saponinas, esteroides e os flavonoides. Os extratos das folhas de *P. edulis* do tratamento T2 apresentaram maior concentração de flavonoides e provavelmente este pode ter induzido a mutagenicidade em células de medula óssea de camundongos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese proposta no início deste trabalho de que cultivos de *Passiflora edulis*. expostos a alta concentração de alumínio disponível no solo resultaria em maior teor de flavonoides capazes de provocar atividade mutagênica, não foi confirmada.

Este trabalho auxilia na discussão sobre a real influência do alumínio disponível em atividades metabólicas e ontogênicas de cultivares de *Passiflora edulis*. Algumas considerações e reflexões são levantadas a seguir como intuito de instigar o desenvolvimento de mais pesquisas nessa área do conhecimento.

Uma vez que os resultados não apresentaram alterações morfológicas significativas poder-se-ia considerar de imediato que o alumínio disponível não tem influência na ontogenia dessa planta. Entretanto, o tempo de exposição a essa condição estabelecida neste trabalho foi de duas semanas. A oportunidade de se aumentar este período de exposição e iniciar o tratamento com a planta ainda mais jovem é visto aqui como uma perspectiva para futuros estudos, sobretudo para aqueles de médio e longo prazo de execução, que envolvam a cultivar FB100.

O potencial mutagênico mais significativo, o qual foi observado na concentração intermediária de alumínio disponível (0,33mM), aponta para a possibilidade de indagar se há um limiar de concentração de alumínio disponível que promova um alto nível de flavonoides em órgãos vegetais com alto metabolismo, como é o caso das folhas. Estudos adicionais com outros testes para avaliar a relação da atividade mutagênica de *Passiflora edulis* com a sua concentração de flavonoides, em outras condições experimentais, poderá ajudar ao melhor entendimento deste processo.

Os resultados encontrados quanto à interferência do alumínio no desenvolvimento de *P. edulis* e em sua ação mutagênica, aliados à escassez de estudos sobre essa influência, principalmente com as cultivares utilizadas neste trabalho, não possibilitam conclusões mais contundentes. Logo, há necessidade em estimular estudos mais integrados envolvendo a fisiologia vegetal, nutrição mineral, pedologia e técnicas de manejo.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. R. de. **Estudo citogenético em camundongos C57BL/6 selvagens e knockout para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4NQO**. 2008. 80f Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

ARAÚJO, R.D. Uso medicinal do maracujá. In: COSTA, A.F.S; COSTA, A.N. **Tecnologias para produção de maracujá**, Vitória: Incaper, 2005. cap.9, p.197-204.

BENINCÁ, J. P. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, p.1097–1105, 2007.

BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 444-47, 2007.

BARCA, F.N.T.V. **Mutagênese induzida por flavonoides presentes decocto das casca de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2008. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BOEIRA, J.M et al. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) .**Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.2, p. 526-32, 2010.

BORGES, A.L. **Diagnose Foliar em Maracujazeiro**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2005.2P. (Maracujá em Foco, 28).

BORTOLO, D.P.G.; MARQUES, P.A.A.; PACHECO, A.C. Teor e rendimento de flavonoides em calêndula (*calendula officinalis* L) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.4, p.435-441, 2009.

BRACCINI, M.C.L et al. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao Alumínio em solução nutritiva.II. Teores de P, Ca e Al e eficiência ao P e Ca. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22: p.443-50, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CANDIDO, A.O. et al. **Avaliação das características químicas de solos em subsuperfície sob cultivo de café na microrregião do caparaó – ES**. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2009. Disponível em:<http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_1262_1466_01.pdf> Acesso em: 22 dez. 2011.

CAROLLO, C.A. **Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania***. 2008. Tese (Doutor em Produtos Naturais)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CHEN, Y. M. et al. Aluminium and nutrients induce changes in the profiles of phenolic substances in tea plants (*Camellia sinensis* CV TTES, No. 12 (TTE)). **Journal of the science of food and Agriculture**, V. 91, p. 1111–17, 2011.

COLETA, M. et al. Assessment of luteolin (3′,4′,5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. **Behavioural Brain Research**, 189, p.75–82, 2008.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais do cultivo a terapêutica**.7 ed. Petrópolis: Vozes, 2008.

COSTA, A.F**. Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

COSTA, A. de F.S. da et al. **Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro**. Vitória, ES: Incaper, 2008. 56p.

COSTA, A.F.S.; ALVES, F.L.; COSTA, A.N. Plantio, foramação e manejo da cultura do maracujá. in: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória: Incaper, 2005. Cap.2, p.23-56.

COSTA, A.N.; COSTA, A.F.S. Pólo de maracujá no estado do Espírito Santo: Importância sócioeconômica e potencialidades. in:_____. **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória: Incaper, 2005. Cap.1, p.13-21.

COSTA, A.N.; SALGADO, J.S.; COSTA, A.F.S. Solos, nutrição e adubação do maracujazeiro. in: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória: Incaper, 2005. Cap.3, p.57-84.

CRESTANI, M. et al. **Toxidez por alumínio e a seleção de plantas tolerantes com base na expressão fenotípica.** Embrapa Clima Temperado -Documentos. Pelotas, 2009, 55 p.

CRUZ, F. J. R. et al. **Mecanismos bioquímicos e fisiológicos da toxidez de alumínio (Al^{3+}) em plantas sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) moench]**.VI Seminário de iniciação científica/UFRA e XII Seminário de iniciação científica da EMBRAPA/ Amazônia Oriental. 2008.

DENG, J. et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.148–53, 2010.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update . **Journal of Ethnopharmacology** . v.94, p. 1–23, 2004.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, n.3, p.241-249, 2007.

EMBRAPA. **Produção brasileira de maracujá.** 2009. Disponívelem:<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2009.pdf>. Acesso em 24 de junho de 2011.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: FAEPE, 2001.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa.* **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.4, p.360-67, 2009.

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

FERRO, D.Os princípios ativos fitoterápicos: Aspectos clínicos. in:_____. **Fitoterapia: Conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006. Cap.8, p.116-30.

FREITAS, M. S. M. et al. Flavonoides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p. 1634-39, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GOSMANN, G. et al. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 88-99, 2011.

GUERCIO, A. M. F.D.; CAMARGO, C. E. de O. Herança da tolerância à toxicidade de alumínio em trigo duro. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.4, p. 775-80. 2011.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agr. Exp. STA**, 1950.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal.** 2009. Disponívelem:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/tabelas_pdf/tabela03.pdf>. Acesso em 12 de janeiro de 2012.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 519-28, 2005.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis 'flavicarpa'*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.1085–90, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil**. 2ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. p.409-10.

MACEDO, F. L. de et al. Efeito do alumínio em plantas de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), cultivadas em solução nutritiva. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 157-164, 2011.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MARTINS, C. M. et al. Prospecção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p. 1934-40. 2010.

MENDHAM, J. et al. **VOGEL: Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. S.A., 2002.

MONTANHER, A.B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 281–88, 2007.

MOREIRA, R.R.D; SANTOS, L.E.; VARELLA, S.D; VARANDA, E.A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e do compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados.**Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.12, n.1, p.11-19, 2002.

NETO, A.E.F. et al. **Fertilidade do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.; ANGHINONI, I. Crescimento, morfologia radicular e liberação de compostos orgânicos por plântulas de soja em função da atividade de alumínio na solução do solo de campo natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.97-101, 2007.

OLIVEIRA, A.L.S.; FIGUEIREDO, A.D.L. Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 384-86, 2007.

OLIVEIRA JÚNIOR, A.C.; FAQUIN, V.; PINTO, J.E.B.P. Efeitos de calagem e adubação no crescimento e nutrição de arnica**. Horticultura Brasileira,** v.24, n.3, p.347-51, 2006.

PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alúminio. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.1, p.17-25, 2007.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Quím. Nova**, v.33, n.2, p. 288-91, 2010.

PENG, Z.F. et al. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, n.62, p.219-28, 2003.

PEREIRA, J.M. et al. Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p. 961-67. 2008.

PERON, A.P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 127-30, 2008.

PIRES, F.R.et al. Levantamento da fertilidade nas principais unidades de mapeamento do Espírito Santo. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v.34, n.2, p.115-23, 2003.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**.2ed. Florianópolis: UFSC, 2000. Cap.3, p.39-59.

REMIGIO, M.A.C. et al. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extratctos de plantas medicinales em células de la médula ósea de roedores. **Revista de toxicología**. Pamplona, v.18, n.002, p.75-8, 2001.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES,E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas:ULBRA, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. Baltimore:Editorial premier,1997.

ROJAS, J. et al. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. **An Fac Med Lima**, v.67, n.3, p. 206-13, 2006.

RONG, Q. et al. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters *in allium* cepa var. *agrogarum* L. **BMC plant biology**, v.10 p. 225, 2010.

RUSAK, G. et al. The determination of the content of polyphenols in the areal parts of the species *Centaura rupestris* L. and *C. fristchii* Hayek (Astearaceae**). Acta Pharm**, v. 43, p 121-25, 1993.

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced
oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67–80, 2002.

SALOMÉ, J. R. **Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico**. 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.;. CABRAL, C. P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, n.4, p.787-96, 2000.

SANTOS, M. D. dos.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.21, n.2, p. 135-40, 1998.

SANTOS, C. A.C. dos. Rúcula em cultivo hidropônico submetida a diferentes Concentrações de alumínio. **Bioscience. Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 905-12, 2010.

SARTI, S.J. Fitoterápicos e Fitoterapia. In: FERRO, D et al. **Fitoterapia**: Conceitos clínicos. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. Cap.2, p.9-34.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmaconosia:** da planta ao medicamento, 2 ed.. Porto Alegre: UFRGS/EDUSC. 2000. cap. 27, p. 597-622.

SILVA, A.C. **Avaliação da tolerância ao alumínio em plântulas de maracujazeiro e mamoeiro**. 2009. 72f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmaconosia:** da planta ao medicamento, 2 ed. Porto Alegre: UFRGS/EDUSC. 2000. Cap. 13, p. 221-58.

STRASSER, M. **Triagem fitoquímica e farmacológica e formulação de nanopartículas de produtos derivados de *Passiflora serratodigitata*** L. 2011.89f.

Dissertação (mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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

VARGAS, A.J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia,** v.78, p.112–19, 2007.

VASCONCELOS, S.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p. 357-63, 2002.

VELOSO, C.A.C. et al. Efeitos do alumínio em pimenteiras do reino (*Piper nigrum*, L.) cultivadas em solução nutritiva. **Sci. Agric.***,* Piracicaba, v.52, n.2, p. 368-75, 1995.

ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v.96, p.86-91, 2010.

ZUCOLOTTO, S.M.; PALERMO, J.A; SCHENKEL, E.P. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. **Acta Farm. Bonaerense***,* v. 25 n.1, p. 5-9, 2006.

ANEXO 1

Solução Nutritiva de Hoagland (1/2 força)

Substâncias	P M	Sol.Estoque (1 mol m^{-3})	Conc. Final	Para 1 L
KH_2PO_4	136,09	136,09 g L^{-1}	4 mol m^{-3}	4 mL
KNO_3	101,11	101,11 g L^{-1}	4 mol m^{-3}	4 mL
$MgCl_2.6H_2O$	203,33	203,33 g L^{-1}	1 mol m^{-3}	1 mL
$MgSO_4.7H_2O$	246,49	246,49 g L^{-1}	3 mol m^{-3}	3mL
$CaCl_2$. $2H_2O$	147,02	147,02 g L^{-1}	3 mol m^{-3}	3 mL
$CaSO_4$. $2H_2O$	172,17	172,17 g L^{-1}	1 mol m^{-3}	0,1721g
$NaNO_3$	84,99	84,99 g L^{-1}	2 mol m^{-3}	2 mL
NH_4NO_3	80,04	80,04 g L^{-1}	1 mol m^{-3}	1 mL

Solução estoque de micronutrientes				
Substâncias	**P M**	**Moles m^{-3}**	**Sol. Estoque** (g L^{-1})	**Para 250m L**
H_3BO_3	61,83	0,0460	2,884	0,7210
$ZnSO_4.7H_2O$	287,54	0,0015	0,432	0,1080
$CuSO_4.5H_2O$	249,68	0,0003	0,075	0,0187
$MnCl_2.4H_2O$	197,91	0,0018	3,562	0,8905
Na_2MoO_4. $2H_2O$	241,95	0,0006	0,145	0,0362
Solução de Fe – EDTA				
Na_2EDTA	372,24	0,0038	14,10	3,52
$FeCl_3$. $6H_2O$	270,30	0,0038	10,30	2,57

ANEXO 2

Análise química de solos FB 200

FULLIN - LABORATÓRIO DE ANÁLISE AGRÔNOMICA E AMBIENTAL LTDA

Av. Samuel Batista Cruz, 1099 - Centro
CEP: 29900-100 Linhares - ES CNPJ: 03.190.861/0001-78
Telefax: (27) 3371-3460/3289 - E-mail: atendimento@fullin.com.br

ANÁLISE QUÍMICA DE SOLOS

CLIENTE: Tatiane Lemos
ENDEREÇO: UFES
MUNICÍPIO: Vitória-ES
PROPRIEDADE:
CULTURA: Maracujá
TELEFONE 8139-7945
FAX:
DATA ENTRADA: 21/06/2011

PARÂMETRO ANALISADO	UNID.	RESULTADO DA ANÁLISE		
		Campo 02	Campo 01	Campo 03
Fósforo Mehlich 1/	mg/dm3	35	11	10
Fósforo Remanescente 2/	mg/L	-	-	-
Fósforo Resina	mg/dm3	-	-	-
Potássio (K) 1/	mg/dm3	68	30	37
Enxofre (S) 3/	mg/dm3	-	-	-
Cálcio (Ca) 4/	cmol	1,4	2,3	1,0
Magnésio (Mg) 4/	cmol	0,3	0,5	0,2
Alumínio (Al) 4/	cmol	0,1	0,0	0,8
H+Al 5/	cmol	2,0	1,2	4,0
pH em H2O 6/	-	5,6	6,0	4,7
pH em CaCl2 7/	-	-	-	-
pH SMP 5/	-	-	-	-
Matéria Orgânica 8/	dag/kg	1,5	1,6	2,1
Ferro (Fe) 1/	mg/dm3	-	-	-
Zinco (Zn) 1/	mg/dm3	-	-	-
Cobre (Cu) 1/	mg/dm3	-	-	-
Manganês (Mn) 1/	mg/dm3	-	-	-
Boro (B) 9/	mg/dm3	-	-	-
Sódio (Na) 1/	mg/dm3	29,0	15,0	17,0
Cloro (Cl) 10/	mg/dm3	-	-	-
Relação Ca/Mg	-	4,7	4,6	5,0
Relação Ca/K	-	8,0	29,9	10,5
Relação Mg/K	-	1,7	6,5	2,1
Sat. Ca na CTC (T)	%	36,1	56,4	18,9
Sat. Mg na CTC (T)	%	7,7	12,3	3,8
Sat. K na CTC (T)	%	4,5	1,9	1,8
Índice saturação Na	%	3,2	1,6	1,2
Soma de Bases (SB)	cmol	1,9	2,9	1,3
CTC efetiva (t)	cmol	2,0	2,9	2,1
CTC a pH 7,0 (T)	cmol	3,9	4,1	5,3
Sat. Alumínio (m)	%	5	0	38
Saturação de bases	%	48,4	70,6	24,5

1/ Extração: HCl 0,05 mol/L +H2SO4 0,025 mol/L
2/ P na solução de equilíbrio, obtido com CaCl2 10mm/L
3/ Extração: Ca(H2PO4)2 0,01 mol/L
4/ Extração: KCl 1mol/L
5/ Solução Tampão SMP
6/ pH em H2O 1:2,5
7/ pH em CaCl2 0,01 mol/L
8/ Oxidação: Na2Cr2O7 2H2O + 4 mol/L H2SO4 10 mol/L
9/ Extração: BaCl2 2H2O 0,125%
10/ Extração: H2O 1:5
- Análise não solicitada

Atenção: para verificar os níveis de referência de alguns dos resultados acima, consulte a página em anexo

Mensagem ao Cliente FULLIN:

Linhares-ES, 28/06/2011

- Visite nosso site: www.fullin.com.br

- Empresa CERTIFICADA, conforme Norma 9001:2008;

- Em 2011, consulte a relação de serviços da FULLIN.

Eli Antônio Fullin
Eng.Agrônomo CREA: 3706 D/ES

ANEXO 3

Análise nutricional e de alumínio das folhas da cv. FB 200

FULLIN - LABORATÓRIO DE ANÁLISE AGRÔNOMICA E CONSULTORIA LTDA

Av. Samuel Batista Cruz, 1099 - Centro
CEP: 29900-100 Linhares - ES CNPJ: 03.190.861/0001-78
Telefax: (27) 3371-3460/3289 - E-mail: atendimento@fullin.com.br

ANÁLISE QUÍMICA DE PLANTAS

CLIENTE: Tatiane Lemos
ENDEREÇO: Núcleo de Estudos da Fotossíntese
MUNICÍPIO: Vitória-ES
PROPRIEDADE:

CULTURA: Maracujá
TELEFONE 8139-7945
FAX:

D. ENTRADA: 06/09/2011

PARÂMETRO ANALISADO	UNID.	VALOR ADEQ.	RESULTADO DA ANÁLISE		
			Campo 02	Campo 01	Campo 03
Nitrogênio (N) 1/	g/Kg	43 - 55	62,30	61,67	54,81
Fósforo 2/	g/Kg	2,3 - 2,7	4,11	6,26	2,49
Potássio (K) 2/	g/Kg	20 - 30	16,88	25,00	20,63
Cálcio (Ca) 2/	g/Kg	19 - 25	22,63	22,00	27,23
Magnésio (Mg) 2/	g/Kg	1,9 - 2,4	3,62	3,56	4,50
Enxofre (S) 2/	g/Kg	3,2 - 4,0	6,24	4,96	5,11
Ferro (Fe) 2/	mg/Kg	120 - 200	172	150	150
Zinco (Zn)	mg/Kg	25 - 60	44	52	38
Cobre (Cu) 2/	mg/Kg	20 - 35	14	48	30
Manganês (Mn) 2/	mg/Kg	40 - 250	223	326	94
Boro (B) 3/	mg/Kg	40 - 100	36	31	45
Sódio (Na) 2/	mg/Kg	-	-	-	-
Cloro (Cl) 4/	mg/Kg	-	-	-	-
Aluminio (Al) 3/	mg/Kg		-	-	-
Relação N /P	-	18,5-20,5	15,2	9,9	22,0
Relação N / K	-	1,8-2,1	3,7	2,5	2,7
Relação N / S	-	13,4-13,8	10,0	12,4	10,7
Relação N / Mg	-	22,5-23,0	17,3	17,1	12,2
Relação N / Cu	-	1,8-2,8	4,6	1,3	1,8
Relação N / B	-	0,55-1,10	1,7	2,0	1,2
Relação P / Mg	-	1,1-1,2	1,1	1,7	0,6
Relação P / Zn	-	0,05-0,10	0,09	0,12	0,07
Relação P / Cu	-	0,07-0,10	0,30	0,13	0,08
Relação K / Ca	-	1,0-1,2	0,7	1,1	0,8
Relação K / Mg	-	10,5-12,5	4,7	6,9	4,6
Relação K / Mn	-	0,2-0,5	0,08	0,08	0,22
Relação Ca / Mg	-	10,0-10,5	6,3	6,1	6,0
Relação Ca / Mn	-	0,1-0,5	0,10	0,07	0,29
Relação Fe / Mn	-	1,0-3,0	0,77	0,46	1,59

1/ Digestão ácida a quente
2/ Digestão nitro-perclórica
3/ Digetão seca
4/ Solução aquosa
- Análise não solicitada

Mensagem ao Cliente FULLIN:

- Visite nosso site: www.fullin.com.br

- Empresa CERTIFICADA, conforme Norma 9001:2008;

- Em 2011, consulte a relação de serviços da FULLIN.

Linhares-ES, 20/09/2011

Eli Antônio Fullin
Eng.Agrônomo CREA: 3706 D/ES