

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Kássia Cauana Trapp

**CITOGENOTOXICIDADE, FENÓLICOS TOTAIS E CRESCIMENTO  
DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN CULTIVADA SOB  
CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO**

Santa Maria, RS, Brasil  
2018

**Kássia Cauana Trapp**

**CITOGENOTOXICIDADE, FENÓLICOS TOTAIS E CRESCIMENTO DE  
*Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN CULTIVADA SOB CONCENTRAÇÕES  
DE COBRE E ZINCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agrobiologia.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil  
2018

Trapp, Kássia Cauana  
Citogenotoxicidade, Compostos Fenólicos e Crescimento  
de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen Cultivada sob  
Concentrações de Cobre e Zinco / Kássia Cauana Trapp.-  
2018.

100 p.; 30 cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2018

1. Plantas Medicinais 2. Nutrição Mineral 3. *Allium*  
cepa 4. Capacidade antiproliferativa 5. Ginseng  
brasileiro I. Tedesco, Solange Bosio II. Título.

**Kássia Cauana Trapp**

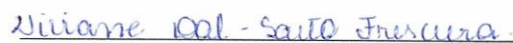
**CITOGENOTOXICIDADE, FENÓLICOS TOTAIS E CRESCIMENTO DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN CULTIVADA SOB CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agrobiologia**.

**Aprovado em 27 de fevereiro de 2018:**



**Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)**  
(Presidente\ Orientador)



**Viviane Dal-Souto Frescura, Dra. (UFSM)**



**Thais Scotti Canto-Dorow, Dra. (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2018

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais por serem responsáveis pela pessoa que me tornei e ao meu avô Ilvo Trapp (in memoriam) por ser o melhor exemplo de pessoa que poderia ter tido. Amo muito vocês

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por serem meus grandes mestres e me apoiarem em todas as minhas decisões e auxiliarem na realização dos meus sonhos, por mais difíceis que parecessem ser.

A todos os meus familiares, especialmente meus avós Helio e Dalia von Mühlen, meu irmão Pablo e minha tia Leila Kohl, por toda a paciência e ajuda que me proporcionaram nestes últimos anos, estendendo a mão e me ajudado a caminhar sempre que necessário fosse.

A minha orientadora, Solange Bosio Tedesco, por todo o carinho, conselhos e dedicação que teve comigo desde o primeiro semestre da graduação, este trabalho só foi possível graças a senhora.

Aos colegas do Labcitogen que mais do que colegas de pesquisa se tornaram grandes amigas, especialmente a Micheli, Marina, Luisa, Carmine e Cassiane que me auxiliaram durante os experimentos do mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, especialmente a Letícia Frizzo, que me acolheram e me auxiliaram durante o mestrado.

Ao professor Fernando Teixeira Nicoloso, por toda ajuda, orientação e ensinamentos passados durante esse tempo.

Aos amigos que Santa Maria me trouxe Micheli, Anderson, Júlia, Luísa, Jeferson, e que levarei para toda a minha vida, muito obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar e me ouvir.

Aos meus colegas de pós-graduação Luana, Alan e Rosana, tenham certeza que vocês estarão para sempre presentes em minha vida. Obrigado pelos mates, risadas e principalmente pelos conselhos e palavras de apoio quando tudo parecia perdido.

A Débora Desconsi Suter, por ter se tornado minha irmã do coração, me auxiliado das mais diversas maneiras nestes seis anos em que moramos juntas. Sem seu apoio, amparo e conselhos esta caminhada não teria sido tão prazerosa.

A professora Viviane Dal-Souto Frescura, que por meio de sua dedicação e adoração pela pesquisa, me inspirou neste trabalho. Obrigada por toda sua ajuda

Ao meu namorado, Luciano Somavila, por toda paciência, companheirismo e ajuda.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, pela formação que me proporcionou, e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra, permitiram que este momento fosse possível.

Fazemos ciência com os fatos  
assim como uma casa é feita de  
tijolos, mas uma acumulação de  
fatos não é ciência assim como um  
conjunto de tijolos não é uma casa

(Henri Poincaré, 1984).

## RESUMO

### CITOGENOTOXICIDADE, FENÓLICOS TOTAIS E CRESCIMENTO DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN CULTIVADA SOB CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO

AUTORA: Kássia Cauana Trapp  
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, espécie medicinal nativa, possui a capacidade de acumular metais, podendo alterar sua produção de metabólitos e conseqüentemente sua capacidade medicinal. Assim, objetivou-se avaliar a influência de concentrações de zinco e cobre no crescimento, na biometria radicular e no processo fotossintético de *P. glomerata*, bem como sua interferência na produção de compostos fenólicos e citogenotoxicidade de extratos de folhas e raízes desta espécie. Foi realizada a propagação clonal *in vitro* de um genótipo de *P. glomerata* e os explantes adquiridos utilizados para experimento em casa de vegetação. Foram utilizados sete tratamentos, um consistia em cultivo com solução nutritiva tida como ideal (2  $\mu\text{M}$  de zinco e 0,5  $\mu\text{M}$  de cobre), três em soluções com níveis excessivos de zinco (50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ ) e três com excesso de cobre (20, 40 e 60  $\mu\text{M}$ ). Duas coletas foram realizadas, aos 63 e 84 dias após o início dos tratamentos. As plantas da segunda coleta foram utilizadas também para análise de parâmetros fotossintéticos e biometria radicular e, aquisição da massa de matéria fresca e seca. Para o teste de citogenotoxicidade, foram utilizadas folhas e raízes secas de ambas as coletas e a partir deste material foram preparados extratos aquosos, na concentração de 10g.L<sup>-1</sup>, utilizados no sistema teste *Allium cepa*. A técnica de Folin-Ciocalteu foi utilizada para determinação de fenólicos totais em extratos da segunda coleta. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. As concentrações de zinco e cobre não influenciaram diretamente na capacidade antiproliferativa dos extratos de folhas de *P. glomerata*. No que diz respeito aos preparados a partir de raízes, os experimentos apresentaram variações, uma vez que raízes tratadas com zinco apresentaram capacidade antiproliferativa e o mesmo não ocorre para extratos preparados com as raízes de plantas cultivadas sob concentrações de cobre. A idade fisiológica não foi significativa para a citogenotoxicidade e os extratos não foram genotóxicos. Para a concentração de compostos fenólicos, foi observada uma concentração muito elevada (entre 180,3 e 291,05 mg EAG.L<sup>-1</sup>) nos extratos de folhas, mas que foi reduzida em até 20 vezes para ambas as ocasiões nos extratos de raízes. A análise da biometria radicular foi realizada com 25% do sistema radicular e percebeu-se que cobre e zinco interferiram no desenvolvimento das raízes, visto que nos níveis de 50 e 75  $\mu\text{M}$  de zinco apenas o diâmetro radicular permaneceu inalterado. O cobre por sua vez reduziu o comprimento radicular em todas as concentrações testadas e a área superficial em 40 e 60  $\mu\text{M}$ . A produção de biomassa, principalmente da parte aérea, foi afetada, sobretudo em níveis de 75 e 100  $\mu\text{M}$  de zinco e 60  $\mu\text{M}$  de cobre. *P. glomerata* teve as taxas de transpiração e assimilação, a condutância estomática, a eficiência no uso da água e de carboxilação afetadas pelo zinco, não sendo afetadas pelo cobre. Conclui-se que as concentrações de cobre e zinco testadas não influenciam a capacidade citogenotóxica de *P. glomerata*, mas interferem em seu crescimento e desenvolvimento.

**Palavras-chave:** nutrição mineral, plantas medicinais, *Allium cepa*.



## ABSTRACT

### CYTOGENOTOXICITY, TOTAL PHENOLICS AND GROWTH OF *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN CULTIVATED UNDER COPPER AND ZINC CONCENTRATIONS

Author: Kássia Cauana Trapp  
Advisor: Solange Bosio Tedesco

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, a native medicinal species, possesses the ability to accumulate metals, which can alter its production of metabolites and consequently their medicinal capacity. The objective of this study was to evaluate the influence of zinc and copper concentrations on growth, root biometry and the photosynthetic process of *P. glomerata*, as well as its influence on the production of phenolic compounds and cytogenotoxicity of leaf and root extracts of this species. In vitro clonal propagation of a genotype of *P. glomerata* and the acquired explants used for greenhouse experimentation were carried out. Seven treatments were used, one consisting of culture with ideal nutrient solution (2  $\mu\text{M}$  of zinc and 0.5  $\mu\text{M}$  of copper), three in solutions with excessive levels of zinc (50, 75 and 100  $\mu\text{M}$ ) and three with excess of copper (20, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). Two collections were performed at 63 and 84 days after the beginning of the treatments. The second collection plants were also used for the analysis of photosynthetic parameters and root biometry, and the acquisition of fresh and dry matter mass. For the cytotoxicity test, dry leaves and roots of both collections were used and from this material 10g.L<sup>-1</sup> aqueous extracts were prepared using the *Allium cepa* test system. The Folin-Ciocalteu technique was used to determine total phenolics in extracts from the second collection. The data obtained were statistically analyzed using the Scott-Knott test at the 5% level of significance. Concentrations of zinc and copper did not directly influence the antiproliferative capacity of leaf extracts of *P. glomerata*. With respect to root preparations, the experiments showed variations, since roots treated with zinc presented antiproliferative capacity and the same does not occur for extracts prepared with the roots of plants grown under copper concentrations. Physiological age was not significant for cytotoxicity and the extracts were not genotoxic. For the concentration of phenolic compounds, a very high concentration (between 180.3 and 291.05 mg EAG\L<sup>-1</sup>) was observed in the leaf extracts, but was reduced by up to 20 times for both occasions in the root extracts. The analysis of root biometry was performed with 25% of the root system and it was noticed that copper and zinc interfered in the development of the roots, since at the levels of 50 and 75  $\mu\text{M}$  of zinc only the root diameter remained unchanged. Copper in turn reduced root length at all concentrations tested and the surface area at 40 and 60  $\mu\text{M}$ . The biomass production, mainly of the aerial part, was affected, mainly in levels of 75 and 100  $\mu\text{M}$  of zinc and 60  $\mu\text{M}$  of copper. *P. glomerata* had rates of transpiration and assimilation, stomatal conductance, water use efficiency and carboxylation affected by zinc, unaffected by copper. It is concluded that the copper and zinc concentrations tested do not influence the cytogenotoxicity capacity of *P. glomerata*, but interfere in its growth and development.

**Key words:** mineral nutrition, medicinal plants, *Allium cepa*.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1 – Fases da divisão celular encontradas durante análise dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) PEDERSEN pelo sistema teste *Allium cepa* L.....33

### ARTIGO 2

Figura 1 – Fases do ciclo celular encontradas durante análises pelo sistema teste *Allium cepa* L. de extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.....44

### ARTIGO 3

Figura 1 – Alterações visuais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivada com níveis de 100  $\mu$ M de zinco.....66

### ARTIGO 4

Figura 1 – Parâmetros fotossintéticos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas sob níveis de cobre.....86

Figura 2 – Alterações visuais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen decorrentes do excesso de cobre.....88

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Tratamentos utilizados para o teste de citogenotoxicidade <i>Allium cepa</i> L.....	31
Tabela 2 – Índice Mitótico (IM) e Genotóxico (IG) dos extratos de folhas e raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	32
Tabela 3 – Concentração de compostos fenólicos dos extratos de raízes e folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	32

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Tratamentos utilizados no bioensaio de <i>Allium cepa</i> L. para análise da citogenotoxicidade.....	40
Tabela 2 – Valores dos Índices Mitótico (IM) e Genotóxico (IG) dos extratos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen, cultivada sob níveis de cobre.....	42
Tabela 3 – Concentração de fenólicos totais.....	45

### ARTIGO 3

Tabela 1 – Parâmetros de crescimento de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivada sob concentrações de zinco.....	65
Tabela 2 – Biometria radicular de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivada sob concentrações de zinco.....	67
Tabela 3 – Parâmetros fotossintéticos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivada sob concentrações de zinco.....	67

### ARTIGO 4

Tabela 1 – Produção de fitomassa, altura e número de folhas de plantas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivadas sob níveis de cobre.....	85
Tabela 2 – Biometria radicular de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivada sob níveis de cobre.....	85

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 ARTIGO 1: Capacidade antiproliferativa e compostos fenólicos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivada sob concentrações de zinco</b> .....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAS E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	26
<b>3 ARTIGO 2: Citogenotoxicidade e Fenólicos Totais de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen, cultivada sob níveis de cobre</b> .....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAS E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	47
<b>4 ARTIGO 3: Parâmetros fotossintéticos e de crescimento de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen em cultivo com diferentes concentrações de zinco</b> .....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAS E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	61
<b>5 ARTIGO 4: Crescimento, biometria radicular e parâmetros fotossintéticos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen sob influência de concentrações de cobre</b> .....	68
INTRODUÇÃO.....	70
METODOLOGIA.....	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	80
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	89
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	94
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
<b>APÊNDICES</b> .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para a cura de enfermidades está muito presente na cultura do povo brasileiro. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, cerca de 60% da população ainda depende essencialmente das plantas para o tratamento de doenças. A grande diversidade vegetal brasileira possui um número extenso de espécies que podem ser utilizadas *in natura* ou na produção de fitoterápicos (BAGATINI et al., 2007). Porém, a maioria das plantas medicinais tem seu uso baseado principalmente em conhecimentos empíricos e estima-se que apenas 15 a 17% foram cientificamente estudadas, o que eleva os casos de toxicidade humana relacionada a seu uso (VEIGA JÚNIOR et al., 2005; SOARES et al., 2006).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, merece destaque *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae), popularmente conhecida como para-tudo ou ginseng brasileiro, devido a sua utilização em substituição ao ginseng coreano *Panax ginseng* C.A Meyer (ALVES et al., 2006; VIGO et al., 2004). A espécie caracteriza-se como erva a subarbusto, atingindo uma altura de até 3 m. Apresenta caule semiprostrado, raiz suculenta e folhas pilosas e com tricomas. Suas inflorescências são do tipo capituliforme ou espiga, com pedúnculo variando de 2 a 20 cm de comprimento, ovário ovalado-globoso e estigma capitado-bilobado. É uma espécie amplamente difundida no sul da América tropical e subtropical. No Brasil é encontrada em todas as regiões e distribuídas em praticamente todos os estados, estando presente principalmente em ambiente de mata ciliar, com solos arenosos, úmidos e altitudes variando dentre 80 a 800 m (MARCHIORETTO et al., 2010).

Quimicamente, *P. glomerata* apresenta como principais compostos em seus extratos o ácido glomérico (triterpenóide), ácido pfamérico (nortriterpenóide),  $\beta$ -ecdisona, rubesterona, ácido oleanólico e  $\beta$ -glucopiranosiloleanato (SHIOBARA et al. 1993). Tal composição explica as ações tônica, afrodisíaca, adaptógena (antiestresse), antioxidante, tranquilizante e anti-inflamatória da espécie (NETO et al. 2005; SOUZA et al. 2005; MARQUES et al. 2004; FREITAS et al. 2004; VIGO et al. 2004).

Essas características estão diretamente ligadas a composição química da espécie. Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo vegetal e importantes no processo de aclimação e na caracterização medicinal das espécies. Os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais representativos de metabólitos e possuem propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e estrogênica (TAIZ e ZEIGER, 2013). Sua produção está diretamente ligada ao ambiente de cultivo, assim

qualquer estímulo recebido pelo vegetal, tais como composição nutricional do solo, incidência de radiação UV e idade fisiológica, poderá alterar a rota de produção dos compostos orgânicos e com isso modificar a ação farmacológica da espécie (MORAIS, 2009), por isso a importância de se realizar testes para se determinar a influência do ambiente sob a ação medicinal das plantas.

Para tal, testes que utilizam organismos modelos como bioindicadores de toxicidade e mutagenicidade são essenciais para analisar os efeitos de plantas medicinais a nível celular. Um dos testes vegetal amplamente utilizado e validado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza o organismo modelo *Allium cepa* L. (cebola). Esse bioteste é capaz de indicar a presença de substâncias cito ou genotóxicas que possam influenciar o ciclo celular, seja alterando a proliferação celular ou levando ao surgimento de alterações cromossômicas (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O fato de *A. cepa* permanecer em contato direto com a substância a ser testada, faz com que apresente alta sensibilidade, somado a isso possui elevada correlação com testes animais, o tornando ideal para uma avaliação preliminar dos efeitos genotóxico e antiproliferativo de agentes poluidores e extratos medicinais (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012; BAGATINI et al., 2007). Este teste permite analisar de maneira rápida e com baixo custo, extratos da mesma espécie em diferentes concentrações ou ainda preparados com material proveniente de ambientes diverso.

Devido a esta grande diversidade de fatores que podem influenciar o desenvolvimento de plantas, como a contaminação por metais, sistemas de cultivo de espécies medicinais são importantes para que se garanta a qualidade do material genético utilizado, reduzindo também a possibilidade de perda da diversidade vegetal e os riscos causados aos seus consumidores (FIGUEIREDO et al., 2004). Nos últimos anos vem se tendo um aumento na utilização de insumos agrícolas, no crescimento industrial e urbano, na disposição incorreta de resíduos e na transformação química de rejeitos, o que leva a um desequilíbrio nutricional do solo podendo consequentemente levar a toxicidade de plantas (WUANA; OKIEIMEN, 2011). Pois, os metais, quando em excesso na solução de cultivo, podem ser acumulados de maneira diferenciada pelas plantas, alterando seu crescimento, desenvolvimento e produção de compostos orgânicos.

Várias pesquisas já demonstraram a influência de zinco (Zn) e cobre (Cu), ambos micronutrientes para as plantas, no desenvolvimento e crescimento de *P. glomerata*. O Zn é um metal versátil fundamental para diversos processos, sendo requerido no metabolismo de carboidratos, proteínas, síntese de RNA, ativação enzimática, multiplicação celular, além de

ser fundamental na biossíntese de clorofila, na estrutura de auxinas e na fertilidade do pólen (BROADLEY et al., 2007; PRADO, 2008). O Cu por sua vez é cofator de enzimas envolvidas na transferência de elétrons durante a fotossíntese, sendo também importante na respiração, metabolismo da parede celular, sinalização da transcrição, transporte de proteínas, fosforilação oxidativa e na mobilização de outros metais, como o ferro (BURKHEAD et al., 2009; MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2005).

Esses minerais são também essenciais a organismos animais e adquiridos basicamente por meio da dieta, sendo que o consumo de vegetais que acumularam metais pode causar danos também à saúde animal (SEMEDO, 2014).

Sendo assim, estudos que avaliem os efeitos de extratos obtidos através de plantas expostas a condições adversas, como o estresse por metais pesados, são necessários para considerar o seu uso sem que haja danos aos organismos. Bioensaios que demonstrem as possíveis capacidades genotóxica e antiproliferativa de *P. glomerata* ainda são escassos, indicando a necessidade de pesquisas que avaliem sua influência na promoção de alterações celulares. Além disso, faz-se necessário analisar se a idade ou órgãos da planta e o excesso de zinco e cobre alteram a composição dos metabólitos secundários influenciando o efeito de *P. glomerata* em sistema- teste vegetal.

Assim este estudo teve por objetivos avaliar a influência de concentrações de zinco e cobre, bem como idades fisiológicas e órgãos vegetais, na produção de compostos fenólicos e na citogenotoxicidade de *P. glomerata* (Artigos 1 e 2), além de analisar o efeito destes metais no crescimento, biometria radicular e parâmetros fotossintéticos da espécie (Artigos 3 e 4).

## 2 ARTIGO 1<sup>1</sup>

### Capacidade antiproliferativa e compostos fenólicos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)

#### Pedersen cultivada sob concentrações de zinco

#### RESUMO

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen é uma espécie medicinal de grande valor econômico que pode acumular metais como o zinco (Zn) em seus órgãos. Assim, este estudo objetivou avaliar a influência de concentrações de Zn na capacidade antiproliferativa e na concentração de compostos fenólicos de extratos de folhas e raízes de *P. glomerata*. Os explantes foram cultivados em vasos com areia sob influência de soluções nutritivas, diferindo nas concentrações de zinco (2, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ ) durante 63 e 84 dias. Suas folhas e raízes foram utilizadas para preparo de extratos a uma concentração de  $10\text{g.L}^{-1}$ , os quais foram submetidos no sistema teste *Allium cepa* L. Por meio da técnica de Folin-Ciocalteu foi determinada a concentração de compostos fenólicos totais. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Os resultados obtidos indicam que tanto extratos de folhas quanto de raízes possuem a capacidade antiproliferativa em *A. cepa* independente do nível de zinco aplicado e da idade fisiológica da planta, sendo que para as folhas essa capacidade é maior. Extratos de raízes possuem até 20 vezes menos compostos fenólicos que os extratos de folhas.

Palavras-chave: Índice mitótico, ginseng-brasileiro, plantas medicinais, nutrição mineral, metabólitos secundários.

<sup>1</sup>Artigo redigido conforme as normas dos Anais da Academia Brasileira de Ciências e submetido na sua versão em inglês



## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins terapêuticos surgiu com a humanidade e até hoje é amplamente empregada para a cura de enfermidades, sendo o chá a segunda bebida mais consumida no mundo (Badke 2011; Lopes et al. 2010). A maioria destas plantas é utilizada com base no conhecimento popular, pois apenas 15 a 17% destas foram estudadas cientificamente e tiveram sua qualidade, segurança e eficácia comprovadas, fazendo-se assim necessário aumentar e melhorar os conhecimentos acerca das plantas medicinais (Calixto 2005; Soares et al. 2006).

A atividade medicinal dos vegetais está ligada à sua composição química. Os metabólitos secundários são substâncias orgânicas produzidas pela planta e que aparentemente não influenciam de maneira direta o crescimento e desenvolvimento das espécies, mas auxiliam em sua defesa, sendo fundamentais para o processo de aclimação da planta. Os compostos fenólicos formam um dos grupos de metabólitos mais representativos no reino vegetal, sendo um dos mais importantes para determinação da capacidade medicinal das plantas, pois possuem propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e atividade estrogênica (Taiz; Zeiger 2013; Tomás-Barberán; Espín 2001).

Os estímulos recebidos pelas plantas podem adulterar a rota de produção dos seus constituintes químicos e conseqüentemente modificar suas atividades medicinais, sendo que dentre os principais aspectos que influenciam esta produção destaca-se a idade da planta, órgão utilizado, incidência de radiação UV e composição nutricional do solo, por isso a importância de se caracterizar a composição química das plantas medicinais e se determinar sistemas de cultivo das mesmas (Kutchan 2001; Morais 2009). A técnica de Folin-Ciocalteu vem sendo utilizada há anos para se determinar a concentração de compostos fenólicos de

extratos podendo ser utilizada para se observar a influência das condições de cultivo na produção destes compostos.

O zinco (Zn) é essencial para o desenvolvimento e crescimento de plantas e animais e por se tratar de um metal versátil tanto química quanto fisicamente é fundamental em diversos processos relacionados ao desenvolvimento e crescimento (Borges et al. 2016).

No organismo animal, o Zn participa de mais de 300 reações de síntese e degradação de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, influenciando a proliferação e maturação das células de defesa, dentre outras funções em processos fisiológicos (Cozzolino 2009; Cruz; Soares 2011; Borges et al. 2016).

Em vegetais o Zn é essencial para o metabolismo de carboidratos, proteínas, síntese de RNA, ativação enzimática, multiplicação celular, além de ser fundamental na biossíntese de clorofila, na estrutura de auxinas e na fertilidade do pólen (Broadley et al. 2007; Prado 2008). Devido ao aumento de sua disponibilidade, o Zn pode ser acumulado e influenciar no metabolismo primário e secundário das plantas, influenciando a atividade mitótica, pois participa dos fatores que controlam a multiplicação e diferenciação celular (Broadley et al. 2007; Rout; Das 2003; Lin et al. 2005).

Algumas plantas medicinais tais como as do gênero *Pfaffia*, podem absorver e armazenar o excesso de Zn, fazendo com que a toxicidade resultante do uso de plantas medicinais contaminadas com agrotóxicos, microrganismos e metais pesados tenha se tornado um problema na saúde pública (Carmo 2007; Bernardy 2015, dados não publicados).

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae), é uma das espécies mais representativas do gênero *Pfaffia*, popularmente conhecida como para-tudo ou ginseng-brasileiro, é nativa do Brasil e amplamente empregada em substituição ao ginseng coreano *Panax ginseng* C.A. Meyer (Souza; Lorenzi 2005, Vigo et al. 2004). Seus extratos são caracterizados medicinalmente por apresentarem ações tônica, afrodisíaca, adaptógena

(antiestresse), antioxidante, tranquilizante e anti-inflamatória (Neto et al. 2005; Souza et al. 2005; Marques et al. 2004; Freitas et al. 2004; Vigo et al. 2004). Porém alguns efeitos adversos, tais como hipertensão, insônia, efeito estrogênico, nervosismo e diarreia, já foram relatadas para o uso contínuo desses extratos, fazendo-se assim necessários estudos que avaliem uma possível ação citogenotóxica dos extratos de *P. glomerata* (Rates; Gosmann, 2002).

O sistema teste *Allium cepa*, serve como bioindicador da presença de substâncias cito ou genotóxicas que possuem a capacidade de influenciar a proliferação celular e causar alterações cromossômicas, sendo utilizado para análise de poluição ambiental e também dos efeitos de extratos de plantas medicinais (Bagatini et al. 2009; Leme; Marin-Morales 2009, Fachinetto; Tedesco 2009; Dalla Nora et al. 2010; Tedesco; Laughinghouse IV 2012). Este sistema teste é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ) e o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), sendo considerado um excelente modelo *in vivo*, pelo fato das raízes de *A. cepa* permanecerem em contato direto com as substâncias analisadas e em constante divisão celular, sendo assim possível avaliar o efeito direto das substâncias no ciclo celular (Bagatini et al. 2007; Vicentini et al. 2001).

Dessa forma, o teste possibilita a verificação dos possíveis efeitos de extratos medicinais sobre células de eucariotos. Seus resultados apresentam ampla correlação com ensaios realizados em animais, servindo como base para testes mais específicos em mamíferos (Tedesco; Laughinghouse IV 2012; Herrero et al. 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi examinar a capacidade antiproliferativa, por meio do teste *A. cepa*, de extratos preparados a partir de folhas e raízes de *P. glomerata*, cultivadas sob concentrações de zinco e em diferentes idades fisiológicas, e também determinar a concentração de fenólicos totais destes extratos por meio da técnica de Folin-Ciocalteu.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a propagação vegetativa clonal *in vitro* de *Pfaffia glomerata* para a obtenção das mudas a serem utilizadas no experimento. O genótipo caracterizado como GD, faz parte da coleção de plantas medicinais da Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), e sua exsicata está depositada no Herbário DDMS, número 1951. A propagação foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e seguiu protocolo estabelecido por Nicoloso et al. (2001).

Foram propagados segmentos nodais de um (1) cm de comprimento, que permaneceram em tubos de ensaio que possuíam 10 mL de meio MS normal (Murashige; Skoog 1962), suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol durante 21 dias. O crescimento se deu em câmara climatizada a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas. Este processo foi repetido até se obter o número necessário de mudas com tamanho uniforme.

Posteriormente estas mudas foram transplantadas para vasos de capacidade de 5 litros, forrados com plástico, que possuíam 5 Kg de areia previamente lavada e peneirada, mantidos em casa de vegetação. Foi realizada a pesagem dos vasos com a areia seca e com seu saturamento hídrico para que se estabelecesse o peso correspondente à condição de 70% de umidade, utilizada para o cultivo de *P. glomerata* neste experimento. Diariamente os vasos eram pesados e complementados com o tratamento correspondente até atingir o peso que equivalesse à condição proposta. Durante os primeiros sete dias, as plantas passaram pelo período de aclimação, onde foram cultivadas em solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950) modificada.

Após a primeira semana, as plantas passaram para seus respectivos tratamentos, sendo que cada grupo experimental constou de oito plantas. Os tratamentos utilizados foram soluções nutritivas com diferentes concentrações de zinco: padrão (2), 50; 75 e 100  $\mu\text{M}$ . Foram realizadas duas coletas, a primeira aos 63 dias após o início dos tratamentos e a segunda após 84 dias. Em cada coleta, metade das plantas foi retirada e armazenada em estufa a uma temperatura de 65°C para secagem.

Após secas, tanto as folhas quanto as raízes foram utilizadas para preparação de extratos aquosos utilizados para o teste de citogenotoxicidade de *A. cepa*, realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (UFSM). Para o teste de *A. cepa* foram utilizados bulbos adquiridos em feira, os mesmos tiveram seu sistema radicular antigo raspado e foram colocados para novo enraizamento em copos descartáveis contendo água destilada, onde permaneceram durante quatro dias. Aqueles com bom enraizamento foram utilizados para se testar a citogenotoxicidade dos extratos preparados na forma de infusão das folhas e decocção das raízes, ambos em concentração de 10g.L<sup>-1</sup> e por um período de 10 minutos, que constaram nos tratamentos analisados (Tabela 1). Água destilada foi utilizada como controle negativo e solução de glifosato a 1% como controle positivo.

Grupos de três repetições (bulbos) foram utilizados para cada tratamento. Estes permaneceram em contato com os extratos e controles por 24 horas, quando tiveram suas raízes seccionadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), também por 24 horas, e posteriormente foram armazenadas em etanol 70% sob refrigeração, até sua utilização na confecção de lâminas.

Para cada repetição foram confeccionadas duas lâminas, para tal as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl 1N) durante cinco minutos, em seguida lavadas em água destilada e tiveram sua região meristemática destacada. Esta foi corada com orceína acética 2% e esmagada com auxílio de bastão de vidro, conforme técnica adaptada de Guerra

e Souza (2002). Em cada lâmina foram analisadas 500 células ao microscópio óptico com aumento de 40X, levando-se em consideração o estágio do ciclo celular e o aparecimento de alterações celulares. Os resultados encontrados foram utilizados para o cálculo do índice de proliferação celular, conhecido como índice mitótico (IM), que se dá pela razão entre o número de células que se encontravam em divisão celular e o número total de células analisadas e o cálculo de alterações celulares (IG), adquirido pela razão entre o número de células com algum tipo de alteração e o número de células analisadas.

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais foi realizada pela técnica de Folin-Ciocalteu, adaptada por Singleton & Rossi (1965). As leituras das amostras foram realizadas em  $\lambda=765\text{nm}$ , após um período de reação no escuro de duas horas. A curva de calibração foi confeccionada com uma solução de ácido gálico no intervalo de 0 a 100 mg. L<sup>-1</sup>. Os extratos de folhas foram diluídos em 1:5 (extrato: água destilada) enquanto que os de raiz foram utilizados em 100% de sua concentração. Para essa análise foram utilizados apenas os extratos preparados a partir do material da segunda coleta.

Os resultados obtidos no teste de *A. cepa* e no teste de Folin-Ciocalteu foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com probabilidade de erro de 5%, utilizando o programa Sisvar.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O teste de *A. cepa* foi utilizado para determinar a influência do excesso de zinco durante o cultivo de *P. glomerata*, na capacidade antiproliferativa e genotóxica desta espécie. Os resultados deste trabalho demonstraram que tanto os extratos preparados com as folhas quanto os com raízes reduziram a capacidade proliferativa de *A. cepa* em comparação ao controle negativo em água destilada (10,00%), (Tabela 2). A partir dos dados obtidos

observou-se que, com exceção dos extratos de decocção na concentração de  $10\text{g.L}^{-1}$  obtidos com raízes tratadas com solução nutritiva de  $50\ \mu\text{M Zn}$  (4,63% e 6,90%, respectivamente), os demais não apresentaram diferenças nos índices mitóticos em relação às coletas.

A capacidade antiproliferativa não foi dependente do nível de Zn utilizado e de modo geral foi superior em extratos preparados com folhas. Apenas a decocção preparada com raízes tratadas com  $75\ \mu\text{M}$  de Zn de ambas as coletas (4,60 e 4,70%) e raízes de  $50\ \mu\text{M Zn}$  apenas da primeira coleta (4,63%) reduziram a proliferação celular tanto quanto as folhas. Analisando extratos preparados por diferentes órgãos da planta, Frescura et al. (2012) e Sousa e Bailão (2015) concluíram que ao se utilizar folha e casca de *Luehea divaricata* Mart & Zucc., ou folhas e colmos de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, respectivamente, não ocorreram diferenças significativas na capacidade proliferativa em relação ao órgão utilizado, sendo que todos reduziram o índice mitótico de maneira semelhante, diferente do que ocorre para *P. glomerata*.

Rossato et al. 2010, ao analisarem a capacidade antiproliferativa de extratos de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, observaram que esta capacidade é dependente da origem das folhas. Isso ocorre porque vários fatores, dentre eles a composição do solo e a idade da planta, podem alterar a composição e concentração dos metabólitos secundários, o que poderá afetar seu potencial medicinal (Gobbo-Neto; Lopes 2007). O mesmo não ocorre para *P. glomerata*, pois as variações no cultivo da espécie não alteraram sua capacidade antiproliferativa.

Nas análises dos extratos de *P. glomerata*, apesar da capacidade antiproliferativa, todas as fases do ciclo celular (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) foram encontradas nos tratamentos (Figura 1).

Nenhum dos extratos preparados com folhas ou raízes secas de *P. glomerata*, apresentaram potencial genotóxico, pois a porcentagem de células com alterações celulares

não diferiu daquelas encontradas para a água (0,06%), mas diferiram do controle positivo em glifosato 1% (1,03%). Expressando assim que a espécie não possui capacidade mutagênica e que as concentrações de zinco utilizadas durante o cultivo da espécie, não influenciaram no aparecimento de aberrações cromossômicas. A alteração encontrada no controle negativo é devido ao cultivo do organismo teste, pois para este estudo foi utilizada água destilada.

Espécies como *Pterocaulon polystachyum* DC., *Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., também foram avaliadas por meio do teste de *A. cepa*, e diferente de *P. glomerata*, apresentam capacidade genotóxica, pois causaram o aumento no número de células com aberrações (Knoll et al. 2006; Fachinetto; Tedesco 2009).

Pesquisas realizadas por Fachinetto et al. (2007) e Dias et al. (2014), evidenciaram a capacidade antiproliferativa das espécies *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC e *Mikania cordifolia* (L.f.) Willd, respectivamente, tal como ocorre com *P. glomerata*. Sendo que os extratos de *A. satureioides* foram preparados com material seco e fresco e no que diz respeito ao estudo com *M. cordifolia*, utilizou-se material proveniente de duas populações, demonstrando que os métodos de secagem e condições de cultivo não influenciaram a capacidade antiproliferativa e genotóxica dessas espécies, assim como ocorre com a espécie *P. glomerata*.

Portanto, para se garantir o uso seguro dos recursos naturais, é necessário que se tenha uma padronização destes e para tal fazem-se necessários estudos que avaliem a influência do ambiente e armazenamento na composição química da matéria-prima vegetal (Vigo et al. 2004).

Em relação aos resultados obtidos pela técnica de Folin-Ciocalteu, a concentração de fenólicos totais foi dependente da concentração no caso de folhas, sendo que todos os tratamentos diferiram estatisticamente (Tabela 3). Os extratos preparados com folhas obtidas de plantas cultivadas em solução nutritiva com 75 µM Zn foram as que apresentaram maior



valor (291,05 mg EAG/L), este tratamento também foi o responsável pela maior capacidade antiproliferativa vista no teste *A. cepa*. Para os extratos preparados a partir do sistema radicular da planta não houve variação significativa entre os tratamentos de zinco utilizadas durante o experimento, sendo que para estes extratos a concentração de fenólicos foi reduzida em até 20 vezes (13,64 mg EAG/L).

Os compostos fenólicos são importantes à saúde humana devido a suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, principalmente no que diz respeito à capacidade antioxidante e na quelação de metais (Sousa et al. 2007), e sua produção está diretamente relacionada ao ambiente de cultivo da planta. Vicentini et al. (2001) e Teixeira et al. (2003) demonstraram em estudos anteriores que as variações no modo de cultivo da planta levam ao aparecimento de diferenças na quantidade de metabólitos produzida.

Abrahão et al. (2010) demonstraram a variação de fenóis totais em cafés provenientes de dois ambientes distintos. E, Vizzotto et al. (2012) ratificaram as diferenças entre genótipos de amoreira-preta, ressaltando a importância do fator ambiente na produção de metabólitos secundários (Oliveira et al. 2009).

Outros estudos com chás de espécies como *Solidago microglossa* DC, *Pterocaulon polystachyum* DC e *A. satyroides*, indicaram que a capacidade de reduzir a proliferação celular sem causar mutagenicidade é decorrente da presença dos compostos fenólicos (Bagatini et al. 2009; Knoll et al. 2006; Fachinetti et al. 2007). A inibição da divisão celular é importante para o processo de anti-envelhecimento, sendo assim, os extratos citados acima e de *P. glomerata*, poderiam ser utilizados para esse fim. Ainda, segundo Tomás-Barberán e Espín (2001,) o grupo de fenólicos está relacionado à prevenção de doenças cardiovasculares e câncer, indicando que, devido à alta concentração desses compostos nos extratos de folhas de *P. glomerata*, estes poderiam ser utilizados para o tratamento e prevenção dessas doenças,

porém estudos mais específicos são necessários para se indicar de maneira segura estes extratos.

Para os vegetais os compostos fenólicos agem especialmente na proteção contra patógenos, sendo produzidos principalmente em situações estressantes. Eles são definidos quimicamente como substâncias que possuem em sua estrutura um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (Lee et al. 2005). Dentre os mais de cinco mil fenóis existentes destacam-se por sua importância medicinal os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (Tomás- Barberán e Espín 2001).

Para *P. glomerata*, os principais constituintes químicos já isolados e estudados foram as saponinas triterpênicas e ecdisteróides, sobretudo como o ácido glomérico, ácido oleanólico, ácido pfamérico, rubresterona e ecdisterona (Shiobara et al. 1993).

Os metabólitos secundários estão distribuídos de maneira desigual entre os órgãos das plantas, sendo assim, o efeito dos extratos varia de acordo com a parte da planta que será utilizada para a preparação do extrato. *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. apresentou quatro vezes mais flavonoides totais nas folhas do que em seu caule (Barni, Filho e Couto 2009). No caso de *P. glomerata*, a diferença entre a maior concentração de fenóis em folhas e a menor encontrada nos extratos de raízes, demonstrou uma redução de 20 vezes (291,05 e 13,64 mg EAG/L, respectivamente).

Verificou-se neste estudo que os extratos preparados a partir de folhas e raízes secas de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas com concentrações diferentes de zinco apresentam capacidade antiproliferativa, a qual, de maneira geral, não foi dependente do nível de Zn ou da idade fisiológica da planta.

Existe variação na capacidade antiproliferativa dependendo do órgão utilizado e os extratos das folhas apresentam maior capacidade de reduzir a proliferação celular em *Allium cepa*. Esses extratos também foram os que apresentaram maior concentração de compostos

fenólicos na análise pela técnica de Folin-Ciocalteu, assim esses compostos poderiam ser os responsáveis pela capacidade antiproliferativa de *P. glomerata*.

Conclui-se que extratos de *P. glomerata* apresentam capacidade antiproliferativa independente da concentração de zinco aplicada durante seu cultivo e o tempo em que permanece sob essa condição. Há variação na capacidade de acordo com o órgão utilizado para o preparo dos extratos. Os mesmos não apresentam capacidade genotóxica podendo assim, serem utilizados na preparação de fitoterápicos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria-Santa Maria\RS e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia pela formação acadêmica proporcionada e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO SA, PEREIRA RGFA, DUARTE SMS, LIMA, AR, ALVARENGA DJ AND FERREIRA EB. 2010. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia* 34:414-420.
- BADKE MR, BUDÓ MLD, SILVA FM AND RESSEL LB. 2011. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery* 15(1): 132-139.
- BAGATINI MD, FACHINETTO JM, SILVA ACF AND TEDESCO SB. 2009. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19: 632-636.
- BAGATINI MD, SILVA ACF AND TEDESCO SB. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 444-447.

- BARNI ST, FILHO VC AND COUTO AG. 2009. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19: 865-870.
- BERNARDY, K. Efeito do Zinco em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN. 2015. 96p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- BORGES IS, DIAS JMG, ZUQUE FTS AND ZUQUE MAS. 2016. Função do Mineral Zinco no Organismo humano. *Revista Conexão Eletrônica* 12: 169-177.
- BROADLEY MR, WHITE PJ, HAMMOND JP, ZELKO I AND LUZ A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173(4): 677-702.
- CALIXTO JB. 2005. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (1-2): 131-134.
- CARMO, E. D. Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pede de camundongos *Hairless*. 2007. 109 p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2007.
- COZZOLINO SMF. 2009. Biodisponibilidade de Nutrientes. 3.ed. atual. e ampl., São Paulo: Manole, 1172p.
- CRUZ JBF AND SOARES HF. 2011. UMA REVISÃO SOBRE O ZINCO. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* 15(1): 207-222.
- DALLA-NORA G, PASTORI T, LAUGHINHOUSE IV HD, CANTO-DOROW TS AND TEDESCO SB. 2010. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell*, 34: 85-101.
- DIAS MG, CANTO-DOROW TS, COELHO APD AND TEDESCO SB. 2014. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16(2): 202-208.
- FACHINETTO JM AND TEDESCO SB. 2009. 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 Mediciniais* 11: 360-367.
- FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON J, SILVA ACF AND TEDESCO SB. 2007. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 49-54.
- FREITAS CS, BAGGIO CH, SILVA-SANTOS JE, RIECK L, SANTOS CAD, JUNIOR CC, MING LC, CORTEZ DAG AND MARQUES MCA. 2004. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sciences* 74(9): 1167-1179.

- FRESCURA VDS, LAUGHINGHOUSE IV DH AND TEDESCO SB. 2012. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* 65(1): 27-33.
- GOBBO-NETO L AND LOPES NP. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30(2): 374-381.
- GUERRA M AND SOUZA MJ. 2002. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- HERRERO O, PEREZ JMM, FERNÁNDEZ PF, CARVAJAL LL, PEROPADRE A AND HAZEN ML. 2012. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research* 743: 20-24.
- HOAGLAND DR AND ARNON DI. 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.
- KNOLL MF, SILVA ACF, CANTO-DOROW TS AND TEDESCO SB. 2006. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genetics and Molecular Biology* 29 (3): 539-542.
- KUTCHAN TM. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125: 58-60.
- LEE SJ, UMANO K, SHIBAMOTO T AND LEE KG. 2005. Identification of volatile components in basil *Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91(1): 131-137.
- LEME DM AND MARIN-MORALES MA. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research* 682: 71-81.
- LOPES GAD, FELICIANO LM, DINIZ RES AND ALVES MJQF. 2010. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). *Revista Ciência em Extensão* 6(2): 143-155.
- LIN C, CHANG H AND HUANG H. 2005. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 963-968.
- MARQUES LC, GALVÃO SMP, ESPÍNOLA E, DIAS RF, MATTEI R, OLIVEIRA MGM AND CARLINI ELA. 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extractBNT-08) in rodents. *Phytotherapy Research* 18(7): 566-572.
- MORAIS LAS. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27: 4050-4063.
- MURASHIGE T AND SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

NETO, A. G. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Ethnopharmacology*, v.96, p. 87-91, 2005.

NICOLOSO FT, ERIG AC, MARTINS CF AND RUSSOWSKI DM. 2001. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3(2): 11-18.

PRADO RM. 2008. *Nutrição de Plantas*, São Paulo: Editora Unesp, 407p.

OLIVEIRA AC, VALENTIM B, GOULART MOF, SILVA IC, BECHARA EJH AND TREVISAN MTS. 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* 32(3): 689-702.

RATES, S.M.K. AND GOSMANN, G. 2002. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. *Revista Brasileira Farmacognosia* 12(2): 85-93.

ROSSATO LV, TEDESCO SB, LAUGHINGHOUSE IV DH, FARIAS JG AND NICOLOSO FT. 2010. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82(4): 857-860.

ROUT GR AND DAS P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: Zinc. *Agronomie* 23(1): 3-11.

SHIOBARA Y, INOUE S AND KATO K. 1993. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 32(6):1527-1530.

SINGLETON VL AND ROSSI JA. 1965. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, DAVIS, GIUSTI MM AND WROLASTAD RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13, 2001. v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES AKA, CARMO GC, QUENTAL DP, NASCIMENTO DF, BEZERRA FAF, MORAES MO AND MORAES MEA. 2006. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 447-454.

SOUSA CMM et al. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* 30:3521-355.

SOUSA WC AND BAILÃO EFLC. 2015. Avaliação cito/genotóxica de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe através do teste de *Allium cepa*. *Anais do II congresso de ensino pesquisa e extensão da UEG, Campus Pinenópolis, Goiás*.

SOUZA DJFS, ALVES KZ, DA SILVA-JACQUES DS, SILVA E SOUZA PVS, CARVALHO MG, FREIRE RB, FERREIRA DT AND FREIRE MFI. 2005. Free radical

scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). Indian Journal of Pharmacology 37 (3): 174-78.

SOUZA VC AND LORENZI H. 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

TAIZ L AND ZEIGER E. 2013. Fisiologia Vegetal, 5<sup>th</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 918 p.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. 2012. Bioindicador of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. Environmental Contamination, Ed. Srivastava J.

TEIXEIRA RO, CAMPAROTO ML, MANTOVANI MS AND VICENTINI VEP. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in *in vivo* assays. Genetics and Molecular Biology 26(4): 551-555.

TOMÁS-BARBERÁN FA AND ESPÍN JC. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture 81(9): 853-876.

VICENTINI VEP, CAMPAROTO ML, TEIXEIRA RO AND MANTOVANI MS. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. Acta Scientiarum 23: 593-598.

VIGO CLS, NARITA E AND MARQUES LC. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 6(2): 7-19.

VIZZOTO M, RASEIRA MCB, PEREIRA MC AND FETTER MR. 2012. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). Revista Brasileira de Fruticultura 34(3): 853-858.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para o teste de citogenotoxicidade *Allium cepa* L.

<b>TRATAMENTOS</b>
T1- Controle negativo (água destilada)
T2- Controle positivo (glifosato 1%)
T3- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1
T4- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2
T5- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 50 µM Zn, coleta 1
T6- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 50 µM Zn, coleta 2
T7- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 75 µM Zn, coleta 1
T8- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 75 µM Zn, coleta 2
T9- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 100 µM Zn, coleta 1
T10- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 100 µM Zn, coleta 2
T11- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1
T12- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2
T13- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 50 µM Zn, coleta 1
T14- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 50 µM Zn, coleta 2
T15- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 75 µM Zn, coleta 1
T16- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 75 µM Zn, coleta 2
T17- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 100 µM Zn, coleta 1
T18- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 100 µM Zn, coleta 2



Tabela 2. Índice Mitótico (IM) e Genotóxico (IG) dos extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.

Tratamento	IM	IG
1-controle negativo	10,00 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>
2-controle positivo	2,87 <sup>c</sup>	1,03 <sup>a</sup>
T3- Infusão, solução padrão, coleta 1	2,60 <sup>c</sup>	0,10 <sup>b</sup>
T4- Infusão, solução padrão, coleta 2	4,73 <sup>c</sup>	0,30 <sup>b</sup>
T5- Infusão, 50 µM Zn, coleta 1	4,43 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>
T6- Infusão, 50 µM Zn, coleta 2	4,76 <sup>c</sup>	0,13 <sup>b</sup>
T7- Infusão, 75 µM Zn, coleta 1	3,40 <sup>c</sup>	0,20 <sup>b</sup>
T8- Infusão, 75 µM Zn, coleta 2	1,23 <sup>c</sup>	0,00 <sup>b</sup>
T9- Infusão, 100 µM Zn, coleta 1	3,40 <sup>c</sup>	0,30 <sup>b</sup>
T10- Infusão, 100 µM Zn, coleta 2	4,00 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>
T11-Decocção, solução padrão, coleta 1	5,73 <sup>b</sup>	0,30 <sup>b</sup>
T12-Decocção, solução padrão, coleta 2	6,23 <sup>b</sup>	0,27 <sup>b</sup>
T13- Decocção, 50 µM Zn, coleta 1	4,63 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>
T14- Decocção, 50 µM Zn, coleta 2	6,90 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>
T15- Decocção, 75 µM Zn, coleta 1	4,60 <sup>c</sup>	0,13 <sup>b</sup>
T16- Decocção, 75 µM Zn, coleta 2	4,70 <sup>c</sup>	0,13 <sup>b</sup>
T17- Decocção, 100 µM Zn, coleta 1	6,30 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>
T18- Decocção, 100 µM Zn, coleta 2	5,70 <sup>b</sup>	0,27 <sup>b</sup>
Média	4,79	0,25
CV <sup>1</sup> (%)	32,32	82,75

<sup>1</sup> Coeficiente de variação. \* Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3. Concentração de compostos fenólicos dos extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.

Tratamentos	Concentração de compostos fenólicos (mg EAG/L) <sup>1</sup>
Infusão das folhas, solução padrão	279,56 <sup>b</sup>
Infusão das folhas, solução 50 µM Zn	237,87 <sup>d</sup>
Infusão das folhas, solução 75 µM Zn	291,05 <sup>a</sup>
Infusão das folhas, solução 100 µM Zn	254,10 <sup>c</sup>
Decocção das raízes, solução padrão	17,20 <sup>e</sup>
Decocção das raízes, solução 50 µM Zn	17,05 <sup>e</sup>
Decocção das raízes, solução 75 µM Zn	21,75 <sup>e</sup>
Decocção das raízes, solução 100 µM Zn	13,64 <sup>e</sup>
Média	141,53
CV <sup>2</sup>	4,53

<sup>1</sup> miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro. <sup>2</sup> Coeficiente de variação. \* Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

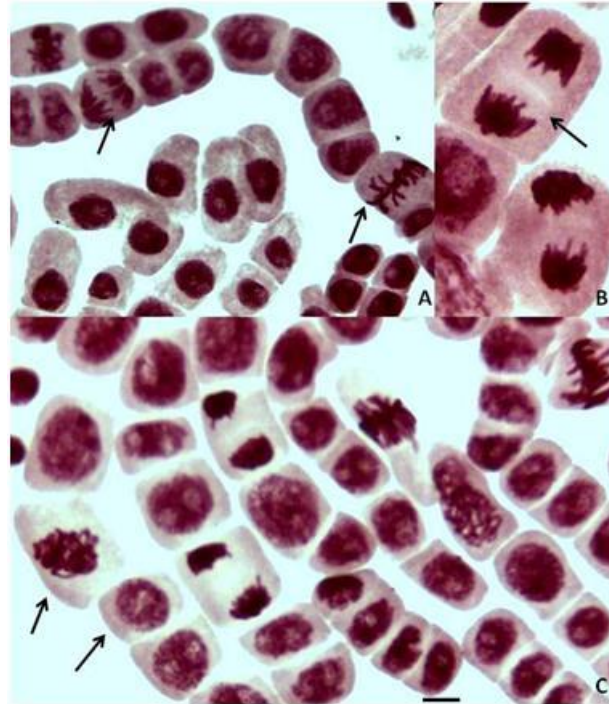


Figura 1. Fases da divisão celular encontradas durante análise dos extratos pelo sistema teste *Allium cepa*. A – seta superior indicando anáfase e inferior metáfase; B - seta indicando telófase; C - seta menor indicando prófase e maior intérfase. Escala de 10  $\mu\text{m}$ .

### 3 ARTIGO 2<sup>1</sup>

#### **Citogenotoxicidade e fenólicos totais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, cultivada sob níveis de cobre.**

**RESUMO:** Metabólitos secundários produzidos pelas plantas são os principais responsáveis por suas ações medicinais, sendo sua produção diretamente relacionada ao ambiente de cultivo. Assim condições estressantes, tais como variações nutricionais, podem afetar a capacidade medicinal das espécies. Objetivou-se verificar a citogenotoxicidade dos extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata*, cultivada sob concentrações de cobre, em duas épocas de coleta, pelo sistema teste *Allium cepa*, e a influência destes fatores na quantidade de fenólicos totais destes extratos. Mudanças de *P. glomerata* foram adquiridas a partir da propagação *in vitro*, posteriormente cultivadas em vasos com areia onde cada tratamento recebeu soluções nutritivas com diferentes concentrações de cobre (0,5; 20; 40 e 60  $\mu\text{M}$ ). Após 63 e 84 dias as plantas foram coletadas e secadas em estufa para serem utilizadas na preparação dos extratos. Os mesmos foram preparados na concentração de 10g.L<sup>-1</sup> e empregados no teste *A. cepa* para análise da citogenotoxicidade e na técnica de Folin-Ciocalteu para determinação de fenóis totais. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%. Os resultados indicaram que extratos preparados com folhas de *P. glomerata* apresentam capacidade antiroliferativa independente da idade fisiológica da planta ou da concentração de cobre empregada no cultivo, além de apresentarem uma concentração de fenóis 16 vezes maior que extratos de raízes. Ambos não são genotóxicos, pois não induziram o aparecimento de alterações celulares ou cromossômicas. Conclui-se que os extratos de folhas de *P. glomerata* não alteraram a citogenotoxicidade devido a diferenças no cultivo.

**Palavras-chave:** extratos medicinais, metabólitos secundários, antiproliferativo, *Allium cepa*, ginseng-brasileiro.

**ABSTRACT:** Cytogenotoxicity and total phenolics of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, grown under levels of copper. Secondary metabolites produced by plants are the main ones responsible for their medicinal actions, and their production is directly related to the growing environment. Thus stressful conditions, such as nutritional variations, can affect the medicinal capacity of the species. The objective of this study was to verify the cytogenotoxicity of leaf and root extracts of *Pfaffia glomerata* grown under copper concentrations at two collection times by the *Allium cepa* test system and the influence of these factors on the total phenolic amount of these extracts. *P. glomerata* seedlings were obtained from *in vitro* propagation, later grown in pots with sand, where each treatment received nutrient solutions with different concentrations of copper (0.5, 20, 40 and 60  $\mu\text{M}$ ). After 63 and 84 days the plants were collected and dried in an oven to be used in the preparation of the extracts. They were prepared at the concentration of 10g.L<sup>-1</sup> and used in the *A. cepa* test for analysis of cytogenotoxicity and in the technique of Folin-Ciocalteu for determination of total phenols. Data were submitted to statistical analysis by the Scott-Knott test with a significance level of 5%. The results indicated

<sup>1</sup>Artigo Redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Plantas Medicinais

that extracts prepared with leaves of *P. glomerata* have antiroliferative capacity independent of the physiological age of the plant or the concentration of copper used in the cultivation, besides presenting a concentration of phenols 16 times higher than root extracts. Both are not genotoxic because they did not induce the appearance of cellular or chromosomal alterations. It is concluded that leaf extracts of *P. glomerata* did not alter cytogenotoxicity due to differences in culture.

**Key words:** medicinal extracts, secondary metabolites, antiproliferative, *Allium cepa*, brazilian-ginseng.

## INTRODUÇÃO

A família Amaranthaceae é representada na diversidade nativa brasileira, por 196 espécies, com destaque o gênero *Pfaffia* (Fank-de-Carvalho et al. 2012). A espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, popularmente conhecida como fáfia, ginseng-brasileiro ou para-tudo, é uma das mais importantes deste gênero devido a sua utilização na medicina popular e produção de fitoterápicos (Souza; Lorenzi 2005). *P. glomerata* é utilizada em substituição ao ginseng coreano *Panax ginseng* C.A. Meyer, uma das espécies mais consumidas mundialmente o que tem aumentado seu extrativismo. Estima-se que, entre janeiro e maio de 2012, duas toneladas das raízes de *P. glomerata* foram exportadas pelo Brasil (Alves et al. 2006; Oliveira 2012).

Os extratos de *P. glomerata* preparados a partir do sistema radicular da planta são caracterizados por suas ações tônica, afrodisíaca, adaptógena (antiestresse), antioxidante, tranquilizante e anti-inflamatória, sendo ainda utilizados no tratamento da diabetes, doenças reumáticas e lapsos de memória (Neto et al. 2005; Souza et al. 2005; Marques et al. 2004; Freitas et al. 2004; Vigo et al. 2004). Tais características são explicadas pela composição química destes extratos que apresentam ácido glomérico (triterpenóide), ácido pfamérico (nortriterpenóide),  $\beta$ -ecdisona, rubesterona, ácido oleanólico e  $\beta$ -glucopiranosiloleanato (Shiobara et al. 1993).

Apesar de não consumidos com frequência, os extratos preparados com as folhas também já foram caracterizados quanto ao seu potencial medicinal, apresentando a capacidade de reduzir lesões ulcerogênicas sem causar danos toxicológicos aos animais (Mazzeo 2015).

Ainda que seu consumo traga inúmeros benefícios, a utilização de extratos de *P. glomerata* já demonstrou alguns efeitos adversos, tais como, hipertensão, insônia, efeito estrogênico, nervosismo e diarreia (Rates & Gosmann 2002). Por isso, há a necessidade de estudos que caracterizem de maneira mais precisa os efeitos citotóxicos das plantas medicinais em organismos testes, a fim de reduzir a possibilidade de intoxicações.

A citogenotoxicidade de um extrato pode ser medida pela alteração no índice mitótico ou pela incidência de alterações cromossômicas (Mahmood et al. 2012). Bioensaios vegetais são ideais para uma primeira análise de possíveis ações tóxicas de substâncias, destacando-se o sistema teste *Allium cepa* L., o qual permite a avaliação destes parâmetros simultaneamente (Leme; Marin-Morales 2009; Oliveira et al. 2012; Onyemaobi et al. 2012). Este bioensaio apresenta ainda grande correlação com testes animais, sendo validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (PNUMA) (Vicentini et al. 2001; Bagatini et al. 2007).

As substâncias presentes nos chás como os compostos fenólicos - oriundos do metabolismo secundário das plantas e que auxiliam o crescimento e desenvolvimento vegetal - e sua concentração possuem a capacidade de estimular ou inibir a proliferação celular.

Assim, a ação do extrato poderá ser alterada em resposta às condições ambientais as quais a planta foi exposta, pois alterará seu metabolismo em resposta

a adaptações e a condições adversas que ela pode enfrentar, tais como estresse hídrico, radiação UV e desequilíbrio nutricional, fazendo com que sua composição química seja modificada. A intensidade destas alterações dependerá da intensidade da condição estressante e da idade fisiológica da planta (Gobbo-Neto; Lopes 2007).

Encontrado naturalmente no solo, o cobre (Cu) é um metal pesado, essencial para o desenvolvimento da planta (Kede et al. 2008). O cobre é um micronutriente vegetal, sendo fundamental como cofator de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, para a fotossíntese, respiração, metabolismo da parede celular, sinalização da transcrição, transporte de proteínas, fosforilação oxidativa e na mobilização de outros metais, como o ferro (Burkhead et al. 2009; Marschner 2012; Yruela 2005). A concentração de Cu necessária para a planta é baixa e níveis superiores aos requeridos causam toxicidade, principalmente por catalisar reações de Fenton, causando danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Drażkiewicz et al. 2007).

A intensificação no acúmulo de metais, como o Cu, no solo é devido à utilização de grandes quantidades de insumos agrícolas, ao desenvolvimento industrial intenso e à deposição e transformação química dos rejeitos. O aumento nas concentrações de Cu vem se tornando um problema no que diz respeito à toxicidade das plantas medicinais, pois além de alterarem a produção normal de metabólitos algumas espécies possuem a capacidade de acumular o metal em seus órgãos (Wuana & Okieimen 2011; Calgaroto 2009). Uma vez que a fonte de Cu para os animais é a alimentação, o consumo de plantas com excesso deste metal acumulado pode levar a intoxicação humana (Prya & Geetha 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a citogenotoxicidade dos extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata*, cultivada sob diferentes concentrações de

cobre em duas épocas de coleta, pelo sistema teste *Allium cepa*, e avaliar como estes fatores influenciam na quantidade de fenólicos totais dos extratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS:**

As mudas de *Pfaffia glomerata*, foram adquiridas por meio de propagação vegetativa clonal *in vitro*, realizada no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram propagados segmentos nodais de um (1) cm de comprimento adquiridos de plantas já propagadas em meio MS (Murashige & Skoog 1962), seguindo protocolo estabelecido por Nicoloso et. al (2001). Foi utilizado um genótipo, denominado GD, o qual faz parte da coleção de plantas medicinais da Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), cuja exsicata está depositada no Herbário DDMS, número 1951.

Os explantes foram cultivados em tubos de ensaio que continham 10 mL de meio MS (Murashige; Skoog 1962) normal, suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O crescimento dos mesmos foi realizado em câmara climatizada a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas, durante 21 dias.

As mudas obtidas por meio deste processo foram transplantadas para casa de vegetação em vasos com capacidade de 5 litros, que continham 5 Kg de areia previamente lavada e peneirada. Obteve-se o peso seco de cada vaso e o que correspondia ao saturamento hídrico, a fim de se calcular o peso correspondente a uma condição de cultivo de 70% de umidade utilizada para o cultivo neste experimento.

Durante sete dias as plantas foram aclimatadas, sendo cultivadas em solução nutritiva padrão de Hoagland e Arnon (1950) modificada. Após aclimatização, grupos de oito plantas por tratamento passaram a receber soluções nutritivas diferenciadas. Os tratamentos utilizados constaram de uma solução nutritiva padrão (0,5  $\mu\text{M}$  de Cu) e de três níveis excedentes de cobre: 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$ . Para a irrigação, eram relacionadas a pesagem de cada vaso, ao se determinar peso inferior à condição de 70% de umidade, os mesmos recebiam a solução nutritiva correspondente até atingir o peso ideal. Após 63 dias de cultivo metade das repetições, quatro plantas, foram coletadas e secadas em estufa a uma temperatura de 65°C. O restante permaneceu por mais 21 dias sob influência dos tratamentos até sua coleta, totalizando 84 dias cultivo.

Após secas as folhas e raízes foram utilizadas para realização do teste de *Allium cepa* realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, pertencente também à UFSM. Para o teste, bulbos de cebola tiveram suas raízes raspadas e foram colocados para enraizamento em água destilada por um período de quatro dias. Posteriormente, grupos de três bulbos (repetições) foram expostos aos tratamentos (Tabela 1). Foram preparadas infusões das folhas e decocção das raízes, por 10 minutos a uma concentração de 10g.L<sup>-1</sup>.

Os bulbos permaneceram em contato com os tratamentos por 24 horas. Posteriormente as raízes foram coletas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), também por 24 horas e armazenadas em etanol 70% sob refrigeração.



TABELA 1: Tratamentos utilizados no bioensaio de *Allium cepa* para análise da citogenotoxicidade

Tratamentos
T1- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1
T2- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 1
T3- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 1
T4- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 1
T5- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2
T6- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 2
T7- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 2
T8- Infusão de folhas 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 2
T9-Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1
T10- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 1
T11- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 1
T12- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 1
T13- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2
T14- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 2
T15- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 2
T16- Decocção de raiz 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 2
T17- Controle negativo (água destilada)
T18-Controle positivo (glifosato 1%)

As regiões meristemáticas foram utilizadas para preparação de lâminas, pela técnica de esmagamento adaptada de Guerra e Souza (2002), utilizandoorceína acética 2% como corante. Foram confeccionadas duas lâminas por bulbo e analisadas 500 células em cada uma delas, com auxílio de microscópio óptico em aumento de 40X, totalizando 3000 células por tratamento. Foram levados em consideração o estágio do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) e o aparecimento de alterações celulares do tipo micronúcleo, ponte anafásica e quebras cromossômicas. Os dados encontrados foram utilizados para o cálculo do índice de proliferação celular - índice mitótico (IM) – calculado pela razão entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas; e de alterações celulares - índice genotóxico (IG) – obtido pela razão entre a quantidade de células com alterações e o número total de células analisadas.

Para análise da concentração de compostos fenólicos, foi utilizada a técnica de Folin-Ciocalteu, adaptada por Singleton & Rossi (1965). Para estas análises

foram utilizados os extratos puro de raízes e os preparados com folhas diluídos em 1:5 (extrato: água destilada), apenas com os materiais da segunda coleta. Após duas horas de reação no escuro, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em  $\lambda=765\text{nm}$ . A curva de calibração utilizada foi preparada em solução de ácido gálico em um intervalo de 0 a 100 mg. L<sup>-1</sup>, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/L).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Sisvar.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados, por meio do teste de *A. cepa*, extratos preparados a partir de folhas e raízes secas de *P. glomerata* cultivada sob influência de diferentes concentrações de cobre (0,5; 20; 40 e 60  $\mu\text{M}$ ) em diferentes períodos (63 e 84 dias). Como esperado, o controle negativo em água destilada apresentou o maior índice mitótico (10%). Comparado a esse valor, o controle positivo em glifosato 1% e as infusões preparadas com as folhas de *P. glomerata*, com exceção das coletadas aos 63 dias e cultivadas com 20  $\mu\text{M}$  de Cu, reduziram significativamente a proliferação celular (Tabela 2). Os extratos de raízes nesse estudo não influenciaram a proliferação celular de *A. cepa*.

TABELA 2: Valores dos Índices Mitótico (IM) e Genotóxico (IG) dos extratos de *Pfaffia glomerata*, cultivada sob níveis de cobre.

Tratamento	IM	IG
T1- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1	2,6 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>
T2- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 1	5,17 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>
T3- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 1	3,3 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>
T4- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 1	3,3 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>
T5- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2	4,73 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>
T6- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 2	3,3 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>
T7- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 2	3,2 <sup>b</sup>	0,06 <sup>b</sup>
T8- Infusão 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 2	3,43 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>
T9-Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 1	5,73 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>
T10- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 1	6,17 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>
T11- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 1	5,03 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>
T12- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 1	5,87 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>
T13-Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução padrão, coleta 2	6,23 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>
T14- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 20 µM Cu, coleta 2	6,47 <sup>a</sup>	0,20 <sup>b</sup>
T15- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 40 µM Cu, coleta 2	5,43 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>
T16- Decocção 10g.L <sup>-1</sup> , solução 60 µM Cu, coleta 2	6,53 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>
T17 Controle negativo (água destilada)	10 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>
T18-Controle positivo (glifosato 1%)	2,87 <sup>b</sup>	1,03 <sup>a</sup>
Média	4,98	0,20
CV (%)	38,7	99,7

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. IM=índice mitótico; IG= índice genotóxico; CV= coeficiente de variação.

Os resultados indicam a capacidade antiproliferativa dos extratos de folhas de *P. glomerata*. Comportamento semelhante foi encontrado em extratos de *Mentha pulegium* L., *Punica granatum* L. e *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., respectivamente (Tedesco et al. 2012; Kuhn et al. 2015; Frescura et al. 2012).

O decréscimo no índice mitótico não foi dose ou idade dependente, uma vez que com o aumento das doses de Cu, não houve variações significativas nos valores encontrados. Estudo realizado por Rossato et al. (2010) demonstrou que CuSO<sub>4</sub>

possui capacidade antiproliferativa, porém a presença excessiva de Cu na solução nutritiva não afetou a capacidade medicinal de *P. glomerata*.

Frescura (2014) ao analisar extratos de *Rosmarinus officinalis* L., proveniente de cultivo com diferentes concentrações de nitrogênio e em duas coletas, também não relatou variações quanto à capacidade antiproliferativa da espécie. Similarmente chás das espécies *Solidago microglossa* DC., *Bacharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle e *Bacharis articulata* (Lam.) Pers. não apresentaram variações nos resultados observados quando os mesmos foram preparados com material proveniente de diferentes ambientes e em diferentes estágios de desenvolvimento (Bagatini et al. 2007; Fachinetto; Tedesco 2009).

Segundo Rossato et al. (2010) os ambientes de cultivo influenciam os resultados encontrados no teste de genotoxicidade, pois ao estudarem infusões de *Pluchea sagittalis* (Lam) concluíram que os extratos dessa espécie possuem uma grande capacidade proliferativa, sendo que os ambientes de cultivo analisados interferiram diferencialmente no índice mitótico de *A. cepa*. Porém, o mesmo não se confirma para a espécie *P. glomerata*, cujo comportamento foi o mesmo, salvo uma exceção, independente da condição de cultivo implicada. Foi observada grande diferença nos valores dos índices mitóticos encontrados para os extratos preparados a partir de folhas (variando de 2,60 a 5,17%) daqueles preparados com raízes (de 5,03 a 6,53%). Estes últimos, quando comparados ao controle negativo, não apresentaram a mesma capacidade de redução da proliferação celular, pois seus valores não diferiram significativamente do tratamento com água destilada (Tabela 2). As espécies *L. divaricata* e *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe exibiram comportamento distinto de *P. glomerata*, uma vez que para essas o órgão vegetal

utilizado não influenciou diretamente a capacidade proliferativa dos extratos (Frescura et al. 2012; Sousa; Bailão 2015).

Nenhum dos tratamentos apresentou aumento no número de aberrações celulares encontradas, diferindo todos do controle positivo em glifosato 1% no que diz respeito ao índice genotóxico (1,03%). Consequentemente podemos inferir que *P. glomerata* não possui capacidade mutagênica (Figura 1). Espécies como *M. pulegium* e *P. granatum*, apresentam o mesmo comportamento não-genotóxico e antiproliferativo encontrado para *P. glomerata* (Tedesco et al. 2012; Kuhn et al. 2015). Ao contrário do que foi apresentado por Dalla Nora et al. (2010) e Souza et al. (2010) para *Mikania glomerata* Spreng e *Artemisia verlotorum* Lamotte, respectivamente, cujos extratos foram genotóxicos pelo teste de *A. cepa*.

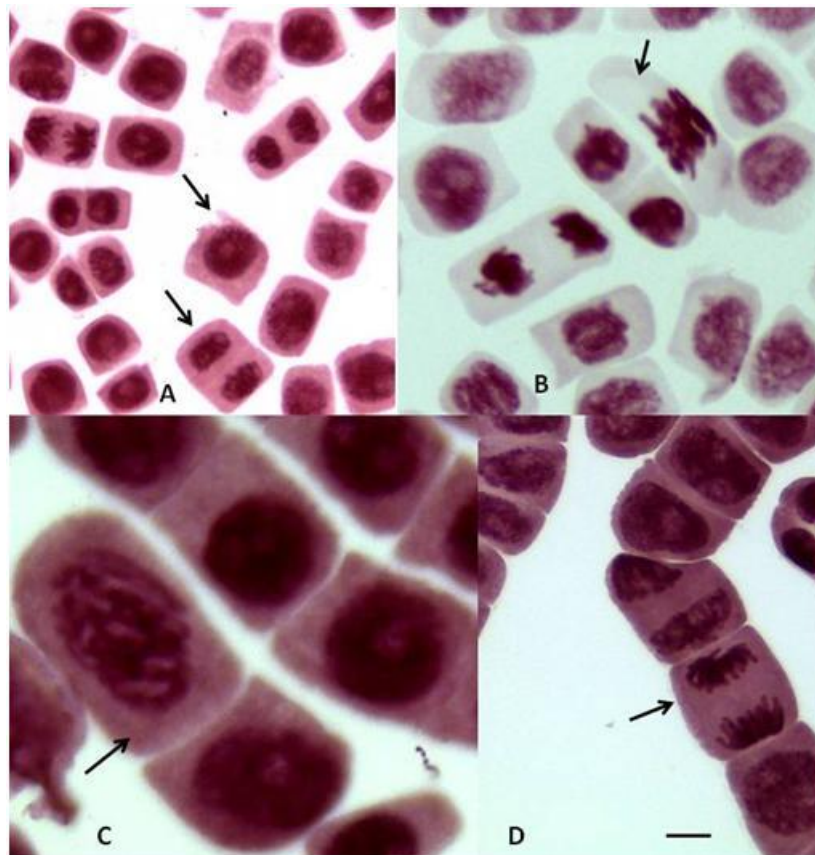


FIGURA 1: Fases do ciclo celular encontradas durante análise do sistema teste *Allium cepa*, utilizando extratos de folhas e raízes de *Pfaffia glomerata*. Seta superior em A indica intérfase e inferior telófase. Seta em B metáfase, em C indica prófase. Seta em D indica anáfase. Escala 10  $\mu$ m.

A capacidade de afetar o processo de divisão celular se dá pela presença de metabólitos secundários nos extratos. Estes são produzidos pelas plantas e caracterizam sua ação farmacológica. Sua composição e concentração são dependentes de vários fatores, bióticos e abióticos, que podem afetar a planta durante seu desenvolvimento, tais como, temperatura, umidade, radiação e nutrição do solo (Gobbo-Neto; Lopes 2007).

Os compostos fenólicos são um dos grupos de metabólitos secundários mais representativo dentre as espécies medicinais, por isto foi realizada a análise da influência do cobre na concentração de fenóis totais (Tabela 3). Por meio da técnica de Folin-Ciocalteu foi possível observar que a maior concentração está presente em extratos preparados com as folhas provenientes do tratamento com a solução considerada ideal (281,8 mg EAG/L) este valor foi 16 vezes maior que o valor encontrado para os extratos preparados com as raízes das mesmas plantas (17,4 mg EAG/L). Dentre os extratos de folhas, a concentração de fenólicos totais foi significativamente diferente entre os tratamentos.

TABELA 3: Concentração de fenólicos totais

TRATAMENTOS	Concentração de fenólicos (mg EAG/L) <sup>1</sup>
Infusão de folhas, solução padrão	281,8 <sup>a</sup>
Infusão de folhas, solução 20 µM Cu	207,1 <sup>c</sup>
Infusão de folhas, solução 40 µM Cu	180,3 <sup>d</sup>
Infusão de folhas, solução 60 µM Cu	223,5 <sup>b</sup>
Decocção de raízes, solução padrão	17,4 <sup>e</sup>
Decocção de raízes, solução 20 µM Cu	18,2 <sup>e</sup>
Decocção de raízes, solução 40 µM Cu	12,6 <sup>e</sup>
Decocção de raízes, solução 60 µM Cu	17,1 <sup>e</sup>
Média	119,73
CV <sup>2</sup>	5,38

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. <sup>1</sup>mg EAG/L= miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro; <sup>2</sup>CV=coeficiente de variação.

Extratos de *P. sagittalis* e *Origanum majorana* L. apresentaram modificações em sua composição química de acordo com a origem de suas folhas (Rossato et al.

2010; Baldoni 2017), demonstrando que assim como ocorre em *P. glomerata* a produção de substâncias bioativas pelos vegetais é influenciada pela maneira como são cultivadas (Tabela 3). A capacidade antiproliferativa dos extratos pode estar ligada a maior concentração dos compostos fenólicos, pois já foi demonstrado para outras espécies que possuem tais substâncias em sua composição química o mesmo comportamento, tais como *Pterocaulon polystachyum* DC e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., cujos extratos reduziram os índices mitóticos analisados no sistema teste *A. cepa* (Knoll et al. 2006; Fachinetto et al. 2007).

Nos extratos preparados a partir das raízes houve uma redução drástica da concentração de fenólicos totais, sendo que neste caso estes valores não diferiram significativamente dentre os tratamentos (Tabela 3). Estudos com *Pyrostegia venusta* Miers, demonstraram igualmente que o ambiente não influencia sua composição química (Santos; Blatt 1998). A baixa concentração de compostos fenólicos pode ser responsável pela não ação antiproliferativa dos extratos de raízes.

Conclui-se assim que os extratos preparados com as folhas de *Pfaffia glomerata* apresentam capacidade antiproliferativa. Esta capacidade de reduzir a proliferação celular pode ser devido à presença de substâncias capazes de influenciar o processo de divisão celular, tais como os compostos fenólicos. Além do efeito antiproliferativo, os extratos aquosos das folhas de *P. glomerata* não apresentaram genotoxicidade, mas ainda são necessários estudos mais completos sobre sua ação para indicação de seu uso.

A concentração de fenólicos totais foi 16 vezes maior em extratos de folhas quando comparados aos preparados com as raízes. A redução na quantidade de

fenóis pode ter influenciado a capacidade antiproliferativa da espécie, uma vez que os extratos de raízes não foram caracterizados como antiproliferativos.

Apesar das plantas exibirem modificações de seu perfil químico devido ao ambiente em que foram cultivadas, este fator não influencia a citogenotoxicidade de *P. glomerata*. A parte da planta utilizada e conseqüentemente a variação no processo de extração dos extratos modificam sua ação.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. B. N. et al. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1-4, 2006.

BALDONI, M.B. **Genotoxicidade, Atividade proliferativa e Análise Fitoquímica dos Extratos Aquosos e do Óleo de *Origanum majorana* L.** 2017. 49p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

BAGATINI, M.D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 632-636, 2007.

BURKHEAD, J. L. et al. Tansley review Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.

CALGAROTO, N. S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

DALLA-NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v.34, p. 85-101, 2010.

DRAŹKIEWICZ, M.; SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. **Chemosphere**, v. 67, p. 188-193, 2007.

FACHINETTO, J.M. et al. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satuireioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.



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 Mediciniais**, v. 11, p. 360-367, 2009.

FANK-DE-CARVALHO, S.N.; MARCHIORETTO, M.S. Amaranthaceae as a Bioindicator of Neotropical Savannah. **Diversity Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, v.2, p.235-262, 2012.

FREITAS, C.S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 2004.

FRESCURA, V.D.S. **Parâmetros fitoquímicos, genotóxicos e de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio**. 2014. 113p. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

FRESCURA, V.D.S.; LAUGHINGHOUSE IV, D.H.; TEDESCO, S.B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v.65, n. 1, p. 27-33, 2012.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131p.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347p.

KNOLL, M.F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n. 3. P. 539-542, 2006.

KEDE, M. L. F. M. et al. Estudo do comportamento do chumbo em latossolos brasileiros tratados com fosfatos: contribuições para a remediação de sítios contaminados. **Química Nova** v. 31, n. 3, p. 579-584, 2008.

KUHN, A.W. et al. Chromatographic analysis and antiproliferative potential of aqueous extracts of *Punica granatum* fruit peels using the *Allium cepa* test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 241-248, 2015.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p. 71–81, 2009.

MAHMOOD, A.; MAHMOOD, A.; MAHMOOD, M. In vitro Biological Activities of Most Common Medicinal Plants of Family Solanaceae. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 8, p. 1026-1032, 2012.

MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London Academic Press, 651 p., 2012.

MAZZEO, G.C.C.S. **Avaliação química, farmacológica e toxicológica do extrato de *Pfaffia glomerata***. 2015. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas Costeiros e Marinhos) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NETO, A. G. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87-91, 2005.

NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

OLIVEIRA, W.C. **Reação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (SPRENG) Pedersen a *Meloidogyne javanica* e estudo morfo-anatômico da espécie hospedeira**. 2012. 95p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OLIVEIRA, J.P. et al. Genotoxicidade e análises físico-químicas das águas do rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012.

ONYEMAOBI, O.I.; WILLIAMS, G.O.; ADEKOYA, K.O. Cytogenetic effects of two food preservatives, sodium metabisulphite and sodium benzoate. **Life Journal of Science**, v. 12, n. 1, p. 155-156, 2012.

PRYA, M. D. L.; GEETHA, A. Level of Trace Elements (Copper, Zinc, Magnesium and Selenium) and Toxic Elements (Lead and Mercury) in the Hair and Nail of Children with Autism. **Biological Trace Element Research**, v.142, p.148-158, 2011.

RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.12, n. 2, p. 85-93, 2002.

ROSSATO, L.V. et al. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 857-860, 2010.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de Flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, n. 2, p. 135-149, 1998.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n.6, p. 1527-1530, 1993.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. 1965. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, DAVIS, GIUSTI, M.M.; WROLASTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, F1.2.1-F1.2.13, 2001. v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, W.C.; BAILÃO, E.F.L.C. **Avaliação cito/genotóxica de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe através do teste de *Allium cepa***. Anais do II congresso de ensino pesquisa e extensão da UEG, Campus Pinenópolis, Goiás, 2015.

SOUZA, D.J.F.S. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v.37, n.3, p. 174-178, 2005.

SOUZA, L.F.B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **Internacional Journal of Environmental Studies**, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.

SOUZA V.C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

TEDESCO, M. et al. Potencial Antiproliferativo de Extratos Aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1914-1919, 2012.

VICENTINI, V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n.2, p. 7-19, 2004.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011, p.120-140, 2011.

n. YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17,  
2, p. 145-156, 2005.

#### 1           4 ARTIGO 3<sup>1</sup>

### 2 3                   Parâmetros fotossintéticos e de crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)

### 4                   Pedersen em cultivo com diferentes concentrações de zinco

#### 5 6   **RESUMO**

7           O excesso de nutrientes pode afetar o crescimento e desenvolvimento de plantas como  
8 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. O objetivo deste estudo foi analisar a influência do  
9 excesso de zinco na produção de biomassa, biometria radicular e fotossíntese de *P. glomerata*.  
10 Foi utilizado um genótipo da espécie para aquisição das mudas por meio de propagação *in*  
11 *vitro*. Em casa de vegetação foi realizado o cultivo das mesmas utilizando-se como tratamento  
12 quatro níveis de Zn: 2; 50; 75 e 100 µM. As soluções nutritivas foram aplicadas durante 84  
13 dias, quando foi feita análise de parâmetros fotossintéticos e produção da biomassa. 25% do  
14 sistema radicular foi congelado para posterior análise da biometria radicular. Os dados foram  
15 submetidos à análise estatística pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância. A  
16 produção de biomassa fresca foi reduzida principalmente na parte aérea para os tratamentos  
17 de 75 e 100 µM. O comprimento, área superficial e volume de raízes de *P. glomerata* foram  
18 reduzidos nos tratamentos de 50 e 75 µM. A taxa de transpiração e assimilação, a condutância  
19 estomática, a eficiência no uso da água e de carboxilação foram os parâmetros fotossintéticos  
20 afetados pelos tratamentos de Zn. Visivelmente as plantas apresentaram variação na coloração  
21 das folhas. As interferências causadas pelo excesso de Zn não apresentaram uma correlação  
22 direta. Conclui-se que *P. glomerata* tolera pequenos excessos de Zn, conseguindo sobreviver  
23 nessas condições apesar de pequenas alterações em seu crescimento e desenvolvimento.

24   **PALAVRAS-CHAVE:** nutrição vegetal, estresse mineral, metais.

#### 25 26   **ABSTRACT**

<sup>1</sup>Artigo Redigido conforme as normas da Revista CERES

27 Excess of nutrients can affect the growth and development of plants such as *Pfaffia glomerata*  
28 (Spreng.) Pedersen. The objective of this study was to analyze the influence of excess zinc on  
29 biomass production, root biometry and photosynthesis of *P. glomerata*. A genotype of the  
30 species was used to acquire the seedlings by means of *in vitro* propagation. In the greenhouse  
31 the cultivation of the same was carried out using as treatment four levels of Zn: 2; 50; 75 and  
32 100  $\mu\text{M}$ . The nutrient solutions were applied during 84 days, when photosynthetic parameters  
33 and biomass production were analyzed. 25% of the root system was frozen for further analysis  
34 of root biometry. Data were submitted to statistical analysis by the Scott-Knott test with 5%  
35 significance. The production of fresh biomass was reduced mainly in the aerial part for the  
36 treatments of 75 and 100  $\mu\text{M}$ . The length, surface area and root volume of *P. glomerata* were  
37 reduced in treatments of 50 and 75  $\mu\text{M}$ . The rate of transpiration and assimilation, stomatal  
38 conductance, water use efficiency and carboxylation were the photosynthetic parameters  
39 affected by Zn treatments. Visibly the plants showed variation in leaf color. Interference  
40 caused by excess Zn did not show a direct correlation. It is concluded that *P. glomerata*  
41 tolerates small excesses of Zn, being able to survive under these conditions despite small  
42 changes in its growth and development.

43 **KEY WORDS:** plant nutrition, mineral stress, metals.

44

## 45 **INTRODUÇÃO**

46

47 O zinco (Zn) é um nutriente vegetal requerido em baixas concentrações, porém  
48 fundamental para diversas funções na planta. Estima-se que esse metal seja componente de  
49 pelo menos 300 enzimas, contribuindo como elemento estrutural ou catalítico, participando de  
50 processos metabólicos, tais como respiração, biossíntese de clorofila, síntese de proteínas e  
51 RNA, multiplicação celular e na fertilidade do pólen (Gupta et al., 2011; Broadley et al.,

52 2007; Prado, 2008). Devido à crescente expansão industrial, agrícola e urbana as  
53 concentrações de Zn no solo estão se tornando cada vez maiores, podendo levar a toxicidade  
54 das plantas e afetar a saúde humana, devido ao consumo dessas espécies (Wuana; Okieimen,  
55 2011).

56 O estresse causado às plantas devido ao excesso de Zn poderá acarretar em uma  
57 redução na produção de biomassa e crescimento, pois está diretamente ligado ao processo de  
58 divisão celular, além de levar a um retardo no desenvolvimento radicular e reduzir a  
59 fertilidade do pólen (Broadley et al., 2007; Li et al., 2013). Fisiologicamente, o aumento de  
60 Zn leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a alterações no  
61 processo fotossintético uma vez que atua no transporte de elétrons e na biossíntese de  
62 clorofila (Cambrollé et al., 2015; Chen et al., 2008). Poderá haver também desequilíbrio de  
63 outros nutrientes, pois o excesso de Zn afeta a cadeia transportadora de elétrons, a absorção e  
64 a translocação dos demais metais (Magalhães et al., 2004; Jiang; Wang, 2008; Wang et al.,  
65 2009). A maneira pela qual a planta será afetada dependerá da espécie e de seu estágio de  
66 desenvolvimento, pois muitas possuem mecanismos de defesa diferenciais para tolerar  
67 alterações nutricionais do solo (Li et al., 2012; Marques; Nascimento, 2014).

68 As plantas medicinais sofrem diretamente com a toxidez por metais e, devido a seu  
69 consumo cada vez mais frequente, sua utilização pode acarretar em intoxicação humana.  
70 Dentre as espécies medicinais destaca-se *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen,  
71 Amaranthaceae, nativa do Brasil, popularmente conhecida como para-tudo ou ginseng-  
72 brasileiro, que apresenta grande importância devido a seu uso em substituição ao ginseng-  
73 coreano, *Panax ginseng* C.A. Meyer (Souza; Lorenzi, 2005; Vigo et al., 2004). Seus extratos  
74 são caracterizados medicinalmente principalmente por apresentar ação tônica, afrodisíaca,  
75 adaptógena (antiestresse), antioxidante, tranqüilizante e anti-inflamatória (Neto et al., 2005;  
76 Souza et al., 2005; Marques et. al., 2004; Freitas et al., 2004; Vigo et al., 2004). Tais

77 características se devem a sua composição química, contendo ácido glomérico (triterpenóide),  
78 ácido pfamérico (nortriterpenóide),  $\beta$ -ecdisona, rubesterona, ácido oleanólico e  $\beta$ -  
79 glucopiranosiloleanato (Shiobara et al., 1993).

80 *Pfaffia glomerata* já foi utilizada para outros estudos sobre efeitos de metais em seu  
81 desenvolvimento, onde foi descrito que a mesma apresenta tolerância moderada a metais  
82 como mercúrio (Hg) e cobre (Cu), mas, devido a sua ampla variabilidade genética tal  
83 tolerância pode não ser uniforme entre a espécie (Calgaroto, 2009; Neis, 2013; Kamada et al.  
84 2009). Já foi demonstrado que *P. glomerata* reage de maneira negativa a níveis de Zn de 200  
85  $\mu$ M, principalmente no que diz respeito a produção de biomassa e no desenvolvimento  
86 radicular.

87 Deste modo, o trabalho teve como objetivo analisar o crescimento, o desenvolvimento  
88 radicular e aspectos fotossintéticos de *P. glomerata* cultivada com diferentes concentrações de  
89 zinco.

90

## 91 **MATERIAIS E MÉTODOS**

92

93 Neste experimento foi utilizado um genótipo de *Pfaffia glomerata*, denominado GD. O  
94 qual pertence à coleção de plantas medicinais da Universidade Federal de Grande Dourados  
95 (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), estando depositado no Herbário DDMS  
96 (exsicata número 1951). Seguindo protocolo estabelecido por Nicoloso et al. (2001), foi  
97 realizada a propagação clonal *in vitro* deste genótipo, na qual segmentos nodais de um (1)  
98 centímetro foram propagados em meio MS normal (Murashige & Skoog 1962), suplementado  
99 com 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol. Durante 21 dias,  
100 permaneceram em câmara climatizada a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas.



101 Após obtenção do número de mudas necessárias, as mesmas foram transplantadas para  
102 vasos forrados com sacos plástico, reduzindo a perda de solução nutritiva, e preenchidos cada  
103 qual com 5 Kg de areia previamente lavada e peneirada. Todos os vasos foram pesados com a  
104 areia seca e posteriormente foi realizada a saturação hídrica dos mesmos para se determinar o  
105 peso que correspondesse a 70% de umidade, condição imposta durante o experimento.  
106 Durante a primeira semana, todos os vasos receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon  
107 (1950) modificada, para processo de aclimação, passado este período quatro plantas foram  
108 separadas por tratamento. Foram utilizadas quatro diferentes soluções nutritivas contendo 2  
109 (padrão), 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  de zinco.

110 As plantas permaneceram recebendo as soluções, em casa de vegetação com condições  
111 controladas, por 84 dias. Durante esse período, os vasos eram pesados diariamente, ao não  
112 atingirem o peso determinado para a condição de 70% de umidade, os mesmos recebiam a  
113 solução relativa a seu tratamento até alcançar o peso determinado. Quando primeiramente foi  
114 realizada análise de parâmetros fisiológicos onde foram avaliadas a taxa de assimilação de  
115  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), a condutância estomática ( $GS$ ), a concentração de  $\text{CO}_2$  interno ( $C_i$ ) e a transpiração  
116 ( $E$ ) por meio de um analisador portátil Li-Cor 6400XT, e a eficiência do uso da água ( $EUA$ ) e  
117 a eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ) foram obtidos pela razão entre o  $\text{CO}_2$  fixado na  
118 fotossíntese e o total de água transpirada. A análise de tais parâmetros foi iniciada às 9 horas  
119 da manhã e foram utilizadas a terceira folha completamente expandida a partir do ápice à base  
120 do colmo e a terceira da base do colmo em direção ao ápice (folha jovem e folha velha,  
121 respectivamente).

122 Na sequência foi realizada a contagem do número de folhas e medição das plantas,  
123 após, as mesmas foram coletadas e em seguida as folhas, caules e raízes (previamente lavadas  
124 e secadas em papel filtro) foram pesadas para obtenção da massa fresca. O material foi  
125 depositado em estufa a uma temperatura de  $65^\circ\text{C}$  para secagem até obtenção da massa seca.

126 Para as raízes, 25% de seu material fresco não foi seco, mas congelado para análise do  
127 desenvolvimento radicular. Após o descongelamento em temperatura ambiente, as raízes  
128 foram digitalizadas com auxílio de um scanner Epson 11000 XL e a análise da biometria foi  
129 obtida com suporte do software WinRhizo Pro, por meio do qual foi possível determinar o  
130 comprimento total, área superficial, volume total e o diâmetro médio das raízes.

131 Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo teste Scott-Knott com nível de  
132 significância de 5% utilizando o programa Sisvar.

133

## 134 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

135

136 O nutriente zinco presente no meio de cultivo em concentrações superiores a ideal (2  
137  $\mu\text{M}$ ) pode causar alterações no crescimento e desenvolvimento da planta reduzindo a  
138 produção de biomassa, alterando o processo fotossintético e causando clorose foliar (Broadley  
139 et al., 2007). Neste estudo os resultados demonstraram que o Zn afetou apenas a massa fresca  
140 de parte aérea. No que diz respeito ao caule, a interferência se deu somente nas maiores  
141 concentrações (75 e 100  $\mu\text{M}$ ), sendo que ambas não diferiram entre si para os valores  
142 encontrados. A massa seca das folhas demonstrou redução nos tratamentos com 50 e 75  $\mu\text{M}$   
143 de Zn, o que pode ser indicado pela redução no número de folhas nestes tratamentos (Tabela  
144 1).

145 Em estudos realizados por Frizzo (2017), *P. glomerata* ao ser cultivada com 200 e 400  
146  $\mu\text{M}$  de zinco apresentou redução na massa seca da parte aérea e na massa seca total, sendo  
147 que durante os tratamentos o acesso GD, o mesmo utilizado neste estudo, apresentou  
148 tolerância ao aumento nos níveis de Zn, tendo menor redução na produção de biomassa, área  
149 foliar e concentração de clorofila. A redução no crescimento e alteração de processos  
150 metabólicos de espécies expostas ao Zn pode ser explicada pelo fato deste metal estar

151 diretamente ligado ao processo de divisão celular, sendo que a resposta da planta dependerá  
152 da espécie e do nível de estresse causado (Broadley et al., 2007; Jain et al., 2010).

153 Bernardy et al. (2016), observaram que em hidroponia, após sete dias de tratamento o  
154 acesso GD, apresentou aumento na produção de biomassa em resposta a níveis moderados de  
155 Zn (50, 36 e 40  $\mu\text{M}$ ), porém aos 14 dias tais respostas foram diminuindo. Outros autores já  
156 relataram o aumento na produção de biomassa em relação ao incremento moderado de zinco  
157 em outras espécies, pois se tratando de um micronutriente sua presença pode de início  
158 estimular o crescimento de espécies tolerantes ao estresse causado por este metal (Disante et  
159 al., 2010). Em *Phyllostachys pubescens* Mazel ex H. de Lehaie, a massa seca de raízes nos  
160 tratamentos de 10 a 100  $\mu\text{M}$  não foi afetada, mas quando houve aumento nas concentrações  
161 (200 e 400  $\mu\text{M}$ ) a massa seca da espécie foi inteiramente afetada (Liu et al., 2014).

162 Natale et al. (2004), demonstraram que níveis elevados de Zn reduziram a produção de  
163 biomassa seca de raízes e parte aérea de mudas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims).  
164 Segundo Malavolta et al. (1997), a redução na produção de biomassa pode estar explicada ao  
165 fato de se acumularem tampões no xilema que contém o metal e dificultarem a elevação da  
166 seiva bruta.

167 Em *Beta vulgaris* L., à medida que se elevaram os níveis de Zn a massa seca de raízes,  
168 número de folhas e área foliar foram reduzidas, além disso, as folhas apresentavam sintomas  
169 visíveis, tais como clorose (Sagardoy et al., 2009). Diferente do que ocorre neste estudo,  
170 onde a maior concentração de Zn aumentou o número de folhas, porém visivelmente foi  
171 possível observar variação na coloração das folhas (Figura 1).

172 Já foram determinadas respostas de *P. glomerata* a outros metais, onde mercúrio (Hg)  
173 e alumínio (Al) reduziram os principais parâmetros de crescimento, diferente do que ocorreu  
174 em tratamentos com cádmio (Cd), onde a espécie não foi afetada negativamente (Calgaroto,  
175 2009; Maldaner et al., 2015; Gomes et al., 2013).

176 No que diz respeito à biometria radicular os tratamentos de 50 e 75  $\mu\text{M}$  demonstraram  
177 redução no comprimento, área superficial e volume de raízes de *P. glomerata*, não diferindo  
178 entre si (Tabela 2). O diâmetro das raízes não foi alterado dentre os tratamentos. Em estudos  
179 realizados por Frizzo (2017), o acesso GD reduziu a área superficial e o volume apenas em  
180 nível de 400  $\mu\text{M}$  de Zn ao mesmo tempo que o diâmetro radicular foi afetado, ao passo que no  
181 presente estudo concentrações menores já alteraram os parâmetros radiculares e o maior nível  
182 (100  $\mu\text{M}$ ) não afetou tais caracteres. Bernardy (2016) relatou o mesmo efeito inibitório no  
183 crescimento radicular, área superficial e volume radicular de *P. glomerata* em resposta aos  
184 tratamentos com Zn. Demonstrando que o sistema radicular da espécie é sensível ao excesso  
185 de Zn o que pode estar relacionado ao fato das raízes estarem em contato direto com o fator  
186 estressante, uma vez que a redução no crescimento das raízes é umas das respostas mais  
187 rápidas ao excesso de metais (Degenhardt; Gimmler, 2000). Na planta modelo *Arabidopsis*  
188 *thaliana*, alterações induzidas por Cd\Cu\Zn nas raízes foram relacionadas a alterações na  
189 relação auxina\cataquina devido às funções exercidas por estes metais (Sofa et al., 2013).

190 Em *Phyllostachys pubescens*, níveis baixos de Zn também diminuíram o crescimento  
191 radicular, cuja resposta em 100  $\mu\text{M}$  foi ainda maior, sendo que as raízes apresentaram  
192 comprimento muito inferior neste tratamento. Nesta espécie não foram notadas diferenças nas  
193 repostas dos tratamentos entre 100 e 400  $\mu\text{M}$  e níveis baixos (10  $\mu\text{M}$ ) aumentaram os  
194 parâmetros radiculares consideravelmente (Liu et al., 2014). Resultados semelhantes foram  
195 encontrados em sete variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) onde o comprimento, diâmetro  
196 médio, área superficial e volume aumentaram em concentrações baixas de Zn, mas foram  
197 decrescendo à medida que se aumentavam tais concentrações (Sharifianpour et al., 2014).

198 Para os parâmetros fisiológicos foram medidas a taxa de assimilação (A), a  
199 condutância estomática (GS), a concentração de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), a taxa de transpiração (E), a  
200 eficiência no uso da água (EUA) e a eficiência da carboxilação ( $A/C_i$ ) em uma folha superior

201 e uma inferior (Tabela 3). De maneira geral os parâmetros foram superiores quando medidos  
202 na folha superior no tratamento controle, sendo estas folhas as mais jovens. Esse resultado  
203 pode ser justificado pela maior atividade fotossintética desses órgãos.

204 A taxa de assimilação foi maior em folhas superiores, sendo mais afetadas pelos  
205 tratamentos de 50  $\mu\text{M}$  de Zn em ambas as folhas (superior e inferior). No que diz respeito a  
206 condutância estomática, as folhas inferiores reduziram os valores independentemente dos  
207 tratamentos aplicados, dentre as folhas superiores todos os níveis de Zn reduziram GS, sendo  
208 o de 100  $\mu\text{M}$  o de maior redução.

209 Os resultados encontrados para a concentração de  $\text{CO}_2$  diferiram apenas ao se analisar  
210 a origem das folhas, sendo as superiores mais eficientes que as inferiores, porém os resultados  
211 não diferiram entre os tratamentos. O tratamento de Zn 50  $\mu\text{M}$  em folhas inferiores foi o  
212 responsável pela maior redução na taxa de transpiração de *P. glomerata*, esse nível também  
213 foi o que mais reduziu este valor em folhas superiores. A eficiência no uso da água foi o único  
214 fator em que as folhas inferiores apresentaram resultados melhores que as superiores, neste  
215 caso os tratamentos de 50 e 75  $\mu\text{M}$  de Zn em folhas inferiores foram os de maior eficiência. A  
216 eficiência da carboxilação foi inferior em tratamentos de 50 e 100  $\mu\text{M}$  em folhas inferiores e  
217 dentre as superiores também foram os que mais afetaram este parâmetro.

218 O aumento da disponibilidade de Zn pode levar a redução da eficiência fotossintética  
219 por diversos fatores, como inibição da biossíntese de clorofila, redução da assimilação do  
220 carbono, interferência na cadeia transportadora de elétrons e na absorção de outros nutrientes  
221 (Chen et al., 2008; Dhir et al., 2008; Magalhães et al., 2004; Wang et al., 2009). A alteração  
222 na coloração das folhas apresentada pelas plantas deste experimento (Figura 1) é um fator que  
223 demonstra alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos. Estudos com espécies  
224 como *Canavalia ensiformis* (L.) DC, *Zea mays* L. e *Avena strigosa* Schreb., demonstraram  
225 clorose foliar e diminuição das clorofilas e carotenoides (Santana et al., 2015; Tiecher et al.,

226 2016a; 2016b). Com isso há redução na captação de energia e conseqüentemente no  
 227 crescimento das espécies.

228 Em *Limoniastrum monopetalum* (L.) níveis de Zn superiores a 90 µM, reduziram a  
 229 atividade fotossintética (Cambrollé et al., 2013). Neste estudo pode-se perceber uma redução  
 230 já em 50 µM. Frizzo (2017), relatou alterações fotossintéticas de *P. glomerata*, mas em níveis  
 231 superiores aos utilizados neste estudo.

232 Por meio dos resultados analisados conclui-se que a produção de biomassa e o  
 233 crescimento de *Pfaffia glomerata* são pouco afetados pelos níveis de zinco testados, indicando  
 234 que a espécie apresenta tolerância ao Zn nessas condições. A biometria radicular e os  
 235 parâmetros fotossintéticos são os mais afetados pelo excesso de zinco.

236

## 237 **AGRADECIMENTOS**

238

239 À Universidade Federal de Santa Maria-Santa Maria\RS e ao Programa de Pós-  
 240 Graduação em Agrobiologia pela formação oferecida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

241

## 242 **REFERÊNCIAS**

243

244 BERNARDY, K. et al. Changes in root morphology and dry matter production in *Pfaffia*  
 245 *glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive zinc. **Revista Brasileira de**  
 246 **Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2016.

247

248 BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**. v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007.

249

250 CALGAROTO, N.S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata***  
 251 **(Spreng.) Pedersen**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade  
 252 Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

253

254 CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal  
 255 shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. **Environmental and Experimental Botany**, v.  
 256 85, p. 50-57, 2013.

257

- 258 CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity.  
259 **Chemosphere**, v. 120, p. 171-178, 2015.  
260
- 261 CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence  
262 and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza*  
263 *sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, v.132, n.1, p. 89-101, 2008.  
264
- 265 DEGENHARDT, B.; GIMMLER, H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses  
266 in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, n. 51, p. 595-603, 2000.  
267
- 268 DISANTE et al. Sensitivity to zinc of Mediterranean woody species important for  
269 restoration. **Science of the Total Environment**, v.408, p.2216–2225, 2010.  
270
- 271 DHIR, B. et al. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and  
272 zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 20, n.1, p. 61-70, 2008.  
273
- 274 FREITAS, C.S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous  
275 extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74,  
276 p. 1167-1179, 2004;  
277
- 278 FRIZZO, L.F. **Interações entre Ferro e Zinco em acessos de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)**  
279 **PEDERSEN: Parâmetros Morfológicos, bioquímicos e fisiológicos**. 2017. 77p. Dissertação  
280 (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.  
281
- 282 GOMES, P.M. et al. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator  
283 *Pfaffia glomerata*. **Biologia**, v.68, n.2, p.223-230, 2013.  
284
- 285 GUPTA, B. et al. Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by  
286 zinc stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, p.85-91, 2011.  
287
- 288 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without**  
289 **soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.,1950.  
290
- 291 JAIN, R. et al. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient  
292 accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.).  
293 **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.5, p.979-986, 2010.  
294
- 295 JIANG, X.; WANG, C. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis*  
296 under zinc pollution. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 7, p. 697-704, 2008.  
297
- 298 KAMADA, T. et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata*  
299 (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n.  
300 3, p. 403-409, 2009.  
301
- 302 LI, X. et al. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum*  
303 *aestivum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p.198–203, 2012.  
304
- 305 LI, X. et al. Zinc induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline  
306 metabolism in roots and leaves of wheat plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,  
307 v. 89, n.1, p.150-157, 2013.

- 308  
309 LIU D. et al. Effect of Zn toxicity on root morphology, ultrastructure, and the ability to  
310 accumulate Zn in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Environment Science and**  
311 **Pollution Research**, v. 21, p.13615-24, 2014.
- 312  
313 MAGALHÃES, C.C.P. de et al. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis*  
314 *aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. **Journal of Phycology**, v. 40,  
315 n. 3, p. 496-504, 2004.
- 316  
317 MALAVOLTA et al. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.**  
318 Piracicapa: POTAFOS, 1997. 319p.
- 319  
320 MALDANER et al. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata* genotypes and its  
321 growth effects. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1013-1020, 2015.
- 322  
323 MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots  
324 (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.
- 325  
326 MARQUES, M.C.; NASCIMENTO, C.W.A. Tolerância de mamona a zinco avaliada por  
327 fluorescência de clorofila e nutrição das plantas. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, v.  
328 38, p. 850-857, 2014.
- 329  
330 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with  
331 tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- 332  
333 NATALE, W. et al. Respostas de mudas de goiabeira à aplicação de Zinco. **Revista**  
334 **Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 770-773, 2002.
- 335  
336 NEIS, F. A. **Interações de cobre e fósforo em acessos de *Pfaffia glomerata* (spreng.)**  
337 **Pedersen: efeito no crescimento e rendimento de  $\beta$ -ecdisona**. 2013. 67 p. Dissertação  
338 (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.
- 339  
340 NETO, A.G. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia*  
341 *glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87-91, 2005.
- 342  
343 NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
344 Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 2, p.11-18, 2001.
- 345  
346 PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 407p., 2008.
- 347  
348 SAGARDOY, R. et al. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown  
349 in hydroponics. **Plant Biology**, v. 11, p. 339–350, 2009.
- 350  
351 SANTANA, N. A. et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost  
352 on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 172-182, 2015.
- 353  
354 SHARIFIANPOUR, G. et al. Effect of different rates of zinc on root morphological traits  
355 among different upland rice Landraces in Malaysia. **International Journal of Agriculture**  
356 **and Forestry**, v. 4, p. 255-260, 2014.
- 357



- 358 SHIOBARA, Y. et al. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia*  
 359 *glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.  
 360
- 361 SOFO, A. et al. Correlation between hormonal homeostasis and morphogenic responses in  
 362 *Arabidopsis thaliana* seedlings growing in a Cd/Cu/Zn multi-pollution context.  
 363 **Physiologia Plantarum**, v.149, p.287-298, 2013.  
 364
- 365 SOUZA, D.J.F.S. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng)  
 366 Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v.37, n.3, p. 174-178, 2005.  
 367
- 368 SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das  
 369 famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa:  
 370 Instituto Plantarum, 2005.  
 371
- 372 TIECHER, T. L. et al. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc  
 373 contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52-61, 2016a.  
 374
- 375 TIECHER, T. L. et al. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa*  
 376 Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology**  
 377 **and Biochemistry**, v. 106, p. 253-263, 2016b.  
 378
- 379 VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata*  
 380 (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de**  
 381 **Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.  
 382
- 383 WANG, C. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in  
 384 rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1468–1476, 2009.  
 385
- 386 WUANA R. A.; OKIEIMEN F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of  
 387 Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**,  
 388 v. 2011, p. 120-140, 2011.

**Tabela 1:** Parâmetros de crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen cultivada sob concentrações de zinco.

TRATAMENTOS	MFR(grama planta <sup>-1</sup> )	MSR(grama planta <sup>-1</sup> )	MFC(grama planta <sup>-1</sup> )	MSC(grama planta <sup>-1</sup> )	MFF(grama planta <sup>-1</sup> )	MSF(grama planta <sup>-1</sup> )	MFT(grama planta <sup>-1</sup> )	MST(grama planta <sup>-1</sup> )	ALTURA (cm <sup>-1</sup> )	Nº FOLHAS
Controle	61,0 <sup>a</sup>	8,12 <sup>a</sup>	65,5 <sup>a</sup>	7,54 <sup>a</sup>	43,5 <sup>a</sup>	5,46 <sup>a</sup>	170,0 <sup>a</sup>	21,12 <sup>a</sup>	137,30 <sup>a</sup>	135,0 <sup>b</sup>
Zn 50 µM	52,0 <sup>a</sup>	8,12 <sup>a</sup>	60,5 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	41,0 <sup>a</sup>	4,65 <sup>b</sup>	153,5 <sup>a</sup>	19,27 <sup>a</sup>	127,02 <sup>a</sup>	130,5 <sup>b</sup>
Zn 75 µM	55,0 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	53,0 <sup>b</sup>	5,87 <sup>a</sup>	41,0 <sup>a</sup>	4,22 <sup>b</sup>	145,5 <sup>a</sup>	16,45 <sup>a</sup>	128,25 <sup>a</sup>	124,0 <sup>b</sup>
Zn 100 µM	56,5 <sup>a</sup>	7,89 <sup>a</sup>	57,5 <sup>b</sup>	7,13 <sup>a</sup>	37,5 <sup>a</sup>	5,41 <sup>a</sup>	155,0 <sup>a</sup>	20,43 <sup>a</sup>	118,30 <sup>a</sup>	164,0 <sup>a</sup>
MÉDIA	44,0	5,45	38,12	4,37	30,25	4,13	112,37	13,96	92,1	106,72
CV(%)	19,74	32,69	13,33	20,28	13,53	16,11	14,02	21,19	15,71	13,77

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. MFR=massa fresca de raiz; MSR=massa seca de raiz; MFC=massa fresca de caule; MSC=massa seca de caule; MFF=massa fresca de folhas; MSF=massa seca de folha; MFT=massa fresca total; MST=massa seca total; CV=coeficiente de variação.



**Figura 1:** Alterações visuais de *Pfaffia glomerata* cultivada com níveis de 100 $\mu$ M de Zinco. Em A encontram-se folhas sem alterações na pigmentação. Folhas com coloração vermelha-alaranjada em B. Em C variações no crescimento em desenvolvimento radicular, da esquerda para a direita: tratamento padrão, 50, 75 e 100  $\mu$ M de Zn. Escala 1 cm.

**Tabela 2:** Biometria radicular de *Pfaffia glomerata* cultivada sob concentrações de zinco

TRATAMENTOS	Comprimento (cm <sup>-1</sup> )	Área Superficial (cm <sup>-2</sup> )	Volume (cm <sup>-3</sup> )	Diâmetro (mm)
Controle	8146,08 <sup>a</sup>	1055,27 <sup>a</sup>	10,93 <sup>a</sup>	0,82 <sup>a</sup>
Zn 50 µM	5625,80 <sup>b</sup>	707,36 <sup>b</sup>	6,88 <sup>b</sup>	1,10 <sup>a</sup>
Zn 75 µM	6397,05 <sup>b</sup>	703,79 <sup>b</sup>	6,17 <sup>b</sup>	1,31 <sup>a</sup>
Zn 100 µM	7640,50 <sup>a</sup>	929,28 <sup>a</sup>	9,03 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>
MÉDIA	5181,6	629,92	6,13	0,84
CV(%)	22,9	24,5	26,28	26,81

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. CV=coeficiente de variação.

**Tabela 3:** Parâmetros fotossintéticos de *Pfaffia glomerata* cultivada sob concentrações de zinco

TRATAMENTOS	A µmol CO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	GS mol H <sub>2</sub> O m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Ci µmol CO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup>	E mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	EUA mol CO <sub>2</sub> mol H <sub>2</sub> O <sup>-1</sup>	A/Ci µmol m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup>
Controle (fi)	15,64 <sup>b</sup>	0,49 <sup>c</sup>	310,65 <sup>b</sup>	6,10 <sup>c</sup>	2,57 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>
Zn 50µM (fi)	10,04 <sup>d</sup>	0,29 <sup>c</sup>	316,96 <sup>b</sup>	3,44 <sup>e</sup>	2,96 <sup>a</sup>	0,03 <sup>c</sup>
Zn 75µM (fi)	13,82 <sup>c</sup>	0,36 <sup>c</sup>	305,03 <sup>b</sup>	4,70 <sup>d</sup>	2,94 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>
Zn 100µM (fi)	12,43 <sup>c</sup>	0,37 <sup>c</sup>	312,33 <sup>b</sup>	5,06 <sup>d</sup>	2,46 <sup>b</sup>	0,03 <sup>c</sup>
Controle (fs)	19,98 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>	332,99 <sup>a</sup>	8,86 <sup>a</sup>	2,24 <sup>b</sup>	0,06 <sup>a</sup>
Zn 50µM (fs)	15,30 <sup>b</sup>	0,77 <sup>b</sup>	335,14 <sup>a</sup>	5,97 <sup>c</sup>	2,60 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>
Zn 75µM (fs)	18,34 <sup>a</sup>	0,98 <sup>b</sup>	330,37 <sup>a</sup>	7,36 <sup>b</sup>	2,49 <sup>b</sup>	0,05 <sup>a</sup>
Zn 100µM (fs)	16,33 <sup>b</sup>	0,90 <sup>c</sup>	330,34 <sup>a</sup>	7,51 <sup>b</sup>	2,16 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>
Média	15,23	0,69	322,17	6,13	2,55	0,04
CV(%)	13,33	18,60	1,94	10,53	10,79	13,99

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de significância. fi=folha inferior; fs=folha superior; A=Taxa de assimilação; GS=Condutância Estomática; Ci=Concentração de CO<sub>2</sub>; E=Taxa de Transpiração; EUA: Eficiência no Uso da Água; A\Ci=Eficiência da Carboxilação; CV=coeficiente de variação.

## 5 ARTIGO 4<sup>1</sup>

### **Crescimento, biometria radicular e parâmetros fotossintéticos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sob influência de concentrações de cobre.**

#### **RESUMO**

Objetivou-se analisar o comportamento de um genótipo da espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, quando cultivada sob excesso de cobre (Cu). Foi realizada propagação vegetativa *in vitro* para obtenção das mudas que posteriormente foram cultivadas em casa de vegetação onde durante 84 dias receberam soluções nutritivas com diferentes níveis de Cu, sendo cada concentração um tratamento, a saber: 0,5 (padrão), 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$ . Foram utilizadas duas folhas por planta para análise de parâmetros fotossintéticos, 25% do sistema radicular para determinação de sua biometria e o restante do material foi pesado para obtenção da biomassa. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Scott-Knott com 5% de nível de significância. Os resultados demonstram que o Cu age principalmente na redução da produção de fitomassa da parte aérea, sendo as plantas do tratamento de 60  $\mu\text{M}$  as mais afetadas. As raízes apresentaram decréscimo no seu comprimento radicular em todos os tratamentos com excesso e na área superficial apenas em 40 e 60  $\mu\text{M}$ . A idade foliar foi o que mais influenciou a redução dos parâmetros fotossintéticos, apenas para a concentração interna de  $\text{CO}_2$ , eficiência no uso da água os tratamentos demonstraram alguma interferência. A partir dos dados apresentados pode-

<sup>1</sup>Artigo redigido conforme normas da Revista Comunicata Scientiae

25 se concluir que *P. glomerata* tolera um desequilíbrio nutricional causado  
26 pelos níveis de cobre testados, mas não sem apresentar danos a seu  
27 crescimento e desenvolvimento.

28 **PALAVRAS-CHAVE:** fitomassa, fotossíntese, estresse nutricional.

29

### 30 **ABSTRACT**

31 The objective of this study was to analyze the behavior of a genotype  
32 of the species *Pfaffia glomerata* (Spreng). Pederesen when grown under  
33 excess copper (Cu). Vegetative propagation was carried out *in vitro* to  
34 obtain the seedlings that were later grown in a greenhouse, where for 84 days  
35 they received nutrient solutions with different levels of Cu, each  
36 concentration being a treatment: 0.5 (standard), 20, 40 and 60  $\mu\text{M}$ . Two  
37 leaves per plant were used for the analysis of photosynthetic parameters, 25%  
38 of the root system to determine its biometry and the rest of the material was  
39 weighed to obtain the biomass. The data were analyzed by the Scott-Knott  
40 statistical test with 5% level of significance. The results demonstrate that Cu  
41 acts mainly in the reduction of shoot biomass production, with 60  $\mu\text{M}$   
42 treatment plants being the most affected. The roots showed a decrease in  
43 their root length in all treatments with excess and in the surface area only in  
44 40 and 60  $\mu\text{M}$ . The leaf age was the one that most influenced the reduction  
45 of the photosynthetic parameters, only for the internal concentration of  $\text{CO}_2$ ,  
46 efficiency in the water use the treatments showed some interference. From  
47 the data presented, it can be concluded that *P. glomerata* tolerates a

48 nutritional imbalance caused by the copper levels tested, but not without  
49 damage to its growth and development.

50 **KEY WORDS:** phytomass, photosynthesis, nutritional stress.

51

## 52 **INTRODUÇÃO**

53

54 O gênero *Pfaffia* é um dos 20 gêneros dentro da família  
55 Amaranthaceae e está representado na flora brasileira com cerca de 27  
56 espécies nativas, as quais são caracterizadas como ervas ou subarbustos  
57 eretos ou semiprostrados encontrados principalmente em ambiente de mata  
58 ciliar (Fank-de-Carvalho et al., 2012; Marchioretto et al., 2009). Dentre as  
59 espécies destaca-se *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, conhecida  
60 popularmente como ginseng brasileiro ou para-tudo e muito utilizada na  
61 medicina popular em substituição ao ginseng coreano, *Panax ginseng* C.A.  
62 Meyer (Alves et. al., 2006; Vigo et. al., 2004).

63 Os extratos medicinais de *P. glomerata* são caracterizados  
64 quimicamente pela presença de ácido glomérico (triterpenóide), ácido  
65 pfamérico (nortriterpenóide),  $\beta$ -ecdisona, rubesterona, ácido oleanólico e  $\beta$ -  
66 glucopiranosiloleanato o que justifica suas ações tônica, afrodisíaca,  
67 adaptógena (antiestresse), antioxidante, tranquilizante e anti-inflamatória  
68 (Shiobara et al. 1993; Freitas et al. 2004; Vigo et al. 2004).

69 No Brasil, *P. glomerata*, possui também grande importância comercial  
70 devido a sua exportação, apenas entre janeiro e maio de 2012, cerca de  
71 duas toneladas de raízes da espécie foram extraídas (Oliveira, 2012). Grande

72 parte desse material é adquirido diretamente da natureza, sem que haja um  
73 controle de sua qualidade.

74         Devido ao amplo crescimento das indústrias, cidades e a expansão  
75 agrícola, os solos brasileiros vêm sofrendo com a poluição, sendo o aumento  
76 nos níveis de metais um dos problemas que mais afeta a produção de  
77 vegetais para consumo humano (Wuana; Okieimen, 2011). As plantas ao se  
78 depararem com um desequilíbrio nutricional podem alterar seus processos  
79 metabólicos e com isso reduzir seu crescimento. Alterações na biomassa, na  
80 altura, no desenvolvimento radicular e no processo fotossintético são as  
81 principais características afetadas devido ao estresse causado pelo  
82 desequilíbrio nutricional.

83         O metal cobre (Cu) é um micronutriente para plantas e humanos.  
84 Requerido em baixas concentrações nas plantas, possui papel fundamental  
85 na fotossíntese, respiração e atua como cofator e parte estrutural de  
86 enzimas, na lignificação e metabolismo da parede celular, na mobilização  
87 de metais, dentre outras funções (Burkhead et al., 2009; Marschner, 2012;  
88 Yruela, 2005). Atualmente os níveis de Cu no solo vêm aumentando,  
89 podendo levar a toxicidade, principalmente por causar reações de Fenton,  
90 que aumentam a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) o que  
91 acaba causando danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Drązkiewicz  
92 et. al., 2007). Seu excesso também leva a redução no crescimento radicular,  
93 biomassa, aparecimento de clorose e alterações no transporte de elétrons  
94 durante a fotossíntese (Mench; Bes, 2009; Marschner, 2011, Yruela, 2005).



95 Os limiares de toxicidade para Cu dependem da espécie afetada e  
96 da duração deste estresse. Estudos anteriores mostraram que *P. glomerata*  
97 apresentou tolerância média a metais como alumínio, mercúrio e zinco  
98 (Maldaner et al., 2015; Skrebsky et al., 2008; Calgaroto, 2009; Bernardy et al.,  
99 2016).

100 Assim o objetivo deste estudo foi determinar a influência de  
101 concentrações de cobre no crescimento, na biometria radicular e no  
102 processo fotossintético de *P. glomerata*.

103

## 104 **METODOLOGIA**

105

106 Os exemplares de *P. glomerata* utilizados neste estudo foram  
107 adquiridos por meio de propagação clonal *in vitro* seguindo protocolo  
108 estabelecido por Nicoloso et al. (2001) onde segmentos nodais de um (1) cm  
109 foram propagados em 10mL de meio MS (Murashige & Skoog 1962),  
110 suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-  
111 inositol. Foi utilizado o genótipo designado GD, o qual é pertencente a  
112 coleção de plantas medicinais da Universidade Federal de Grande  
113 Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), estando depositado  
114 no Herbário DDMS (exsicata número 1951).

115 Os segmentos foram mantidos em câmara climatizada no Laboratório  
116 de Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Maria-RS, a uma  
117 temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 16 horas, durante 21 dias. O  
118 processo foi repetido até se possuir o número de explantes necessários.

119 Em casa de vegetação, foram separados vasos plásticos forrados com  
120 sacos plásticos, onde se colocou 5 Kg de areia previamente peneirada,  
121 lavada e secada. Foi realizada a pesagem de cada vaso com a areia seca  
122 e posteriormente em condição de saturação hídrica para se determinar o  
123 peso que indica uma condição de umidade a 70%, utilizada no experimento.  
124 Em cada vaso foi colocada uma muda de *P. glomerata*, as quais nos  
125 primeiros sete dias receberam solução nutritiva padrão de Hoagland e Arnon  
126 (1950) modificada.

127 Passado este período, quatro vasos foram separados por tratamento,  
128 que consistiram em diferentes concentrações de cobre na solução nutritiva:  
129 0,5 (padrão); 20; 40 e 60  $\mu\text{M}$ . A colocação da solução era feita por meio da  
130 pesagem dos vasos, caso os mesmos não apresentassem o peso  
131 correspondente a condição de 70% de umidade, recebiam a solução  
132 correspondente a seu tratamento até obter tal medida. As plantas  
133 permaneceram em cultivo nestas condições por 84 dias.

134 Após o período de cultivo em casa de vegetação iniciou-se a análise  
135 de parâmetros fisiológicos, às 9 horas da manhã. Para isto foram utilizadas  
136 duas folhas por planta: a terceira folha completamente expandida a partir  
137 do ápice à base do colmo e a terceira da base do colmo em direção ao  
138 ápice (folha jovem e folha velha, respectivamente). Foram determinados a  
139 taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), a condutância estomática ( $G_S$ ), a  
140 concentração de  $\text{CO}_2$  interno ( $C_i$ ) e a transpiração ( $E$ ) por meio de um  
141 analisador portátil Li-Cor 6400XT e a eficiência do uso da água ( $EUA$ ) e a

142 eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ), os quais foram obtidos pela  
143 razão entre o  $CO_2$  fixado na fotossíntese e o total de água transpirada.

144 Posteriormente, as folhas de cada planta foram contadas e medidas.  
145 Depois todas as plantas foram coletadas, lavadas e secadas em papel filtro,  
146 e foi determinada a massa fresca de folhas, caule e raízes. O material foi  
147 colocado em sacos de papel em estufa a uma temperatura de  $65^\circ C$  para  
148 secagem até obtenção da massa seca.

149 Para as raízes somente 75% do material fresco foi colocado para  
150 secagem, os demais 25% foram congelados para análise da biometria  
151 radicular. As mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente e  
152 digitalizadas em scanner Epson 11000 XL e a biometria obtida com suporte  
153 do software WinRhizo Pro, onde se determinou o comprimento total, a área  
154 superficial, o volume total e o diâmetro médio das raízes.

155 Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo teste Scott-  
156 Knott com nível de significância de 5% utilizando o programa Sisvar.

157

## 158 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

159

160 Por ser essencial a diversos processos metabólicos em vegetais, a  
161 presença de cobre em níveis diferentes dos considerados ideais pode afetar  
162 o crescimento e desenvolvimento das plantas. Neste estudo ao se analisar a  
163 influência de concentrações excessivas desse metal em *P. glomerata*  
164 observou-se que a planta no que diz respeito à produção de biomassa,  
165 reduziu sua massa fresca total em todas as doses testadas (20, 40 e  $60 \mu M$ ),

166 conforme dados demonstrados na Tabela 1. A massa seca total, por sua vez,  
167 não apresentou redução significativa em comparação à concentração  
168 controle. Analisando-se os órgãos vegetais individualmente, pode-se  
169 perceber redução na massa fresca da parte aérea (caule e folhas) e massa  
170 seca de caule apenas para o tratamento de 60  $\mu\text{M}$ . Os demais resultados de  
171 biomassa não diferiram significativamente.

172 Em estudos com *Zea mays* L., Luchese et al. (2004) demonstraram que  
173 a massa seca da parte aérea é reduzida conforme aumentam-se os níveis  
174 de Cu, e que para raízes essa redução não é significativa. Em *Ricinus*  
175 *communis* L. a produção de fitomassa foi até mesmo estimulada em  
176 concentrações excessivas de Cu até certo ponto e posteriormente reduzida,  
177 isso pode ocorrer devido ao fato do cobre ser essencial para as plantas e em  
178 níveis não tão excessivos estimular o crescimento (Chaves et al., 2010).

179 Fernandes e Henriques (1991) indicam que tal redução na produção  
180 de fitomassa pode ser devido a inibição causada ao processo de divisão  
181 celular. Outra explicação seria o aumento na produção de ERO's, o que  
182 leva ao estresse oxidativo reduzindo o crescimento, principalmente de raízes  
183 e folhas, uma vez que ERO's podem causar danos a várias moléculas,  
184 levando a peroxidação lipídica da membrana, por exemplo (Benavides et  
185 al., 2005; Li et al., 2012; Bouazizi et al., 2010). A maneira como o Cu afetar a  
186 planta dependerá da espécie analisada e da interação com os demais  
187 fatores que influenciam o crescimento da mesma (Carrillo-Gonzalez et al.,  
188 2006; Fernandez-Calviño et al., 2008).

189           Em relação à altura das plantas, as concentrações de Cu aplicadas  
190 não influenciaram este parâmetro, diferentemente do que ocorreu para o  
191 número de folhas, onde o tratamento de 60 µM afetou negativamente este  
192 parâmetro, auxiliando assim na redução da massa fresca. Em *Vitis vinifera*  
193 subsp. *sylvestris* a taxa relativa de crescimento não diferiu significativamente  
194 com o aumento de cobre até uma concentração de 9 mmol. L<sup>-1</sup>,  
195 concentrações maiores afetaram a espécie reduzindo a área foliar e a  
196 altura das plantas (Cambrollé et al., 2013). Para *Mentha crispa* L., assim como  
197 em *P. glomerata*, o número de folhas foi reduzido nas maiores  
198 concentrações de Cu testadas, ao mesmo tempo em que as menores não  
199 afetaram a produção de biomassa (Boldarini, 2017). Plântulas de *Avena*  
200 *strigosa* Schreb. apresentaram bom desenvolvimento em solos contaminados  
201 com 60 µM de Cu, sendo os sintomas de fitotoxicidade presente apenas nos  
202 tratamentos com níveis superiores (Comiran, 2017), o que corrobora a ideia  
203 de que cada espécie age de maneira diferenciada à contaminação por  
204 metais.

205           Para *P. glomerata* já foram relatadas as reduções de massas fresca e  
206 seca das raízes e folhas em tratamentos com mercúrio, onde sua presença  
207 afetou todos os parâmetros de crescimento da planta (Gupta et al., 2013).  
208 Para o cádmio, Gomes et al. (2013), demonstraram que a produção de  
209 fitomassa seca não foi afetada, apesar da espécie apresentar alguns  
210 sintomas visíveis de fitotoxicidade.

211           Estudos anteriores já comprovaram que o excesso de Cu altera a  
212 estrutura das raízes, afetando principalmente seu crescimento (Chen et al.

213 2013; Kopttke et al., 2009; Lequeux et al., 2010). Segundo Jiang et al. (2001), o  
214 Cu causa inibição na frequência de divisão celular no ápice da raiz  
215 reduzindo seu comprimento. O fato das raízes serem o órgão em contato  
216 direto com o excesso dos metais também contribuiu ao fato de ser o órgão  
217 cujo desenvolvimento é mais afetado (Burkhead et al., 2009).

218 A análise da biometria radicular demonstrou que o volume e o  
219 diâmetro das raízes não foram alterados de maneira significativa nos  
220 tratamentos com Cu (Tabela 2). O comprimento total de raízes decresceu  
221 nas três concentrações excedentes em comparação com o controle, porém  
222 não houve diferenças entre os tratamentos. Plantas cultivadas com 40 e 60  
223  $\mu\text{M}$  de Cu também reduziram a área superficial das raízes (790,13 e 720,98  
224  $\text{cm}^2$ , respectivamente) em relação ao controle e ao nível de 20  $\mu\text{M}$  (1055,27  
225 e 945,51  $\text{cm}^2$ , respectivamente).

226 Em *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* a concentração de Cu foi superior em  
227 raízes em relação às folhas, o que pode explicar os danos causados a este  
228 órgão (Cambrollé et al., 2013, Burkhead et al., 2009). Em *Urochloa*  
229 *mosambicensis* (Hack.) Dandy 0,62 $\mu\text{M}$  ( $\text{Cu}^{+2}$ ) reduziram o crescimento de  
230 pelos radiculares e o comprimento das raízes (Kopittke et al., 2009).

231 Diferente do que ocorreu com *P. glomerata* neste estudo, o diâmetro  
232 de raízes de videira foi afetado pelo excesso de Cu, provavelmente devido a  
233 uma maior vacuolização das células, o que pode ocasionar morte celular ou  
234 a disposição desigual das camadas celulares (Juang et al., 2012; Ambrosini  
235 et al., 2015; Guimarães et al., 2016). As alterações causadas na estrutura

236 radicular provocam modificações na dinâmica de absorção dos demais  
237 nutrientes, podendo ocasionar a redução do crescimento.

238 Além dos sintomas de fitotoxicidade já citados, como redução na  
239 produção de fitomassa e no desenvolvimento radicular, outros são o  
240 aparecimento de clorose foliar, desintegração da membrana e alteração no  
241 processo fotossintético.

242 Os parâmetros fotossintéticos analisados para *P. glomerata*  
243 apresentaram pequenas variações entre as concentrações, sendo que a  
244 idade da folha (jovem sendo representada pela folha superior e velha pela  
245 inferior) foi o que mais auxiliou na redução destes valores, devido à maior  
246 atividade fotossintética das folhas mais jovens. Os dados apresentados na  
247 Figura 1 mostram que para a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), a taxa  
248 de transpiração (E) e a eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ), a idade foliar foi o  
249 único fator influente na redução dos dados, sendo que as folhas jovens  
250 apresentaram valores superiores.

251 Para a condutância estomática (GS), os valores nas folhas inferiores foi  
252 reduzido independentemente do nível de Cu aplicado, em relação as folhas  
253 superiores, onde houve variação nos valores, sendo que as plantas do  
254 tratamento controle apresentaram as maiores importâncias. A  
255 concentração de CO<sub>2</sub> interna (C<sub>i</sub>) exibiu superioridade em folhas jovens de  
256 *P. glomerata* submetidas as concentrações padrão, 20 e 60 μM. O  
257 tratamento de 40 μM não variou de acordo com a idade da folha, sendo  
258 que folhas superiores no tratamento de 20 μM também não reduziram

259 significativamente este valor. A maior redução foi encontrada em plantas  
260 cultivadas nas doses controle e 60  $\mu\text{M}$  de folhas inferiores.

261 A eficiência no uso da água foi superior em folhas velhas das plantas  
262 controle e 60  $\mu\text{M}$  de Cu e folhas jovens de 40  $\mu\text{M}$ . Os demais tratamentos não  
263 diferiram entre si.

264 Cambrollé et al. (2013) relatou para *V. vinifera* subsp. *sylvestris* redução  
265 em A quando houve excesso de Cu, sendo a redução dependente do  
266 tempo de exposição ao estresse e a dose de Cu aplicada. Neste mesmo  
267 estudo GS esteve correlacionada a A, o mesmo não ocorreu de maneira tão  
268 direta neste estudo com *P. glomerata*, onde o mesmo só pode ser observado  
269 para as folhas inferiores. Ci e pigmentos fotossintéticos também foram  
270 reduzidos em *V. vinifera* subsp. *sylvestris* conforme aumento das  
271 concentrações de Cu.

272 A clorose internerval encontrada em *Avena strigosa* Schreb, em estudo  
273 realizado por Giroto et al. (2014) com excesso de Cu, pode ser explicada  
274 por uma redução na concentração de clorofila e na alteração da estrutura  
275 das membranas dos tilacóides (Li et al., 2012, Baszynski et al., 1988). Além  
276 disso, esse excesso aumenta a produção de enzimas envolvidas na defesa  
277 às EROS's, altera o transporte de elétrons afetando a fotossíntese e causando  
278 fotoinibição (Yang et al., 2011; Cambrollé et al., 2015). Assim, as alterações  
279 apresentadas podem ser decorrentes de efeitos sobre a integridade do  
280 processo fitoquímico ou da redução na concentração dos pigmentos  
281 fotossintéticos (Cambrollé et al., 2015).



282            Outro problema ocasionado pelo excesso de metais no solo é a  
283        variação na permeabilidade da membrana, afetando a absorção e  
284        translocação de outros metais, conseqüentemente o excesso de Cu pode  
285        levar a um desequilíbrio nutricional e assim a toxidez pode ser resultante das  
286        variações de outros metais (Janicka-Russak et al., 2008; Cambrollé et al.,  
287        2013).

288            Visivelmente foi possível observar uma variação na coloração das  
289        folhas de *P. glomerata*, que apresentaram tons vermelho-alaranjado e  
290        arroxeado, podendo isto ser decorrente da variação dos pigmentos  
291        fotossintetizantes, principalmente clorofila (Figura 2).

292

## 293        **CONCLUSÃO**

294

295            Plantas de *Pfaffia glomerata*, genótipo GD, alteram a produção de  
296        biomassa fresca quando cultivadas em concentrações excessivas de cobre.

297            As raízes têm seu comprimento e área superficial afetada pelo excesso  
298        de Cu.

299            Condutância estomática, concentração de CO<sub>2</sub> e eficiência no uso  
300        da água são afetadas pelos tratamentos testados (20, 40 e 60 µM).

301

## 302        **REFERÊNCIAS**

303

304        ALVES, R. B. N. et al. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]  
305        germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1-4,  
306        2006.

- 307  
308 AMBROSINI, V.G. et al. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of  
309 the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and**  
310 **Biochemistry**, v. 96, p. 270-280, 2015.
- 311  
312 BASZYNSKI, T. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-  
313 tolerant spinach exposed to excess copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 137,  
314 p. 708-713, 1988.
- 315  
316 BENAVIDES, M.P., GALLEGO, S.M., TOMARO, M.L., Cadmium toxicity in plants.  
317 **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p. 21-34, 2005.
- 318  
319 BERNARDY, K. et al. Changes in root morphology and dry matter production in  
320 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive  
321 zinc. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2016.
- 322  
323 BOLDARINI, M.T.B. **Avaliação dos efeitos da contaminação de cobre no solo**  
324 **sobre *Mentha crisper* L.** 2017. 42p. Dissertação (Mestrado em Engenharia  
325 Ambiental) -Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus  
326 Apucarana, Londrina, Paraná, 2017.
- 327  
328 BOUAZIZI, H., JOUILI, H., GEITMANN, A., FERJANI, E.E. Copper toxicity in  
329 expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and  
330 nutrient element uptake. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 73, p. 1304-  
331 1308, 2010.
- 332  
333 BURKHEAD, J.L. et al. Tansley review Copper homeostasis, **New Phytologist**, v.  
334 182, p. 799-816, 2009.
- 335  
336 CALGAROTO, N.S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia***  
337 ***glomerata* (Spreng.) Pedersen.** 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em  
338 Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- 339  
340 CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential  
341 of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. **Environmental and**  
342 **Experimental Botany**, v. 85, p. 50-57, 2013.
- 343  
344 CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity.  
345 **Chemosphere**, v. 120, p. 171-178, 2015.
- 346  
347 CARRILLO-GONZALEZ, R. et al. Mechanisms and pathways of trace element  
348 mobility in soils. **Advances in Agronomy**, v. 91, p. 111-178, 2006.
- 349  
350 CHAVES, L.H.G. et al. Acúmulo e distribuição de cobre e zinco em mamoeira  
351 cultivar BRS PARAGUAÇU e crescimento da Planta. **Engenharia Ambiental**, v.  
352 7, n. 3, p. 263-277, 2010.
- 353

- 354 CHEN, P. Y. et al. Effects of calcium on rhizotoxicity and the accumulation  
355 and translocation of copper by grapevines. **Plant Physiology and**  
356 **Biochemistry**, v. 73, p. 375-382, 2013.
- 357
- 358 COMIRAN, M. **Toxidez por Cobre: reflexos na qualidade de sementes e no**  
359 **desenvolvimento inicial de aveia preta**. 2017. 54p. Dissertação (Mestrado em  
360 Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- 361
- 362 DRAŹKIEWICZ, M.; SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. The redox state and  
363 activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under  
364 cadmium or copper stress. **Chemosphere**, v. 67, p. 188-193, 2007.
- 365
- 366 FANK-DE-CARVALHO, S.N.; MARCHIORETTO, M.S. Amaranthaceae as a  
367 Bioindicator of Neotropical Savannah. **Diversity Biodiversity Enrichment in a**  
368 **Diverse World**, v.2, p.235-262, 2012.
- 369
- 370 FERNANDES, J.C; HENRIQUES, F.S. Biochemical, physiological, and structural  
371 effects of excess copper in plants. **Botanical Review**, v. 57, p. 246-273, 1991.
- 372
- 373 FERNADEZ-CALVIÑO, D. et al. Copper content of soils and river sediments in a  
374 winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components.  
375 **Geoderma**, v. 145, p. 91-97, 2008.
- 376
- 377 FREITAS, C.S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of  
378 aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in  
379 rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1167-1179, 2004.
- 380
- 381 GIROTTI, E. et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated  
382 vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants.  
383 **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 12, p.: 9051-9063, 2014.
- 384
- 385 GOMES, P. M. et al. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-  
386 hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. **Biologia**, v. 68, n. 2, p.: 223-230, 2013.
- 387
- 388 GUIMARÃES, P.R. et al. Black oat (*Avena strigosa* Schreb.) growth and root  
389 anatomical changes in sandy soil with different copper and phosphorus  
390 concentrations. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 192, p. 1-10, 2016.
- 391
- 392 GUPTA, D. K. et al. Effect of Hg, As and Pb on biomass production,  
393 photosynthetic rate, nutrients uptake and phytochelatin induction in *Pfaffia*  
394 *glomerata*. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1403-12, 2013.
- 395
- 396 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants**  
397 **without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347 p.,  
398 1950.
- 399

- 400 JANICKA-RUSSAK, M. et al. Response of plasma membrane H<sub>p</sub>-ATPase to  
401 heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. **Journal of Experimental Botany**, v.  
402 59, p. 3721-3728, 2008.
- 403
- 404 JIANG, X.; WANG, C. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites*  
405 *australis* under zinc pollution. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 7, p. 697-  
406 704, 2008.
- 407
- 408 JUANG, K.W. et al. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in  
409 grapevine cuttings. **Environmental Science and Pollution Research**  
410 **International**, v. 19, n. 4, p. 1315-1322, 2012.
- 411
- 412 KOPITKE, P.M. et al. Toxic effects of Cu<sup>2+</sup> on growth, nutrition, root  
413 morphology, and distribution of Cu in roots of *Sabi grass*. **Science of the Total**  
414 **Environment**, v. 407, n. 16, p. 4616-4621, 2009.
- 415
- 416 LEQUEUX, H. et al. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact  
417 on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation  
418 and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 673-682,  
419 2010.
- 420
- 421 LI, X. et al. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of  
422 *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, n. 1, p.  
423 198-203, Dec. 2012.
- 424
- 425 LUCHESE, A.V. et al. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho  
426 (*Zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes com cobre. **Ciência**  
427 **Rural**, v. 34, n. 6, p. 1949-1952, 2004.
- 428
- 429 MALDANER, J. et al. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata*  
430 genotypes and its growth effects. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1013-1020, 2015.
- 431
- 432 MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. Padrões de distribuição  
433 geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**,  
434 v.6, n.3, p.67-68, 2009.
- 435
- 436 MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London Academic  
437 Press, 651 p., 2012.
- 438
- 439 MENCH, M.; BES, C. Assessment of ecotoxicity of top soils from a wood  
440 treatment site. **Pedosphere**, v. 19, p. 143-155, 2009.
- 441
- 442 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays  
443 with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- 444

- 445 NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia*  
446 *glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s,  
447 Botucatu, v. 3, n. 2, p.11-18, 2001.  
448
- 449 OLIVEIRA, W.C. **Reação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**  
450 **a *meloidogyne javanica* e estudo morfoanatômico da espécie hospedeira.**  
451 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília,  
452 Brasília, DF. 2012.  
453
- 454 SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and  
455 ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530,  
456 1993.  
457
- 458 SKREBSKY, E.C. et al. Caracterização das exigências nutricionais de mudas de  
459 *Pfaffia glomerata* em Argissolo Vermelho distrófico arênico pela técnica do  
460 nutriente faltante. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 989-996, 2008.  
461
- 462 VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia*  
463 *glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius –  
464 *Amaranthaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 6, n. 2, p. 7-19,  
465 2004.  
466
- 467 YANG, Y. et al. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera*  
468 “Comber) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483-  
469 1491, 2011.  
470
- 471 YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 2, p.  
472 145-156, 2005.  
473
- 474 WUANA R.A.; OKIEMEN F.E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of  
475 Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN**  
476 **Ecology**, v. 2011, p. 120-140, 2011.

**Tabela 1:** Produção de fitomassa, altura e número de folhas de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas sob níveis de cobre.

TRATAMENTOS	MFR(grama planta <sup>-1</sup> )	MSR(grama planta <sup>-1</sup> )	MFC(grama planta <sup>-1</sup> )	MSC(grama planta <sup>-1</sup> )	MFF(grama planta <sup>-1</sup> )	MSF(grama planta <sup>-1</sup> )	MFT(grama planta <sup>-1</sup> )	MST(grama planta <sup>-1</sup> )	ALTURA (cm <sup>-1</sup> )	Nº FOLHAS
Controle	61,00 <sup>a</sup>	8,11 <sup>a</sup>	65,50 <sup>a</sup>	7,54 <sup>a</sup>	43,50 <sup>a</sup>	5,47 <sup>a</sup>	170,00 <sup>a</sup>	21,12 <sup>a</sup>	137,30 <sup>a</sup>	135,00 <sup>a</sup>
Cu 20 µM	46,00 <sup>a</sup>	7,14 <sup>a</sup>	59,25 <sup>a</sup>	7,03 <sup>a</sup>	38,50 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	143,75 <sup>b</sup>	19,44 <sup>a</sup>	122,50 <sup>a</sup>	151,00 <sup>a</sup>
Cu 40 µM	50,25 <sup>a</sup>	8,39 <sup>a</sup>	54,50 <sup>a</sup>	7,83 <sup>a</sup>	38,50 <sup>a</sup>	5,36 <sup>a</sup>	143,25 <sup>b</sup>	21,57 <sup>a</sup>	114,53 <sup>a</sup>	135,25 <sup>a</sup>
Cu 60 µM	46,50 <sup>a</sup>	6,66 <sup>a</sup>	43,00 <sup>b</sup>	5,70 <sup>b</sup>	30,00 <sup>b</sup>	4,10 <sup>a</sup>	119,50 <sup>b</sup>	16,44 <sup>a</sup>	124,57 <sup>a</sup>	108,75 <sup>b</sup>
MÉDIA	42,60	5,94	37,80	4,81	30,06	4,60	110,43	15,39	93,14	109,10
CV(%)	23,40	25,90	20,12	26,19	14,32	18,39	17,32	20,39	16,00	16,20

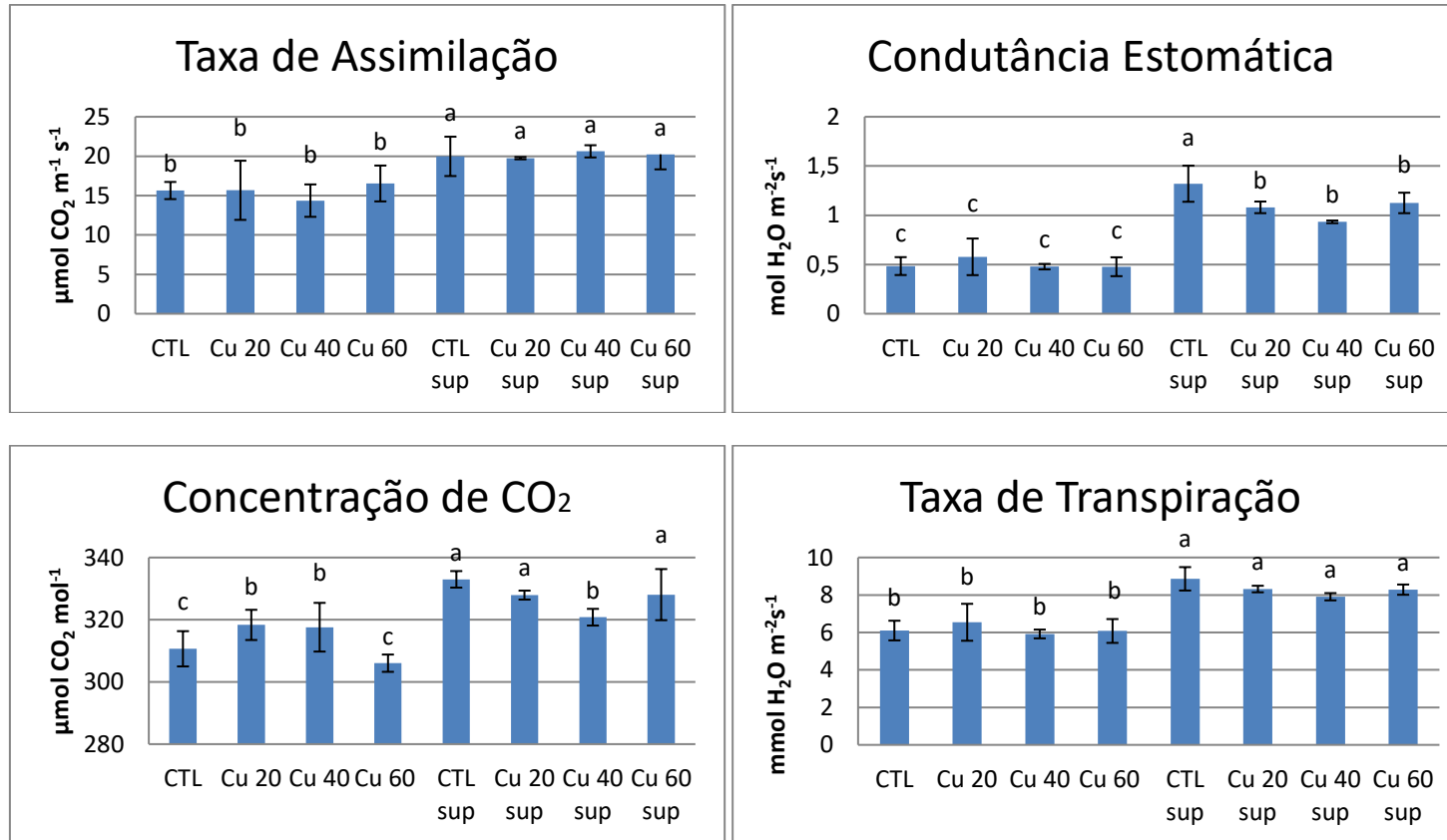
\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. MFR=massa fresca de raiz; MSR=massa seca de raiz; MFC=massa fresca de caule; MSC=massa seca de caule; MFF=massa fresca de folhas; MSF=massa seca de folha; MFT=massa fresca total; MST= massa seca total; CV=coeficiente de variação.

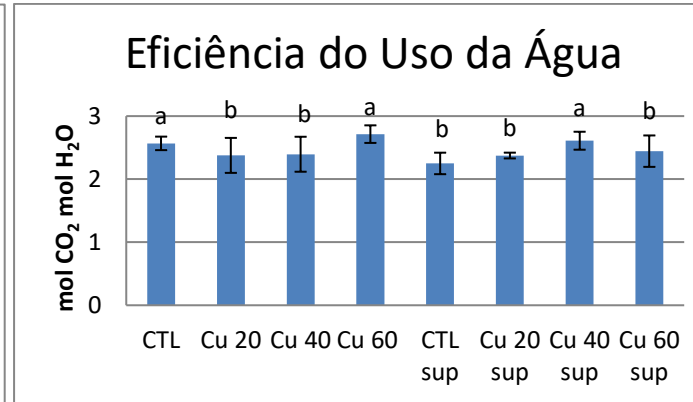
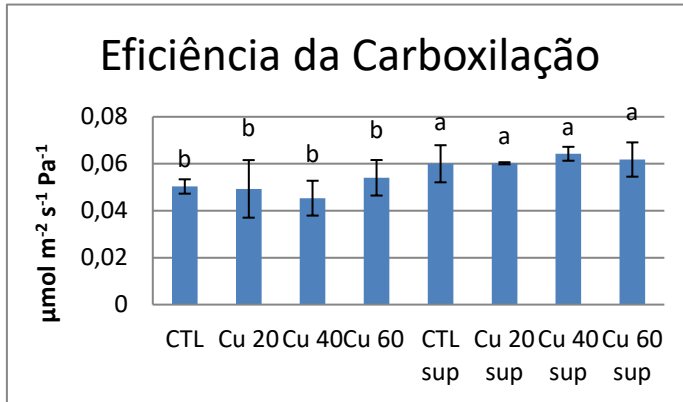
**Tabela 2:** Biometria radicular de *Pfaffia glomerata* cultivada sob níveis de cobre.

TRATAMENTOS	Comprimento (cm <sup>-1</sup> )	Área Superficial (cm <sup>-2</sup> )	Volume (cm <sup>-3</sup> )	Diâmetro (mm)
Controle	8164,08 <sup>a</sup>	1055,27 <sup>a</sup>	10,94 <sup>a</sup>	0,82 <sup>a</sup>
Cu 20 µM	6617,31 <sup>b</sup>	945,51 <sup>a</sup>	10,80 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>
Cu 40 µM	5655,97 <sup>b</sup>	790,13 <sup>b</sup>	8,83 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>
Cu 60 µM	5512,92 <sup>b</sup>	720,98 <sup>b</sup>	8,10 <sup>a</sup>	1,01 <sup>a</sup>
MÉDIA	5224,92	717,40	7,96	0,77
CV(%)	20,07	21,80	25,42	20,21

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. CV=coeficiente de variação

**Figura 1:** Parâmetros fotossintéticos de *Pfaffia glomerata* cultivada sob níveis de cobre

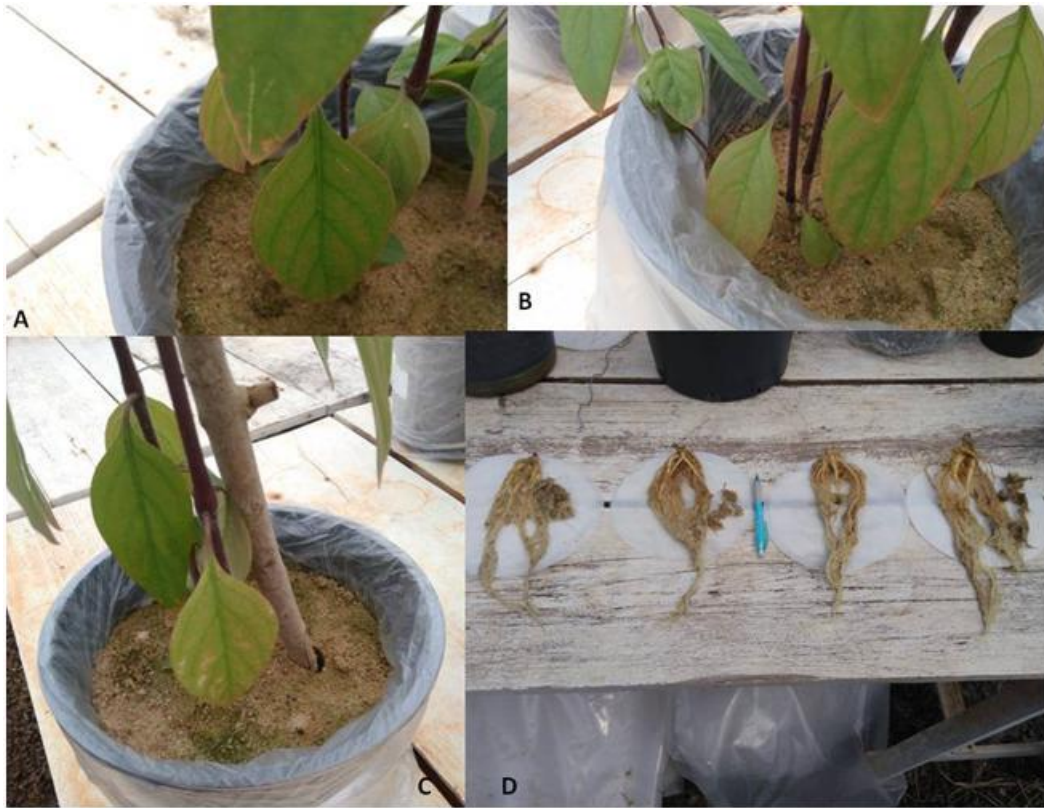




\*Médias com mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de significância. CTL: controle; sup: folha superior



**FIGURA 2:** Alterações visuais em *Pfaffia glomerata* decorrentes do excesso de cobre.



A, B e C demonstram alterações na coloração de folhas de *P. glomerata*. Em D variações no sistema radicular, da direita para esquerda: tratamento controle, 60, 40 e 20  $\mu\text{M}$  de Cu.

## 6 DISCUSSÃO

O aumento na disposição de metais no solo torna necessário estudos sobre a influência do desequilíbrio nutricional no crescimento, desenvolvimento e metabolismo vegetal. Por ser uma das espécies medicinais mais utilizadas e comercializadas, *Pfaffia glomerata* nos últimos anos vem despertando o interesse para pesquisas relacionadas ao efeito do excesso de metais durante seu cultivo.

Analisando possíveis alterações na citogenotoxicidade da espécie, foi determinada, por meio do sistema teste *Allium cepa*, a citogenotoxicidade de *P. glomerata* cultivada em diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn). Os resultados indicam a capacidade antiproliferativa dos extratos de folhas de *P. glomerata*, independente do tratamento ao qual as plantas foram submetidas, pois os dados não foram dependentes das concentrações tanto para Zn quanto para Cu. Além disso, a idade da planta (63 ou 84 dias) também não interferiu diretamente nestes resultados.

Em ambos experimentos (concentrações de Zn e Cu), a capacidade antiproliferativa dos extratos foi diferente para os dois órgãos vegetais testados: folhas e raízes. De modo geral, os extratos das raízes possuem menor capacidade antiproliferativa em *A. cepa*. Nos tratamentos com níveis de Zn, os extratos preparados a partir do sistema radicular da planta apresentaram capacidade antiproliferativa menor que os extratos das folhas. Apenas as raízes do tratamento com 75  $\mu\text{M}$  de Zn de ambas as coletas, e raízes de 50  $\mu\text{M}$  Zn, da primeira coleta, apresentaram valores significativamente iguais aos extratos foliares.

Se tratando das plantas cultivadas sob diferentes níveis de Cu, os extratos de raízes de todos os tratamentos e coletas e os de folhas cultivadas durante 63 dias com 20  $\mu\text{M}$  de Cu não apresentaram atividade antiproliferativa. Tal capacidade antiproliferativa já foi comprovada para soluções de  $\text{CuSO}_4$  por Rossato et al. (2010), porém os dados obtidos neste estudo demonstram que a presença de Cu em excesso na solução de cultivo não influenciou a capacidade medicinal de *P. glomerata*.

Diferentemente do que ocorreu para *P. glomerata*, espécies como *Luehea divaricata* Mart & Zucc e *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe não apresentaram diferenças ao se analisar extratos preparados a partir de diferentes órgãos vegetativos (FRESCURA et al., 2012; SOUSA; BAILÃO, 2015). Dias et al. (2014), ao analisarem extratos de *Mikania cordifolia* (L.f.) Willd. preparados com material de dois ambientes, observaram que, assim como ocorreu para *P. glomerata*, as variações ambientais não influenciaram a capacidade antiproliferativa da espécie. Frescura (2014) não observou diferenças no comportamento de

*Rosmarinus officinallis* L. cultivada com diferentes concentrações de nitrogênio em duas coletas, no teste de citogenotoxicidade de *A. cepa*.

Variações na atividade antiproliferativa de espécies de acordo com a origem do material vegetal já foram relatadas. *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera teve sua capacidade antiproliferativa dependente da origem das folhas (ROSSATO et al., 2010), o que demonstra que fatores como composição do solo e idade da planta podem interferir na ação da espécie, muito devido a variação na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar das diferenças na atividade antiproliferativa, nenhum dos extratos de ambos os experimentos evidenciaram a capacidade genotóxica da espécie, uma vez que o índice de aberrações cromossômicas não diferiu do encontrado para o controle negativo em água destilada. Como esperado, as raízes em contato com o controle positivo (glifosato 1%) foram as únicas a apresentar um aumento no aparecimento de células defeituosas.

A concentração de fenólicos totais foi determinada apenas para os extratos da segunda coleta e, para ambos os experimentos, as concentrações foram variadas de acordo com as concentrações utilizadas para as folhas e reduzidas drasticamente em extratos de raízes. Tal redução foi mais drástica nos tratamentos com Zn, onde a diferença entre a maior e a menor concentração foi de 20 vezes. Neste experimento, os extratos preparados com folhas de plantas cultivadas com 75 µM Zn, foram as que apresentaram maior concentração de fenólicos (291,05 mg EAG/L). Para os tratamentos com Cu, as folhas cultivadas com a solução nutritiva padrão proporcionaram os extratos com maior concentração de compostos fenólicos (281,8 mg EAG/L). Estes extratos também foram os responsáveis pela maior redução no índice mitótico no teste de *A. cepa*.

Os compostos fenólicos são importantes para o metabolismo dos vegetais e para a saúde humana, principalmente devido a sua capacidade antioxidante e de quelação de metais e sua produção está diretamente ligada ao cultivo das espécies (SOUSA et al., 2007). Como exemplo, *P. sagittalis* e *Origanum majorana* L. tiveram sua composição química alterada devido a diferenças no ambiente em que foram coletadas, assim como ocorreu para folhas de *P. glomerata* (ROSSATO et al., 2010; BALDONI, 2017). A produção destes compostos orgânicos é variável também dentre as estruturas vegetais, o que justifica a grande variação entre as concentrações encontradas para folhas e raízes. Barni, Filho e Couto (2009) observaram uma variação de até quatro vezes na quantidade de flavonoides totais comparando folhas e caules de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

A já comprovada capacidade de redução na proliferação celular dos compostos fenólicos faz com que extratos com grandes quantidades destes compostos sejam indicados para o processo de antienvhecimento, prevenção de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular e ao câncer (TOMÁS- BARBERÁN; ESPÍN, 2001). A ação medicinal de *P. glomerata* pode estar ligada à presença de compostos fenólicos, mas a capacidade antiproliferativa das raízes de plantas cultivadas sob doses de Zn, mesmo com concentração baixas desses compostos, indica que outro grupo de substâncias pode ser o responsável por esta ação.

Tanto o cobre quanto o zinco, apesar de essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal, são requeridos em baixas concentrações, sendo que em níveis maiores que as consideradas ideais podem afetar a produção de biomassa, o processo fotossintético e o desenvolvimento radicular. Ao permanecer sob cultivo em concentrações de Zn, *P. glomerata* teve a massa fresca da parte aérea afetada, sendo que para o caule o efeito foi significativo apenas nas concentrações de 75 e 100  $\mu\text{M}$  e para as folhas em 50 e 75  $\mu\text{M}$ , para os quais o número de folhas também foi reduzido. O acesso GD utilizado neste experimento demonstrou ser tolerante ao excesso de Zn em estudos realizados por Frizzo (2017). Por ter papel fundamental no processo de divisão celular, o Zn pode afetar o crescimento das plantas devido a alterações causadas neste processo, mas a maneira e a intensidade desses efeitos dependem da espécie afetada (BROADLEY et al., 2007; JAIN et al., 2010).

Em algumas espécies tolerantes ao aumento de Zn e Cu, níveis moderados podem estimular o seu crescimento, como ocorreu em *Phyllostachys pubescens* Mazel ex H. de Lehaie, onde apenas concentrações superiores a 200  $\mu\text{M}$  de Zn afetaram a produção de fitomassa e em *Ricinus communis* L. onde o aumento de Cu até certo ponto elevou os parâmetros de crescimento (DISANTE et al., 2010; LIU et al., 2014; CHAVES et al., 2010).

Quanto ao Cu, a massa fresca total da parte aérea foi reduzida em todas as doses testadas. Individualmente o caule foi o que teve sua biomassa mais reduzida, principalmente em 60  $\mu\text{M}$ . Assim como ocorreu com *P. glomerata*, a massa seca da parte aérea de *Zea mays* L., também foi reduzida à medida que se aumentam as concentrações de Cu na solução nutritiva, porém sem afetar a massa do sistema radicular (LUCHESE et al., 2004).

A redução no crescimento pode ser explicada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), levando ao estresse oxidativo e consequentemente a danos em várias biomoléculas (LI et al., 2012; BOUAZIZI et al., 2010). Diferente do que ocorreu na maior concentração de Zn aplicada, no tratamento com 60  $\mu\text{M}$  de Cu o número de folhas de *P. glomerata*, apresentou decréscimo ao passo que, plantas de *Avena strigosa* Schreb.

apresentaram bom desenvolvimento nesta dose, reforçando que a maneira pela qual o estresse afeta a planta dependerá da espécie analisada (COMIRAN, 2017).

Por estar em contato direto com o fator estressante, o sistema radicular pode ser o mais sensível ao aumento de metais e ter seu desenvolvimento afetado. Tanto para o zinco quanto para o cobre, a biometria radicular foi afetada pelas concentrações testadas. No caso de plantas cultivadas nos tratamentos de Zn, foi observada redução no comprimento, área superficial e volume das raízes nas doses de 50 e 75  $\mu\text{M}$ . Frizzo (2017) observou alterações no diâmetro, volume e área superficial no nível de 400  $\mu\text{M}$ . Resultados semelhantes apareceram em *P. pubescens*, onde 100  $\mu\text{M}$  de Zn já reduziram tais parâmetros (LIU et al., 2014).

Para as plantas cultivadas sob influência de níveis de Cu, o comprimento das raízes foi reduzido nas três concentrações consideradas excedentes, mas para a área superficial apenas as duas maiores concentrações testadas (40 e 60  $\mu\text{M}$ ) foram significativas. Sofo et al. (2013), analisando o comportamento de *Arabidopsis thaliana*, em relação a Cd\Cu\Zn, relacionaram a alteração no sistema radicular a modificações na relação auxina\catequina. Variações na estrutura das raízes alteram a absorção de metais, assim os efeitos causados pelo estresse de Zn e Cu podem ser resultado de variações nas concentrações de outros nutrientes.

As concentrações testadas também provocaram alterações em alguns parâmetros fotossintéticos analisados. A taxa de assimilação foi afetada nos tratamentos de 50  $\mu\text{M}$  de Zn, tanto em folhas jovens quanto em velhas. O mesmo tratamento foi responsável pela maior redução da taxa de transpiração. Para a condutância estomática, o nível de 100  $\mu\text{M}$  de Zn em folhas superiores (jovens), foi o que reduziu de maneira mais acentuada os valores. As folhas mais velhas apresentaram maior eficiência no uso da água, sendo que nas inferiores o tratamento de 100  $\mu\text{M}$  foi o menos eficiente. As concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  foram as que mais afetaram a eficiência de carboxilação.

Diferente do Zn, o cobre não interferiu nos dados apresentados para a taxa de assimilação, a taxa de transpiração e a eficiência de carboxilação. Para a condutância estomática, apenas as folhas mais velhas sofreram alterações de acordo com a concentração aplicada durante o cultivo. A concentração interna de  $\text{CO}_2$  foi maior nas folhas superiores dos tratamentos de 20 e 60  $\mu\text{M}$ . As folhas velhas de *P. glomerata* cultivadas na solução padrão e 60  $\mu\text{M}$  e as jovens em 40  $\mu\text{M}$  foram as que apresentaram maior eficiência no uso da água.

Estas alterações podem ser decorrentes da interferência de Zn na rota de síntese de clorofila, na cadeia transportadora de elétrons e na absorção de outros nutrientes, além da redução da assimilação do carbono (CHEN et al., 2008; DHIR et al., 2008; MAGALHÃES et

al., 2004; WANG et al., 2009). O Cobre por sua vez causa reduções na concentração de clorofila e alteração na estrutura das membranas dos tilacóides, além de aumentar a produção de ERO's que afeta o sistema fotossintético (LI et al., 2012, YANG et al., 2011).

Assim, para se garantir o uso seguro de vegetais, sem riscos de intoxicação humana, são necessários programas de padronização de cultivo das plantas, uma vez que plantas tolerantes, tais como *P. glomerata*, conseguem crescer e se desenvolver em ambientes contaminados, podendo entrar na cadeia alimentar e causar danos à saúde (VIGO et al. 2004).

## 7 CONCLUSÃO

A atividade antiproliferativa de *Pfaffia glomerata* não é afetada pelas concentrações de zinco testadas e pela idade fisiológica das plantas. Extratos de folhas demonstram possuir maior capacidade antiproliferativa sob o ciclo celular de *Allium cepa*.

A concentração de compostos fenólicos é alterada nos extratos das folhas nos tratamentos testados durante o cultivo. Os extratos de raízes apresentam concentrações de compostos fenólicos até 20 vezes menores que os encontrados para os extratos de folhas.

As concentrações de cobre e idade fisiológica não influenciam a citogenotoxicidade dos extratos de *P. glomerata*.

Raízes tratadas com cobre não apresentam capacidade antiproliferativa. A redução dos compostos fenólicos comparando-se extratos de folhas e raízes é menor, de até 16 vezes.

Em nenhum dos experimentos os extratos apresentam potencial genotóxico.

Outro grupo de compostos orgânicos pode estar envolvido na atividade medicinal de *P. glomerata*, sendo necessários estudos mais completos sobre a caracterização química dos extratos.

No que diz respeito a produção de biomassa, plantas de *P. glomerata* são pouco afetadas pelo excesso de Zn, sendo a biometria radicular e o processo fotossintético os fatores que mais sofrem influência das concentrações testadas. Para o Cu, as plantas apresentam principalmente redução na massa fresca da parte aérea e no comprimento e área superficial de raízes. Apenas a condutância estomática, a concentração de CO<sub>2</sub> e a eficiência no uso da água são alterados devido ao excesso deste nutriente.

Plantas de *Pfaffia glomerata*, acesso GD, são tolerantes ao excesso moderado de cobre e zinco.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, R. B. N. et al. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1-4, 2006.
- BAGATINI, M. D.; 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, p. 444-447, 2007.
- BALDONI, M. B. **Genotoxicidade, Atividade proliferativa e Análise Fitoquímica dos Extratos Aquosos e do Óleo de *Origanum majorana* L.** 2017. 49p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- BARNI, S.T.; FILHO, V. C.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p.: 865-870, 2009.
- BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, n. 4, p.: 677-702, 2007.
- BOUAZIZI, H. et al. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1304-1308, 2010.
- BURKHEAD, J. L. et al. Tansley review Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.
- CHAVES, L. H. G. et al. Acúmulo e distribuição de cobre e zinco em mamoeira cultivar BRS PARAGUAÇU e crescimento da Planta. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 263-277, 2010.
- CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 1, p. 89-101, 2008.
- COMIRAN, M. **Toxidez por Cobre: reflexos na qualidade de sementes e no desenvolvimento inicial de aveia preta.** 2017. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- DHIR, B. et al. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 20, n.1, p. 61-70, 2008.
- DIAS, M. G. et al. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014.
- DISANTE, K. B. et al. Sensitivity to zinc of Mediterranean woody species important for restoration. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2216–2225, 2010.



- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 1, p. 67-72, 2004.
- FREITAS C. S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 2004.
- FRESCURA, V. D. S. **Parâmetros fitoquímicos, genotóxicos e de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio**. 2014. 113p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- FRESCURA, V. D. S.; LAUGHINGHOUSE IV, D. H.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 65, n. 1, p. 27-33, 2012.
- FRIZZO, L. F. **Interações entre Ferro e Zinco em acessos de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN: Parâmetros Morfológicos, bioquímicos e fisiológicos**. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- JAIN, R. et al. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.5, p. 979-986, 2010.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.
- LI, X. et al. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.86, p. 198–203, 2012.
- LIU, D. et al. Effect of Zn toxicity on root morphology, ultrastructure, and the ability to accumulate Zn in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13615-24, 2014.
- LUCHESE, A. V. et al. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho (*Zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes com cobre. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1949-1952, 2004.
- MAGALHÃES, C. C. P. de et al. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 496-504, 2004.
- MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**, v.6, n.3, p.67-68, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London Academic Press, 651p., 2012.

MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extractBNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

NETO, A. G. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87-91, 2005.

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 407p., 2008.

ROSSATO, L. V. et al. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 857-860, 2010.

SEMEDO, M. F. F. R. **Importância médico-legal dos metais essenciais: Cobre e Zinco**. 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2014.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.

SOARES, A. K. A. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SOFO, A. et al. Correlation between hormonal homeostasis and morphogenic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings growing in a Cd/Cu/Zn multi-pollution context. **Physiologia Plantarum**, v.149, p. 287-298, 2013.

SOUSA, W. C.; BAILÃO, E. F. L. C. **Avaliação cito/genotóxica de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe através do teste de *Allium cepa***. Anais do II congresso de ensino pesquisa e extensão da UEG, Campus Pinenópolis, Goiás, 2015.

SOUSA, C. M. M et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 3521-355, 2007.

SOUZA, D. J. F. S et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 3, p.174-78, 2005.

TAIZ L AND ZEIGER E. 2013. **Fisiologia Vegetal**, 5<sup>th</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 918 p.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. 2012. **Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test**. In: **Environmental Contamination**. Rijeka: Intech Publisher, p. 137-156.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 853-876, 2001.

VEIGA JÚNIOR, F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.

YANG, Y. et al. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483-1491, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 2, p. 145-156, 2005.

WANG, C. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1468–1476, 2009.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011; p. 120-140, 2011.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A- EXPLANTES DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen AOS SETE (ESQUERDA) E 21 (DIREITA) DIAS APÓS PROPAGAÇÃO.**



Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE B- PLANTAS DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen NO ÍNICIO E FINAL DO PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO.**



Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE C- PLANTAS DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen CULTIVADAS SOB CONCENTRAÇÕES DE ZINCO NA PRIMEIRA (ESQUERDA) E SEGUNDA COLETA (DIREITA).**



Fonte: Arquivo Pessoal

**APÊNDICE D- PLANTAS DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen CULTIVADAS SOB CONCENTRAÇÕES DE COBRE NA PRIMEIRA (ESQUERDA) E SEGUNDA COLETA (DIREITA).**



Fonte: Arquivo Pessoal