

YURI ALLYSON PAIVA DE ALBUQUERQUE

**POTENCIAL REMEDIADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia*
(Kunth) DC. (MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS
DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO SULFATO DE NÍQUEL**

Serra Talhada – PE
Fevereiro, 2020

A
L
B
U
Q
U
E
R
R
Q
U
E

Y
A
P

P
O
T
E
N
C
I
A
L

·
·
·
2
0
2
0

YURI ALLYSON PAIVA DE ALBUQUERQUE

POTENCIAL REMEDIADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO SULFATO DE NÍQUEL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Rogério de Aquino Saraiva

Serra Talhada – PE
Fevereiro 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A345p

Albuquerque, Yuri Allyson Paiva de
POTENCIAL REMEDIADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.
(MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO
SULFATO DE NÍQUEL / Yuri Allyson Paiva de Albuquerque. - 2020.
85 f. : il.

Orientador: Rogerio de Aquino Saraiva.
Inclui referências e apêndice(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal
, Serra Talhada, 2020.

1. Metais tóxicos. 2. Estresse oxidativo. 3. Remediação. 4. Metabólitos secundários. 5. Extratos vegetais. I. Saraiva,
Rogerio de Aquino, orient. II. Título

CDD 581.15

POTENCIAL REMEDIADOR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO SULFATO DE NÍQUEL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em 18/02/2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva – UAST/UFRPE

Orientador / Presidente

Profa. Dra. Katya Maria Oliveira de Sousa – UAST/UFRPE

Examinador Externo

Dra. Kelem Silva Fonseca – UAST/UFRPE

Examinador Externo

Primeiramente à Deus, aos meus pais, Lucivânia Paiva e Marcos André, meus irmãos, Ronny Paiva e Lorena Paiva e ao grande profissional no qual quero sempre me inspirar, meu orientador Rogério de Aquino Saraiva.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois sempre iluminou os meus caminhos e me deu coragem para questionar as realidades e propor um novo mundo de possibilidades.

Aos meus pais, Lucivânia Paiva e Marcos André, por toda confiança depositada, pois esse momento só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo esse sonho. Presentearam-me com a riqueza do estudo, formando não só um profissional, mas sobretudo um ser humano. Obrigado por me ensinar a buscar, desejar e nunca perder as esperanças. Obrigado pelo amor, educação, compreensão nas horas que mais precisei. Obrigado por torcerem por mim, amo vocês!

Agradeço ao meu irmão, Ronny Paiva pelo companheirismo, confiança e muitas vezes preocupação comigo nesse tempo que estou fora de casa. Quero ser um bom exemplo para você e também lutar por seus sonhos. Agradeço também a minha irmã Lorena Paiva, que mesmo sendo tão novinha e ter chegado à família recentemente, trouxe uma felicidade incondicional a minha vida. Vocês são dois presentes de Deus em minha vida, ao qual devo toda proteção.

Sou grato as minhas avós, Sara Reis e Elisa Paiva, e meus avôs, Manoel Hermínio e Geraldo Caetano, por terem me dado às mãos na minha infância e caminhado comigo pela vida, com muito carinho, amor e compreensão. Obrigado pelos ensinamentos passados. Sou grato a Deus pela vida de vocês.

As minhas tias, Fabiana, Kalina, Luciana, Geresa, Elizângela e Laniálba, e meus tios, Clodoaldo, Linconl, Emanuel e Gleydson, pelo apoio, incentivo e confiança nos meus objetivos de vida. Apesar de alguns estarem distantes, sei o quanto torceram e torcem pelo meu sucesso.

A todos os meus primos, em especial a Jennifer Suellem, uma prima amiga e irmã, que é sinônimo de muita alegria. Obrigado por muitas vezes ligar e falar palavras de perseverança, me apoiando sempre nas minhas decisões.

Ao meu amigo de apartamento Daniel Goes, que conviveu comigo cada dia de alegria e tristeza aqui em Serra Talhada. Brigamos, sorrimos, brincamos, dançamos, choramos, enfim, compartilhamos vários momentos que ficarão marcados em nossas vidas. Você foi de suma importância no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu parceiro e amigo Aryel Hortega por todo amor, carinho, companheirismo nesses dois anos do meu mestrado. Mesmo distante nunca esqueceu de mim e sempre que podia estava aqui em Serra Talhada comigo. Muito obrigado por ser meu amigo fiel durante esses dois anos,

sem você tudo seria mais difícil para mim.

A minha turma do mestrado 2018.1 pelo companheirismo, amizade, carinho e diversões. Em especial a Janaina Renata, que foi mais que uma amiga, foi uma irmã para mim nesses dois anos. A Ana Maria por toda amizade e carinho. A Patrícia Menezes por toda amizade, companheirismo e alegria. Cinara e Marcela, por toda amizade, diversão, resenha juntos. Enfim, a todos os meus amigos e colegas que fizeram o mestrado de produção vegetal.

Aos meus queridos e eternos professores do mestrado, sem exceção alguma, que orgulho eu tenho de vocês. Vocês são bons no que fazem.

A cada técnico e funcionário que forma toda a equipe da UAST/UFRPE, meu muito obrigado. Vocês são de grande importância para a administração e funcionamento da universidade.

Sou grato aos meus amigos do grupo de pesquisa GEBETox. Janaina, Patrícia, Paulo, Jaqueline, Maria da Saúde, Maraiza, Luana, Robson, Lisandra e Sara, vocês são as peças fundamentais da conclusão desse trabalho. Obrigado pela ajuda mútua no laboratório, pelos momentos de descontração, por cada lanche compartilhado. Mesmo nos momentos mais difíceis, permanecemos unidos até o fim. Vocês são especiais para mim.

Meus eternos agradecimentos a pessoa que foi crucial desde o início desse trabalho, até o término dele. Meu professor, orientador e coordenador do grupo de pesquisa, Rogério de Aquino Saraiva. Falta-me palavras para expressar minha gratidão e admiração por você professor. Durante esses dois anos, sempre estive à disposição para ajudar no que fosse necessário. Obrigado pelos puxões de orelhas e conselhos, que só me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente. Saiba que muitas das coisas que aprendi e irei repassar para outras pessoas, foram frutos colhidos dos seus ensinamentos. Tenho um carinho enorme por você professor e levarei para sempre em minha vida.

Agradeço a FACEPE e a CAPES, pela concessão da bolsa, equipamentos de laboratórios e por nos proporcionar uma formação interdisciplinar de qualidade.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Um mestrado acadêmico excelente e com profissionais qualificados. Tenho muito orgulho de ter feito parte do grupo discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFRPE/UAST.

A vontade de Deus é boa, perfeita e agradável.

(Romanos 12:2)

RESUMO GERAL

ALBUQUEERQUE, Yuri Allyson Paiva. Potencial remediador do extrato das folhas de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (Myrtaceae) sobre o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas ao sulfato de níquel. 2020. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade acadêmica de Serra Talhada (UFRPE - UAST)), Serra Talhada – PE.

O uso inadequado e a longo prazo de fertilizantes fosfatados, o descarte de resíduos industriais e lixo eletrônico, como também, práticas de mineração, são atividades antropogênicas que acarretam na contaminação de solos agrícolas por metais tóxicos em muitas partes do mundo. Uma das respostas primárias das plantas à exposição a altos níveis de metais tóxicos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essa superprodução de EROs nas plantas leva a um estresse oxidativo e conseqüentemente dano celular. Como alternativa para reverter esse problema, estudos recentes têm utilizado extratos vegetais como fonte de biomoléculas com potencial quelante e antioxidante de metais tóxicos. Sendo assim, o presente estudo investigou a efetividade do extrato de folhas de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. como potencial remediador ou protetor do desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas ao sulfato de níquel. O estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com ensaios em quadruplicatas. Os tratamentos consistiram de concentrações isoladas do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) e sulfato de níquel (NiSO_4), das concentrações combinadas (EEEP x NiSO_4) e um controle apenas com água destilada. Foram analisados parâmetros físico-químicos das soluções aplicadas no teste de remediação, bem como parâmetros morfológicos e bioquímicos das plântulas cultivadas. Nos tratamentos combinados (EEEP x NiSO_4), as plântulas apresentaram melhora na sua morfologia e no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos. Sendo assim, o estudo apresentou resultados que evidenciam o papel protetor do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por níquel nas plântulas de *Lactuca sativa* L. No entanto, são necessários novos estudos sobre os mecanismos moleculares relacionados à atividade remediadora do EEEP sobre plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas ao níquel.

PALAVRAS-CHAVE: metais tóxicos; estresse oxidativo; remediação; metabólitos secundários; extratos vegetais.

GENERAL ABSTRACT

ALBUQUEERQUE, Yuri Allyson Paiva. Potential remedy for *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC leaf extract. (Myrtaceae) on the development of *Lactuca sativa* L. seedlings exposed to nickel sulfate. 2020. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade acadêmica de Serra Talhada (UFRPE - UAST)), Serra Talhada – PE.

The inadequate and long-term use of phosphate fertilizers, the disposal of industrial waste and electronic waste, as well as mining practices, are anthropogenic activities that result in the contamination of agricultural soils by toxic metals in many parts of the world. One of the primary responses of plants to exposure to high levels of toxic metals is the production of reactive oxygen species (ROS). This overproduction of ROS in plants leads to oxidative stress and consequently cell damage. As an alternative to reverse this problem, recent studies have used plant extracts as a source of biomolecules with toxic metal chelating and antioxidant potential. Therefore, the present study investigated the effectiveness of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC leaf extract. as a potential remedy or protector for the development of *Lactuca sativa* L. seedlings exposed to nickel sulfate. The study was carried out in a completely randomized design (DIC), with tests in quadruplicates. The treatments consisted of isolated concentrations of the ethanolic extract of *Eugenia punicifolia* (EEEP) and nickel sulfate (NiSO_4), of the combined concentrations (EEEP x NiSO_4) and a control with distilled water only. Physical-chemical parameters of the solutions applied in the remediation test were analyzed, as well as the morphological and biochemical parameters of the cultivated seedlings. In the combined treatments (EEEP x NiSO_4), the seedlings showed improvement in their morphology and in the content of photosynthetic pigments. Thus, the study showed results that demonstrate the protective role of EEEP over nickel-induced phytotoxicity in *Lactuca sativa* L. seedlings. However, further studies on the molecular mechanisms related to EEEP remedial activity on *Lactuca sativa* L seedlings are needed. exposed to nickel.

KEYWORDS: toxic metals; oxidative stress; remediation; secondary metabolites; plant extracts.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Exsicata da espécie *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. coletada no sítio Laje, Triunfo-PE. 27

CAPÍTULO II

Figura 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). A) Formação da coloração azul escuro é um indicativo da presença de cumarinas. B) Formação de um precipitado branco é um indicativo da presença de taninos. 79

Figura 3: Gráfico da CI_{50} (Concentração Inibitória Média), calculado a partir do comprimento radicular de plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). 79

Figura 4: Gráfico da CI_{50} (Concentração Inibitória Média), calculado a partir do comprimento radicular de plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas a diferentes concentrações do $NiSO_4$. Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). 80

Figura 5: Germinação de sementes de *Lactuca sativa* após sete dias de cultivo em microambientes na presença de sulfato de níquel ($NiSO_4$) isolado e combinado com o extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). 81

Figura 6: Efeito do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel ($NiSO_4$) no desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*. 82

Figura 7: Efeito do potencial protetor de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel ($NiSO_4$) no (A) comprimento radicular e (B) comprimento do hipocótilo em *Lactuca sativa* L. Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si na mesma concentração do sulfato de níquel ($NiSO_4$) pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) 82

Figura 8: Parâmetros adotados para qualificação do nível de necrose radicular para plântulas de *Lactuca sativa*, as sentas indicam a presença de necrose. 83

Figura 9: Percentual de necrose radicular das plântulas de *Lactuca sativa* L. cultivadas na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) e sulfato de níquel ($NiSO_4$) isoladas e combinadas. A) Concentrações de $NiSO_4$ ($2,5 \mu g.mL^{-1}$), B) Concentrações de $NiSO_4$ ($5,0 \mu g.mL^{-1}$) e B) $NiSO_4$ ($25,0 \mu g.mL^{-1}$). 84

Figura 10: Estrutura do complexo metálico quercetina de níquel (II) adaptado de Dolatabadi (2011). **85**

Figura 11: Esquema da eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por flavonoides. Adaptado de Dolatabadi (2011). **85**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EEEP). 74
- Tabela 2:** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. 75
- Tabela 3:** Efeito de diferentes concentrações de Sulfato de Níquel (NiSO₄) sobre parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*. 75
- Tabela 4:** Efeito do potencial citoprotetor de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) combinadas com diferentes concentrações do sulfato de níquel (NiSO₄) sobre os parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. 76
- Tabela 5:** Parâmetros físico-químicos das soluções isoladas e combinadas do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) e sulfato de níquel (NiSO₄). 77
- Tabela 6:** Efeito do potencial protetor do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel (NiSO₄) nos níveis dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, totais e carotenoides) de *Lactuca sativa*. 78

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	17
HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESE	19
OBJETIVO GERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO I.....	20
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA: FITOTOXICIDADE DE METAIS E POTENCIAL FITOQUÍMICO DO GÊNERO <i>Eugenia</i> L.....	21
1. Metais tóxicos	21
1.1 Poluição ambiental por metais.....	21
1.2 Níquel (Ni).....	22
1.3 Toxicidade de metais e mecanismos de defesa em plantas	24
2. Gênero <i>Eugenia</i> (Myrtaceae)	25
2.1 Aspectos Botânicos	25
2.2 <i>Eugenia puniceifolia</i>	26
2.3 Usos tradicionais de <i>Eugenia</i> spp.....	27
3. Metabólitos secundários	28
3.1 Metabolismo secundário vegetal.....	28
3.2 Fitoquímica e atividades biológicas do gênero <i>Eugenia</i>	30
4. Remediação.....	31
4.1 Técnicas de remediação	31
4.2 Potencial remediador de <i>Eugenia</i> spp.	32
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II.....	43
CAPÍTULO II - O EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Eugenia puniceifolia</i> L. ATENUA OS EFEITOS TÓXICOS DO NÍQUEL AMBIENTAL EM PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i> L.....	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Coleta do material vegetal e obtenção do Extrato Etanólico de <i>Eugenia puniceifolia</i> (EEEP).....	48
2.2 Prospecção e caracterização fitoquímica qualitativa do extrato de <i>Eugenia puniceifolia</i>	49
2.3 Testes de germinação e desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> L.	49
2.3.1 Delineamento Experimental.....	49
2.3.2 Procedimentos de semeadura.....	50

2.3.3	<i>Avaliação do efeito tóxico do EEEP</i>	50
2.3.4.	<i>Avaliação do efeito tóxico do sulfato de níquel (NiSO₄)</i>	51
2.3.5	<i>Teste de remediação ou efeito protetor do EEEP sobre a toxicidade induzida por Ni</i>	51
2.4	<i>Parâmetros de germinação, desenvolvimento inicial e fitotoxicidade em Lactuca sativa L.</i> ...	52
2.4.1	<i>Porcentagem de germinação (%G)</i>	52
2.4.2	<i>Índice de Velocidade de Germinação (IVG)</i>	53
2.4.3	<i>Comprimento da radícula (CR) e hipocótilo (CH)</i>	53
2.4.4	<i>Índice de Vigor (IV)</i>	53
2.4.5	<i>Índice de tolerância (IT) ao níquel</i>	54
2.4.6	<i>Porcentagem de Necrose Radicular (%NR)</i>	54
2.5	<i>Parâmetros físico-químicos</i>	54
2.6	<i>Determinação das concentrações dos pigmentos fotossintéticos</i>	55
2.7	<i>Análise estatística</i>	56
3.	RESULTADOS	56
3.1	<i>Fitoquímica do EEEP</i>	56
3.2	<i>Efeito tóxico do EEEP em Lactuca sativa L.</i>	56
3.3	<i>Toxicidade do sulfato de níquel (NiSO₄) em Lactuca sativa L.</i>	57
3.4	<i>Teste de remediação ou efeito protetor do EEEP</i>	58
3.5	<i>Parâmetros físico-químicos</i>	59
3.6	<i>Conteúdo de clorofilas a, b, totais e carotenoides</i>	60
4.	DISCUSSÃO	61
4.1	<i>Fitoquímica do extrato etanólico de Eugenia punicifolia L.</i>	61
4.2	<i>Teste do efeito protetor do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por NiSO₄ em plântulas de Lactuca sativa L.</i>	62
4.2.1	<i>Fitotoxicidade do NiSO₄</i>	62
4.2.2	<i>Efeito protetor do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por Ni</i>	65
5.	CONCLUSÃO	67
6.	AGRADECIMENTOS	68
7.	REFERÊNCIAS	68
TABELAS	74
FIGURAS	79

APRESENTAÇÃO

Um problema ambiental conceitual associado ao crescimento populacional urbano no espaço e tempo é o aumento da poluição. A rápida urbanização, industrialização, agricultura extensiva e mineração, não só causaram danos na disponibilidade dos recursos naturais, mas também levaram a contaminação do meio ambiente por metais tóxicos. Nesse contexto, os processos de bioacumulação e biomagnificação de metais tóxicos no ambiente tornaram-se um problema para todos os organismos vivos, incluindo as plantas.

Os metais tóxicos têm a capacidade de interagir com várias moléculas celulares vitais das plantas, levando a um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). Sendo assim, as plantas quando são expostas a níveis tóxicos de metais, podem sofrer danos morfológicos, metabólicos e fisiológicos, que podem variar desde uma clorose nas folhas até uma peroxidação lipídica das membranas celulares.

Uma possibilidade de atenuar ou remover esses contaminantes do ambiente é através das técnicas físicas, químicas e biológicas de remediação. A remediação consiste em reduzir ou eliminar as concentrações existentes de metais tóxicos no ambiente e conseqüentemente sua bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. Sendo assim, a busca por técnicas de remediação que agridam menos o meio ambiente, que sejam economicamente viáveis e forneçam uma solução permanente é de grande importância na recuperação de áreas contaminadas.

Nessa perspectiva, a utilização metabólitos secundários pode ser uma alternativa no processo de remediação de áreas contaminadas com metais tóxicos. Essas biomoléculas podem formar complexos com metais e agir como antioxidantes de várias células. São moléculas naturais, conqüentemente não causam danos ao ambiente, de baixo custo comparado a outras moléculas sintéticas e podem ser extraídas de espécies vegetais.

Dentre as espécies vegetais estudadas, o gênero *Eugenia* se destaca com maior diversidade de espécies na família Myrtaceae. Muitas espécies desse gênero se destacam por apresentarem várias atividades biológicas, bem como a presença de várias biomoléculas do metabolismo secundário.

Sendo assim, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo, no formato de revisão de literatura, procura abordar sobre a problemática da fitotoxicidade

causada nas plantas por níveis elevados de metais tóxicos no ambiente, o potencial fitoquímico do gênero *Eugenia* e as principais técnicas de remediação. O capítulo II, no formato de artigo completo, teve como principal objetivo investigar o efeito remediador de um extrato vegetal sobre a fitotoxicidade induzida por metal tóxico em uma planta modelo.

HIPÓTESE E OBJETIVOS

HIPÓTESE

O extrato etanólico das folhas de *Eugenia punicifolia*, sendo fonte de compostos fenólicos com atividade quelante de metais, é capaz de reduzir a fitotoxicidade induzida por níquel em plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.).

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial remediador do extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EEEP) como modificador da fitotoxicidade induzida por níquel em plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface) cultivada em microambientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a germinabilidade e o desenvolvimento inicial de plântulas de alface na ausência e sob diferentes concentrações de níquel e do EEEP a partir de diferentes parâmetros biométricos e fisiológicos;
- b) Avaliar o efeito protetor do EEEP a partir da análise de parâmetros biométricos e do teor de pigmentos fotossintetizantes de plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de níquel;
- c) Correlacionar o perfil fitoquímico do EEEP com o efeito protetor em plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de níquel;
- d) Propor mecanismos moleculares relacionados à atividade remediadora do EEEP sobre plântulas de alface expostas ao níquel;
- e) Agregar valor de uso aos produtos naturais obtidos da planta *Eugenia punicifolia* e salientar a importância da conservação deste recurso proveniente da biodiversidade brasileira.



CAPÍTULO I

**REVISÃO DE LITERATURA: FITOTOXICIDADE DE METAIS E POTENCIAL
FITOQUÍMICO DO GÊNERO *Eugenia* L.**

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA: FITOTOXICIDADE DE METAIS E POTENCIAL FITOQUÍMICO DO GÊNERO *Eugenia* L.

1. Metais tóxicos

1.1 *Poluição ambiental por metais*

Com a revolução industrial e os avanços tecnológicos dos séculos XX e XXI, têm-se observado um significativo crescimento populacional e um aumento acelerado da industrialização. Com isso, a qualidade de vida melhorou substancialmente ao longo do tempo à custa de uma alta exploração do meio ambiente. Durante o último século, atividades como mineração, curtumes, fundição, aplicação de fertilizantes, pesticidas, descarte de resíduos de indústrias eletrônicas, pilhas e baterias, foram responsáveis pela liberação de grandes quantidades de metais pesados no meio ambiente (JACOB et al., 2018).

A contaminação do meio ambiente por metais tóxicos (anteriormente denominados metais pesados) passou a ser um problema mundial, pois afeta a produtividade das culturas, a fertilidade do solo e conseqüentemente a bioacumulação desses metais em plantas. Solos poluídos com esses metais representam um sério problema para a saúde humana, de animais e plantas, devido a ligação com a cadeia alimentar (solo-planta-humano ou solo-planta-animal-humano (BHARGAVA et al., 2012).

Os metais tóxicos, além de serem incorporados no ambiente por meio de ações antrópicas, podem ser introduzidos naturalmente por processos geoquímicos, intemperismo, lixiviação, entre outros. Por exemplo, o húmus que é a matéria orgânica proveniente da decomposição de animais e plantas, tem a capacidade de sequestrar cátions de metais tóxicos da água. Então, a contaminação depende do material de origem, dos processos pedogenéticos (KUPPUSAMY et al., 2017; CHEN et al., 2015; JACOB et al., 2018).

Dentre os metais tóxicos, o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni), zinco (Zn), alumínio (Al) e manganês (Mn), são os principais ameaçadores do equilíbrio ambiental. Em muitos casos, esses metais agem de forma combinada e seus efeitos excedem o dano causado pelos metais individuais. No entanto, estudos com o efeito de metais combinados ainda é escasso, direcionando pesquisas apenas para o estudo de metais isolados (WANG et al., 2018). Portanto, estratégias devem ser consideradas para amenizar ou remover esses metais dos solos, afim de contribuir para uma sustentabilidade agroecológica, bem como para a saúde humana e de outros organismos.

1.2 Níquel (Ni)

O níquel (Ni) é considerado um importante metal-traço que compreende cerca de 0,008% da crosta terrestre, sendo o quinto elemento mais abundante ambiente (HUSSAIN et al., 2013; SHAHZAD et al., 2018). Uma variedade de produtos, como por exemplo as ligas metálicas, são fabricadas nas indústrias a partir de compostos de Ni (acetato de Ni, carbonato de Ni, hidróxido de Ni e óxido de Ni). Cerca de 150.000 a 180.000 toneladas métricas de Ni estão sendo acrescentadas por ano ao meio ambiente, através de ações naturais e antrópicas (KASPRZAK et al., 2003).

A liberação de Ni no meio ambiente gera grande preocupação devido a sua deposição em solos agrícolas. A queima de combustíveis fósseis, mineração, fundição, descarte de resíduos domésticos, fabricação de aço, indústria de cimento, são algumas das atividades antropogênicas que aceleram a liberação de Ni, aumentando drasticamente as concentrações naturais desse íon no solo e em águas superficiais que são menores que 100 mg/kg e 0,005 mg/L, respectivamente (SHAHZAD et al., 2018).

O Ni é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, uma vez que este atua como cofator de enzimas importantes para o metabolismo vegetal. Anteriormente, o Ni era apenas citado como parte das enzimas urease e glioxalase-I, necessárias para o metabolismo do nitrogênio vegetal (PARIDA et al., 2003; MUSTAFIZ et al., 2014). No entanto, estudos mostram a presença do Ni nas enzimas, hidrogenase, monóxido de carbono desidrogenase, deformilase de peptídeo, acetil-S-coenzima A-sintase, metilcoenzima M redutase e superóxido dismutase (NiSOD) (ERMLER et al. de 1998; MULROONEY, HAUSINGER, 2003).

Bai e colaboradores (2013) relataram que o Ni é vital na conversão de RNAase da urease, sendo outro benefício do Ni no metabolismo do nitrogênio. Outro papel importante do Ni é o aumento da atividade da nitrogênio redutase (NR), observado em cebola, tomate e pepino (ALIBAKHSHI, KHOSHGOFTARMANESH, 2015; GAD et al., 2007; TABATABAEI, 2009).

Acredita-se que o Ni também desempenha um papel importante na fixação biológica de nitrogênio. O Ni está presente na enzima hidrogenase (Ni-Fe), que é responsável por fazer a reciclagem do hidrogênio molecular (H₂), produto obrigatório da redução do nitrogênio (GONZÁLEZ-GUERRERO et al., 2014).

A deficiência dos níveis de Ni pode afetar negativamente o desenvolvimento e o crescimento das plantas, senescência, redução do metabolismo do nitrogênio e absorção de ferro (WOOD et al., 2006; CHEN et al., 2009). Entretanto, apesar do Ni ser um microelemento essencial, em altas concentrações pode causar toxicidade levando a alterações deletérias nas plantas.

As concentrações excessivas de Ni influenciam na estrutura e anatomia das plantas. O crescimento vegetativo, como altura e produção de biomassa são reduzidos na presença do Ni. Estudos têm mostrado efeitos prejudiciais de altas concentrações de Ni na ultraestrutura das folhas e na espessura do mesofilo, tamanho dos feixes vasculares e redução da plasticidade das paredes celulares (SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2006; SHAHZAD et al., 2018).

A presença de altas concentrações de Ni no solo alteram processos fisiológicos das plantas causando clorose e necrose. A perda da funcionalidade das membranas e o equilíbrio iônico do citoplasma das células vegetais são as principais consequências da toxicidade por Ni (PANDEY, SHARMA, 2002; SAAD et al., 2016).

Estudos relatam que altas concentrações de Ni podem reduzir a absorção de outros íons nas raízes das plantas. Uma das razões para essa redução é a competição por sítios de ligação comuns, devido a raios iônicos, que se assemelham ao do Ni (PALLAVI, SHANKAR, 2005; CHEN et al., 2009). A redução da absorção dos íons Mg^{2+} e Fe^{2+} é uma das causas do aparecimento de clorose e necrose nas plantas na presença de altas concentrações de Ni, devido a inibição da biossíntese de clorofila (EWAIS, 1997, KAMRAN et al., 2016).

A atividade fotossintética das plantas pode ser comprometida na presença do Ni, tanto por meio diretos, como indiretos. O bloqueio da síntese de clorofila, redução das atividades enzimáticas do ciclo de Calvin, deficiência de CO_2 devido ao fechamento estomático, redução do tamanho e número de cloroplastos são alguns dos indícios causados pelo efeito do Ni que contribuem para a redução da atividade fotossintética (SEREGIN E IVANOV, 2001).

Embora muitos trabalhos apresentem informações sobre a interação do Ni com outros íons metálicos, estudos sobre a absorção, transporte, translocação e acúmulo de Ni dentro das plantas precisam ser explorados em nível molecular.

1.3 Toxicidade de metais e mecanismos de defesa em plantas

Vários estudos têm documentado efeitos adversos causado por metais tóxicos em plantas como, por exemplo, alterações no padrão de germinação, de crescimento e da morfologia de radículas, caules e folhas. Além disso, muitos estudos evidenciam mudanças na homeostase celular a partir da inibição de enzimas importantes que afetam o metabolismo e o balanço nutricional das plantas (KOCHIAN et al., 2005; MATOS et al., 2007; INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2008; SILVA et al., 2012).

Outro importante dano causado pelo estresse de metais tóxicos em plantas é a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs podem ser encontradas em vários locais, como cloroplastos, mitocôndrias, membranas plasmáticas, paredes celulares, entre outras organelas. As EROs reagem facilmente com outras moléculas e um excesso destas podem tornar os componentes celulares (carboidratos, lipídios, membranas e ácidos nucleicos) mais vulneráveis a oxidação. Essa oxidação acaba prejudicando o metabolismo celular vegetal, podendo levar à morte da planta (YANG et al., 2010).

O acúmulo de EROs por estresse de metais tóxicos pode induzir a aumento de prolina no citosol celular das plantas. A prolina é um aminoácido que tem a função de regular a homeostase osmótica e proteger estruturas celulares. O aumento desse aminoácido é uma resposta adaptativa vegetal a estresses abióticos, como seca, salinidade e exposição a metais tóxicos (BHAMBURDEKAR; CHAVAN, 2011; YILMAZ et al., 2012, TALEBI et al., 2014).

Uma das consequências mais severas causadas por metais tóxicos em plantas é a peroxidação lipídica. Esse efeito leva a lise da membrana plasmática, causando a morte celular. Essa deterioração da membrana plasmática celular é determinada pela presença de malondialdeído (MDA), produto da degradação de ácidos graxos, antes presente na bicamada lipídica da membrana celular. O MDA é considerado um indicador do estresse oxidativo (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005).

As plantas possuem estratégias para evitar ou tolerar a toxicidade de metais pesados. Primeiramente, estruturas morfológicas como paredes celulares, cutículas, tricomas ou a simbiose micorrízica podem driblar o efeito tóxico desses metais, servindo como barreiras. No entanto, quando os metais pesados superam essas barreiras celulares, esses íons metálicos conseguem chegar até às células vegetais (HALL, 2002; WONG ET AL., 2004; HARADA ET AL., 2010).

A biossíntese de moléculas celulares por plantas é outra forma de evitar a toxicidade de

metais tóxicos sobre seu metabolismo. Biomoléculas como: putrescina, espermina, ácidos orgânicos, glutathiona, fitoquelatinas, e metalotioneínas ou exsudatos celulares, como flavonoides, compostos fenólicos, aminoácidos específicos, como prolina e histidina; e hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, possuem a função de evitar o dano causado por metais pesados no interior das células vegetais (SHARMA; DIETZ, 2006; VIEHWEGER, 2014; DALVI; BHALERAO, 2013). Uma vez que as biomoléculas vegetais não conseguem evitar a intoxicação por metais tóxicos, há um desequilíbrio no redox celular das plantas, levando a um aumento na produção de ERO (MOURATO; REIS; MARTINS, 2012).

As plantas possuem mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que tem a função de eliminar esses radicais livres formados pela presença de metais pesados. Os antioxidantes enzimáticos presentes nas plantas são o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR). Os antioxidantes não enzimáticos conhecidos são o ascorbato (AsA), glutathiona (GSH), carotenoides, alcaloides, tocoferóis, prolina e compostos fenólicos (flavanóides, taninos e lignina), que tem a função de sequestrar radicais livres (RASTGOO; ALEMZADEH; AFSHARIFAR, 2011; MICHALAK, 2006; SHARMA et. al., 2012).

Essas biomoléculas responsáveis pela desintoxicação de plantas por metais pesados podem ter várias funções ao mesmo tempo, como quelante e antioxidante. Muitos desses mecanismos de defesa das plantas vai depender de espécie para espécie, do nível de tolerância da planta a cada tipo de metal pesado e o seu estágio de desenvolvimento (SOLANKI; DHANKHAR, 2011).

2. Gênero *Eugenia* (Myrtaceae)

2.1 Aspectos Botânicos

O gênero *Eugenia* L. compreende cerca de 1108 espécies em todo o mundo (World Checklist of Selected Plant Families – WCSP, 2017), sendo um dos maiores gêneros e mais importantes da família Myrtaceae. No Brasil, o gênero apresenta cerca de 700 espécies distribuídas em todos os ecossistemas brasileiros (FLORA DO BRASIL, 2018).

Em Pernambuco, espécies do gênero *Eugenia* são encontradas em formações florestais denominadas Matas Serranas ou Brejos de Altitude, localizadas na parte oriental do Planalto da Borborema. Essas formações possuem altitudes superiores a 500 m, próximas a encostas e topos

de serras. Espécies de *Eugenia* encontradas nesses locais apresentam táxons semelhantes aos que ocorrem na Amazônia (MAIA et al., 1997).

Espécies do gênero *Eugenia* se apresentam em forma de árvore ou arbustos, inflorescência do tipo racemo, cálice 4-mero, corola 4-mera, ovário 2-locular e hipanto acima do ovário não prolongado. Flores tetrâmeras e estames numerosos. Frutos globosos, subglobosos e elipsoides, bagas alaranjados, amarelas, vermelhas, até pretas quando maduros, com cálice. Sementes de 1-3, cotilédones globosos e carnosos (MAZINE et al. 2014).

Em 1855-1857 o gênero *Eugenia* foi dividido em oito seções com estudos relacionados a sua inflorescência, onde os indivíduos não se mostraram descendentes de um único ancestral comum (BERG, 1855-1857). Então, o gênero foi redefinido em oito clados por Mazine e colaboradores (2014), com base em dados moleculares. Cinco clados foram definidos com base na presença de brácteas persistentes (Clados 5,6,7,8 e 9) e três clados classificados na presença de tricomas no lóculo das espécies desse gênero (MAZINE et al. 2014).

2.2 Eugenia puniceifolia

Eugenia puniceifolia (Kunth) DC, conhecida como pedra-ume-kaá, pedra-ume, murta ou muta, é um arbusto de 1 a 4 m de altura amplamente distribuído na região amazônica e no bioma Cerrado. Essa espécie foi registrada pelo naturalista francês August de Saint-Hilaire em suas viagens ao Brasil nos anos 1816 e 1822 (BRANDÃO et al., 2012; BASTING et al., 2014). Apesar de ser uma espécie com grande distribuição na região da Amazônia, ocorrências dessa espécie já foram descritas em Brejos de Altitude, no município de Triunfo-PE.



Figura 1: Exsicata da espécie *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. coletada no sítio Laje, Triunfo-PE.

2.3 Usos tradicionais de *Eugenia* spp.

Um estudo bibliográfico realizado por Lamarca e colaboradores (2013) identificou os usos tradicionais de *Eugenia* spp. em várias regiões do Brasil. O uso da madeira, bastante explorado na região Norte, é utilizada na confecção de cabos de ferramentas, cercas de proteção envolvidas com arames ou como fonte de energia, para aquecer residências contra o frio e servir de lenha para cozinhar.

Como uso medicinal, as comunidades locais utilizam as folhas, frutos e cascas de *Eugenia* spp. no tratamento de doenças estomacais, diabetes, hipertensão, febre, obesidade, reumatismo e bronquite. Muitas dessas propriedades medicinais já foram comprovadas cientificamente (LAMARCA et al., 2013).

O uso dos frutos da espécie *Eugenia uniflora* é comum na alimentação de comunidades locais. Em diversas regiões do Brasil os frutos da pitangueira são utilizados como fonte de nutrientes, sendo a única espécie desse gênero reconhecida pela legislação brasileira dentro dos padrões de qualidade para polpa de fruta (LAMARCA et al., 2013; Instrução Normativa nº 01 de 07 de janeiro de 2000, BRASIL 2000).

3. Metabólitos secundários

3.1 Metabolismo secundário vegetal

As plantas produzem naturalmente milhares de compostos orgânicos que são divididos em duas classes: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são considerados essenciais para as plantas, pois estão diretamente ligados no crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo biomoléculas comuns para todas as plantas. Por outro lado, os metabólitos secundários, derivados do metabolismo primário, são diversos em sua natureza química. São moléculas indispensáveis para as plantas, pois fazem forte interação com o ambiente para sua sobrevivência e adequação, o que torna essas biomoléculas tão importantes quanto os metabólitos primários (KLIEBENSTEIN, 2012, PATRA et al., 2013).

Cerca de 100.000 metabólitos secundários são produzidos no reino vegetal, provenientes de vias básicas, como as vias da glicólise ou do ácido chiquímico, e posteriormente se diversificam, dependendo dos fatores bióticos e abióticos presentes. Com base na via da biossíntese, os metabólitos secundários são classificados em três grupos: terpenos (ou isoprenóides), compostos fenólicos (fenilpropanóides e flavonoides) e compostos contendo nitrogênio (alcaloides, glicosinolato e glicosídeos cianogênicos) (FANG et al., 2011; PATRA et al., 2013).

Os terpenos são sintetizados em plantas através de duas vias diferentes, a via do mevalonato (MVA) e a do metileritritol 4-fosfato (MEP). A via do MEP tem a função de sintetizar os monoterpênicos e diterpenos, isopreno, carotenoides, fitohormônios, giberelinas, ácido abscísico, fitol, plastoquinonas, filoquinonas, tocoferóis e clorofilas. Já a via do MVA produz sesquiterpenos, esteróis, brassinosteróides e polifenóis (PATERAKI; KANELLIS,

2010).

Os terpenos (isoprenos) são compostos contendo cinco átomos de carbono podendo ser chamado de metil-buta-1,3-dieno. Na presença de duas unidades de isoprenos, os terpenos recebem a denominação de monoterpenos, sesquiterpenos para três unidades de isoprenos, diterpenos para quatro unidades, sesterpenos para cinco, triterpenos para seis e carotenoides para oito unidades de isoprenos. Os terpenos são encontrados em muitos óleos essenciais de diversas plantas e já foi relatado na literatura atividade bioinseticida desse metabólito (RICHTER et al., 1922, VERMA; SHUKLA, 2015).

Os compostos fenólicos são formados por duas vias, a do ácido malônico e chiquímico. A via do ácido malônico é menos comum em plantas, sendo significativa para bactérias e fungos. Já a via do ácido chiquímico, presente nas plantas, é responsável por converter derivados da glicólise e o fosfato de pentose em diferentes aminoácidos aromáticos, como por exemplo a fenilalanina. Os compostos fenólicos foram divididos em grupos, tais como flavonoides, taninos, cumarinas, lignanas, ligninas, estibenos, estilipirona e arilpirona (VERMA; SHUKLA, 2015).

Um dos principais compostos fenólicos encontrando nas plantas são os flavonoides, pigmentos vegetais que se diferenciam pela sua coloração. São conhecidos mais de 2000 flavonoides e segundo o seu grau de oxigenação, esses compostos podem ser classificados em quatro grupos: flavonas (apegenina, luteolina), flavonóis (kampferol, quercetina), antocianinas e isoflavonas. Possuem papel fundamental no crescimento das plantas e na defesa contra micróbios e insetos (VERMA; SHUKLA, 2015).

Os compostos fenólicos são importantes para as plantas, pois possuem atividade antioxidante devido as suas propriedades redox, ou seja, doadores de hidrogênio, agentes redutores e inibidores de oxigênio singlete (HUANG et al., 2010; NAGHILOO et al., 2012a)

Outra categoria dos metabólitos secundários em plantas inclui compostos contendo nitrogênio, como os alcaloides, glicosinolatos e glicosídeos cianogênicos. Os alcaloides são formados a partir de aminoácidos como lisina, tirosina e triptofano, podendo ser classificados como alcaloides terpenóides (vimblastina, vincristina), alcaloides benzilisoquinolínicos, alcaloides purínicos (caféina), alcaloides tropânicos (cocaína) e nicotina. Muitos alcaloides produzidos por plantas são utilizados farmacologicamente no tratamento de doenças terminais (PATRA et al., 2013; VERMA; SHUKLA, 2015).

3.2 Fitoquímica e atividades biológicas do gênero Eugenia

O perfil fitoquímico de plantas do gênero *Eugenia* depende de espécie para espécie e é característico por ser rico em compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, além de terpenóides e óleos essenciais (EINBOND et al., 2004). No entanto, estudos mostram a presença de outros metabólitos secundários em espécies desse gênero.

Estudos realizados com extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia puniceifolia* mostraram a presença de compostos derivados de flavonoides e galotaninas. Teores de proantocianidinas, ácido gálico, quercetina e miricetina foram determinados nessa espécie (BASTING et al., 2014).

Outros componentes bioativos já foram elucidados em outras espécies de *Eugenia*, tais como triterpenos (β -sitosterol, ácido betulínico, ácido cratególico e ácido oleanólico), ácidos fenólicos (ácido elágico e seus derivados) e flavonoides (derivados de miricetina, mirricitrina e kaempferol) (DAMETTO et al., 2017). Esses bioativos vegetais tem apresentado diversas atividades biológicas cientificamente comprovadas.

Estudos revelaram atividades biológicas de metabólitos secundários derivados de *Eugenia* spp., tais como: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, analgésica, hipotensiva, gastroprotetor, hepatoprotetor, cardioprotetor, antidiarreico, antialérgico, antipirético, antineoplásico, quimiopreventivo e anticlastogênico (AYYANAR; SUBASH-BABU, IGNACIMUTHU 2012, BALIGA et al., 2011, MURUGANANDAN et al., 2001, SANCHES et al., 2016, SHARMA et al., 2006, SHARMA et al., 2013).

Atividades biológicas gastroprotetoras e anti-inflamatórias foram observadas em roedores quando submetidos a tratamentos com o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia puniceifolia* (BASTING et al., 2014). Atividades antioxidantes foram observadas em um estudo in vitro realizado por Galeno e colaboradores (2014) utilizando extratos dessa espécie. Outro estudo mostrou a eficiência do extrato de folhas de *Eugenia puniceifolia* no tratamento de diabetes melitus tipo 2 em ratos (SALES et al., 2014). Sendo assim, biomoléculas provenientes do metabolismo secundário de plantas são de grande interesse, tanto farmacológico, quanto para estudos envolvendo ecotoxicologia, devido ao potencial antioxidante de diversas moléculas.

4. Remediação

4.1 Técnicas de remediação

O aumento na absorção de metais tóxicos pelas culturas alimentares e vegetais é em resposta ao incremento excessivo dessas substâncias tóxicas em solos agrícolas. No entanto, existe um grande preocupação global em analisar nos solos e nas culturas cultivadas a quantidade de metais tóxicos disponíveis e que são permitidos dentro dos limites regulamentares, pois é sabido que a presença excessiva desses poluentes pode causar sérios problemas à saúde humana (XIONG et al., 2016a , PIERART et al., 2015; KHALID, 2017).

A implantação de tecnologias de remediação de solos contaminados vem sendo desenvolvida nas últimas duas décadas. Essas técnicas tem como objetivo diminuir as frações disponíveis de metais tóxicos no solo e conseqüentemente sua acumulação na cadeia alimentar. As técnicas de remedição que vem sendo utilizadas são baseadas em métodos físicos, químicos e biológicos, tanto *in-situ*, como *ex-situ* (BHARGAVA et al., 2012; VERBRUGGEN et al., 2009, MURTAZA et al., 2014; KHALID, 2017).

Na remediação física, existem técnicas de substituição do solo, isolamento do solo, vitrificação, e remediação eletrocinética. A substituição do solo visa substituir totalmente ou parcialmente o solo contaminado pelo solo não contaminado. Essa técnica dilui os metais pesados existentes no solo aumentando sua funcionalidade (YAO et al., 2012). O isolamento do solo consiste em separar o solo contaminado de metais pesados do solo não contaminado, evitando a movimentação externa desses poluentes e restringindo dentro de uma área específica (ZHENG;WANG, 2002 ; ZHU et al., 2012). A vitrificação é um técnica que tem a função de aplicar tratamentos de altas temperaturas no local contaminado levando a formação de um material vítreo. Na vitrificação, alguns metais podem ser volatilizados sob altas temperaturas (MALLAMPATI et al., 2015; KHALID, 2017) . Por fim, a remediação eletrocinética é um método que opera gerando um gradiente de campo elétrico, em dois lados de um tanque eletrolítico contendo o solo contaminado. Os metais pesados são separados por eletroforese, infiltração elétrica, ou eletro-imigração, diminuindo a contaminação (YAO et al., 2012).

Na remedição química, existem técnicas de imobilização do contaminante, encapsulamento e lavagem do solo. A imobilização consiste na diminuição da mobilidade dos metais, na presença de agentes imobilizantes nos solos contaminados. Esta técnica pode imobilizar os metais por precipitação, complexação ou adsorção, redistribuindo os metais do solo para partículas sólidas (SHAHID et al., 2014c , AUSTRUY et al., 2014 , ASHRAF et al.,

2016). O encapsulamento tem a função de envolver a mistura dos solos contaminados com outros produtos, como concreto, cal ou asfalto. O solo contaminado envolvido com o produto torna-se imóvel evitando a contaminação do solo circundante (PANDEY et al., 2012). A técnica de lavagem do solo refere-se a remoção dos metais pesados através de reagentes e extratos, lixiviando esses contaminantes dos solos. Os reagentes e o solo são misturados por um tempo determinado e através de precipitação, troca de íons, quelação e adsorção, o metal pesado é transferido do solo para a fase líquida e separados por lixiviação (FERRARO et al., 2015).

Na remediação biológica, pode-se citar como exemplo o processo da fitorremediação, que consiste no uso de plantas associadas ao solo para diminuir as concentrações tóxicas de contaminantes no ambiente (ALI et al., 2013). É uma das opções mais viáveis para corrigir e restabelecer as condições naturais de solos contaminados, pois são técnicas econômicas, não invasivas e fornecem uma solução permanente (KHALID, 2017). No entanto, é uma técnica que demora muito tempo para limpeza do contaminante, as plantas hiperacumuladoras de metal é limitada por sua baixa taxa de crescimento e biomassa, é aplicável em locais com níveis baixos a moderados de contaminação e tem risco de contaminação da cadeia alimentar em caso de falta de cuidados adequados (ALI et al., 2013). Na biorremediação, são usados microrganismos (fungos, bactérias, algas) ou enzimas isoladas capazes de degradar ou conter o contaminante (ALI et al., 2013). Sendo assim, a busca por melhorias da fitorremediação ou novas técnicas de remediação biológica vem sendo estudadas nos últimos anos.

Pesquisas na área da remediação biológica são interdisciplinares por natureza e requer conhecimentos básicos em química do solo, biologia vegetal, ecologia, microbiologia do solo e engenharia ambiental. Então, novos estudos sobre a compreensão da química dos metais tóxicos dentro dos tecidos das plantas ajudará os pesquisadores nos processos de remediação (SARASWAT; RAI, 2011; ALI et al., 2013).

4.2 Potencial remediador de Eugenia spp.

Um estudo realizado por Sobral-Souza (2014) mostrou atividade quelante moderada e potencial citoprotetor do extrato de *Eugenia jambolana*. O trabalho foi realizado com germinação e desenvolvimento inicial de sementes de *Lactuca sativa*, submetida a exposição de cloreto de mercúrio. Os autores observaram que a interação do extrato vegetal com cloreto de mercúrio proporciona melhor crescimento de radículas e plúmulas de *Lactuca sativa*, mostrando que *E. jambolana* pode ser uma solução alternativa ao problema de contaminação por metais tóxicos.

Cunha e colaboradores (2016) estudaram o efeito citoprotetor de *Eugenia uniflora* contra o contaminante cloreto de mercúrio. Os resultados mostraram que os fitoquímicos presentes no extrato etanólico de *E. uniflora*, principalmente fenóis e flavonoides, podem proteger diferentes organismos contra os danos do metal tóxico devido à quelatação ou potencial antioxidante, sendo uma abordagem nova e interessante para a recuperação de ambientes contaminados por metais tóxicos.

REFERÊNCIAS

- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.
- ALIBAKHSHI, M.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H. Effects of nickel nutrition in the mineral form and complexed with histidine in the nitrogen metabolism of onion bulb. **Plant growth regulation**, v. 75, n. 3, p. 733-740, 2015.
- ASHRAF, A. et al. Chromium (VI) immobilisation efficiency of acid-1 activated banana peel over organo-montmorillonite in aquatic environments. **International Journal Phytoremediation** [http://dx. doi. org/10.1080/15226514.2016](http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016), v. 1256372, 2016.
- AUSTRUY, A. et al. Mechanisms of metal-phosphates formation in the rhizosphere soils of pea and tomato: environmental and sanitary consequences. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 4, p. 666-678, 2014.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary therapies in medicine**, v. 21, n. 3, p. 232-243, 2013.
- BAI, C.; LIU, L.; WOOD, B. W. Nickel affects xylem Sap RNase a and converts RNase A to a urease. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 207, 2013.
- BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.
- BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 257-267, 2014.
- BERG, O. Myrtaceae. In: C.F.P. Martius (ed.), **Flora Brasiliensis**. Vol. 14, pars 1. F. Fleischer, Monachii & Lipsiae, p. 430–465, 1857–1859.
- BHAMBURDEKAR, S. B.; CHAVAN, P. D. Effect of some stresses on free proline content during pigeonpea (*Cajanas cajan*) seed germination. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 3, 2011.

BHARGAVA, A. et al. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of environmental management**, v. 105, p. 103-120, 2012.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 488-500, 2012.

BRASIL. **Instrução normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000**. Ministério da agricultura e do abastecimento, Seção 1, p.54.

CHEN, C.; HUANG, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 37, n. 4-5, p. 304-313, 2009.

CHEN, M. et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 745-755, 2015.

CUNHA, F. A. B. et al. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4197-4203, 2019.

DALVI, A. A.; BHALERAO, S. A. Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. **Annals of Plant Sciences**, v. 2, n. 9, p. 362-368, 2013.

DAMETTO, A. C. et al. Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam.(Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 490-502, 2017.

DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and experimental botany**, v. 53, n. 3, p. 247-257, 2005.

EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

ERMLER, U. et al. Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 6, p. 749-758, 1998.

Eugenia in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10338>>.

Acesso em: 16 Set. 2018

EWAIS, E. A. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 403-410, 1997.

FANG X., YANG C. M. A. Q., YANG L., CHEN X. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v. 33, p. 53–64, 2011.

FERRARO, A. et al. Application of an electrochemical treatment for EDDS soil washing solution regeneration and reuse in a multi-step soil washing process: case of a Cu contaminated soil. **Journal of environmental management**, v. 163, p. 62-69, 2015.

GAD, N.; EL-SHERIF, M. H.; EL-GEREEDLY, N. H. M. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 286-293, 2007.

GALENO, D. M. L. et al. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 311-324, 2014.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M. et al. Fixating on metals: new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 45, 2014.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HARADA, E. et al. Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. **Plant and cell physiology**, v. 51, n. 10, p. 1627-1637, 2010.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and cancer**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2009.

HUSSAIN, M. B. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to nickel stress: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 17, p. 1596-1602, 2013.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. et al. Resistance mechanisms of aluminum (Al^{3+}) phytotoxicity in cereals: physiological, genetic and molecular bases. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 8, p. 57-71, 2008.

JACOB, J. M. et al. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 56-70, 2018.

KAMRAN, M. A. et al. Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 126, p. 256-263, 2016.

KASPRZAK, K.S., SUNDERMAN JR., F.W., SALNIKOW, K. Nickel carcinogenesis. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 533 (1–2), p. 67–97, 2003.

KHALID, S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.

KLIEBENSTEIN, Daniel J. Making new molecules—evolution of structures for novel metabolites in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 1, p. 112-117, 2013.

KOCHIAN, Leon V.; PINEROS, Miguel A.; HOEKENGA, Owen A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. In: **Root physiology: from gene to function**. Springer, Dordrecht, 2005. p. 175-195.

KUPPUSAMY, S. et al. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, v. 168, p. 944-968, 2017.

LAMARCA, E. V. et al. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 119-130, 2013.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential Oil of *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 337-338, 1997.

MALLAMPATI, S. R. et al. Dynamic immobilization of simulated radionuclide ^{137}Cs in soil by thermal treatment/vitrification with nanometallic Ca/CaO composites. **Journal of environmental radioactivity**, v. 139, p. 118-124, 2015.

- MATOS, M. et al. Detection and mapping of SSRs in rye ESTs from aluminium-stressed roots. **Molecular breeding**, v. 20, n. 2, p. 103-115, 2007.
- MAZINE, Fiorella Fernanda et al. A preliminary phylogenetic analysis of *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with a focus on Neotropical species. **Kew Bulletin**, v. 69, n. 2, p. 9497, 2014.
- MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, 2006.
- MOURATO, M.; REIS, R.; MARTINS, L. L. Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. **Advances in selected plant physiology aspects**, v. 398, 2012.
- MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 239-261, 2003.
- MURTAZA, G. et al. Soil contaminants: sources, effects, and approaches for remediation. In: **Improvement of crops in the era of climatic changes**. Springer, New York, NY, 2014. p. 171-196.
- MURUGANANDAN, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v. 72, n. 4, p. 369-375, 2001.
- MUSTAFIZ, A. et al. A unique Ni²⁺-dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. **The Plant Journal**, v. 78, n. 6, p. 951-963, 2014.
- NAGHILOO, S. et al. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam.(Fabaceae). **BioImpacts: BI**, v. 2, n. 2, p. 105, 2012.
- PANDEY, N.; SHARMA, C. P. Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 753-758, 2002.
- PARIDA, B. K.; CHHIBBA, I. M.; NAYYAR, V. K. Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. **Scientia horticulturae**, v. 98, n. 2, p. 113-119, 2003.

- PATERAKI, I.; KANELLIS, A. K. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. **Plant cell reports**, v. 29, n. 6, p. 629-641, 2010.
- PATRA, B. et al. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, 2013.
- PIERART, A. et al. Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. **Journal of hazardous materials**, v. 289, p. 219-234, 2015.
- RASTGOO, L. et al. Isolation of two novel isoforms encoding zinc-and copper-transporting P1B-ATPase from Gouan (*Aeluropus littoralis*). **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 7, p. 377-383, 2011.
- RICHTER, V. V. et al. Rodd's Chemistry of the Carbon Compounds: Volume I - **Chemistry of the aliphatic series**. 2. ed. Londres. 1922.
- SAAD, Ramez et al. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: a pre-requisite for optimization of agromining. **Environmental and Experimental Botany**, v. 131, p. 1-9, 2016.
- SALES, D. S. et al. *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. as an Adjuvant Treatment for Type-2 Diabetes Mellitus: A non-Controlled, Pilot Study. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 12, p. 1816-1821, 2014.
- SANCHES, J. R. et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 48, 2016.
- SARASWAT, S.; RAI, J. P. N. Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 10, n. 4, p. 327-339, 2011.
- SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian journal of plant physiology**, v. 48, n. 4, p. 523-544, 2001.
- SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.

- SHAHID, M. et al. Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food-chain contamination. **Journal of soils and sediments**, v. 14, n. 4, p. 655-665, 2014.
- SHAHZAD, B. et al. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment-A review. **Plant physiology and biochemistry**, v. 132, p. 641-651, 2018.
- SHARMA, B. et al. Liver protective effects of aqueous extract of *Syzygium cumini* in Swiss albino mice on alloxan induced diabetes mellitus. **Journal of pharmacy research**, v. 6, n. 8, p. 853-858, 2013.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, p.26, 2012.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.
- SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 367-373, 2006.
- SHARMA, S. S., DIETZ, K. J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **The Journal of Experimental Botany**, vol. 57, n. 4, p. 711–726, 2006.
- SILVA, S. et al. Al toxicity mechanism in tolerant and sensitive rye genotypes. **Environmental and experimental botany**, v. 75, p. 89-97, 2012.
- SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 165-170, 2014.
- SOLANKI, R.; DHANKHAR, R. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. **Biologia**, v. 66, n. 2, p. 195-204, 2011.
- TABATABAEI, S. J. Supplements of nickel affect yield, quality, and nitrogen metabolism when urea or nitrate is the sole nitrogen source for cucumber. **Journal of plant nutrition**, v. 32, n. 5, p. 713-724, 2009.
- TALEBI, S.; NABAVI, K. S. M.; SOHANI, D. A. L. The study effects of heavy metals on germination characteristics and proline content of Triticale (Triticoseale

Wittmack). **International Journal Farming and Allied Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1080-1087, 2014.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New phytologist**, v. 181, n. 4, p. 759-776, 2009.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105-113, 2015.

VIEHWEGER, Katrin. How plants cope with heavy metals. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 35, 2014.

WANG, G. et al. Effect of soil washing with biodegradable chelators on the toxicity of residual metals and soil biological properties. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 1021-1029, 2018.

WCSP (World Checklist of Selected Plant Families). **World checklist of selected plant families**. [http:// www.kew.org/wcsp/myrtaceae](http://www.kew.org/wcsp/myrtaceae). Accessed september 18, 2017.

WONG, Hann Ling et al. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant physiology**, v. 135, n. 3, p. 1447-1456, 2004.

WOOD, B.W., REILLY, C.C., NYCZEPIR, A.P. Field deficiency of nickel in trees: symptoms and causes. **Acta Horticulture. (Wagening.)**, v. 721, p. 83–98, 2006.

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, 2011.

XIONG, T. et al. Kinetic study of phytotoxicity induced by foliar lead uptake for vegetables exposed to fine particles and implications for sustainable urban agriculture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 46, p. 16-27, 2016.

YANG, Yingli et al. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 8, p. 1982-1987, 2010.

YAO, Z. et al. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 722-729, 2012.

YILMAZ, D. D.; URUÇ-PARLAK, K. A. D. I. R. I. Y. E.; VURAL, C. Toxicological effects, oxidative stress and bio-accumulation in the tissues of *Phaseolus vulgaris* L. bean seedlings following cadmium exposure. **Ekol Bratisl**, v. 31, p. 92-104, 2012.

ZHENG, Chunmiao; WANG, P. Patrick. A field demonstration of the simulation optimization approach for remediation system design. **Groundwater**, v. 40, n. 3, p. 258-266, 2002.

ZHU, L. et al. Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem. **Bioresource technology**, v. 108, p. 1-7, 2012.



CAPÍTULO II

O extrato etanólico das folhas de *Eugenia punicifolia* atenua os efeitos tóxicos do níquel ambiental em plântulas de *Lactuca sativa*.

CAPÍTULO II - O EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* L. ATENUA OS EFEITOS TÓXICOS DO NÍQUEL AMBIENTAL EM PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* L.

Albuquerque, Yuri A. P. ^(a); Silva, Janaina R. ^(a); Costa-Maciel, Patrícia M. ^(a); Silva, Maria S. ^(a); Saraiva, Rogério A. ^{(a)*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Av. Gregório Ferraz Nogueira S/N, Serra Talhada, PE, Brasil.

*Autor correspondente. Email: rogerioaqsaraiva@gmail.com.

RESUMO

O descarte e lançamento inadequado de contaminantes ambientais podem elevar as concentrações de metais tóxicos no solo. Em plantas, as altas concentrações de metais podem acarretar em bioacumulação, danos no DNA, aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio e alterações morfológicas. Tendo em vista a necessidade de se desenvolver técnicas de contenção ou remoção química de metais tóxicos do solo para atenuar ou anular os efeitos deletérios sobre cultivares, além do conhecimento de plantas do gênero *Eugenia* como fonte de moléculas potencialmente quelantes e menos tóxicas ao ambiente, o trabalho objetivou avaliar o potencial remediador do extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* como modificador da fitotoxicidade induzida por níquel em *Lactuca sativa* L. (alface). O material vegetal foi coletado no Sítio Laje, município de Triunfo, Pernambuco, Brasil para obtenção do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). Foi realizado a caracterização fitoquímica qualitativa do EEEP para identificação dos metabólitos secundários e avaliados os parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. na presença e ausência do NiSO₄ e do EEEP, bem como eles isolados e combinados. Por fim, foi determinado as concentrações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, totais e carotenoides). Os resultados mostraram efeitos tóxicos do NiSO₄ sobre as plântulas da alface, reduzindo a velocidade de germinação, vigor das plântulas, tolerância, tamanho radicular, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, além do aparecimento de necrose radicular total e parcial. No entanto, na presença do EEEP, a toxicidade do NiSO₄ sobre as plântulas foi reduzida consideravelmente. Foi observado um

aumento na velocidade de germinação, no vigor das plântulas, na tolerância ao estressor, no comprimento das radículas, nos níveis dos pigmentos fotossintéticos e melhora dos danos de necrose radicular. Os resultados sugerem que o EEEP atenua consideravelmente a toxicidade do Ni nas plântulas da alface, impedindo a absorção desses íons e reduzindo o estresse oxidativo nas plântulas.

PALAVRAS CHAVE: *Eugenia*, quelantes, toxicidade, avaliação citoprotetor.

ABSTRACT

The improper disposal and release of environmental contaminants can increase the concentrations of toxic metals in the soil. In plants, high concentrations of metals can lead to bioaccumulation, DNA damage, increased concentration of reactive oxygen species and morphological changes. In view of the need to develop techniques for the containment or chemical removal of toxic metals from the soil to attenuate or cancel the deleterious effects on cultivars, in addition to the knowledge of plants of the genus *Eugenia* as a source of potentially chelating molecules that are less toxic to the environment, the This work aimed to evaluate the remedial potential of the ethanolic extract of *Eugenia punicifolia* leaves as a modifier of nickel-induced phytotoxicity in *Lactuca sativa* L. (lettuce). The plant material was collected at Sítio Laje, municipality of Triunfo / PE to obtain the ethanolic extract of *Eugenia punicifolia* (EEEP). Qualitative phytochemical characterization of EEEP was performed to identify secondary metabolites and evaluated the parameters of germination and initial development of *Lactuca sativa* L. in the presence and absence of NiSO₄ and EEEP, as well as isolated and combined. Finally, the concentrations of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, totals and carotenoids) were determined. The results showed toxic effects of NiSO₄ on lettuce seedlings, reducing germination speed, seedling vigor, tolerance, root size, photosynthetic pigment content, in addition to the appearance of total and partial root necrosis. However, in the presence of EEEP, the toxicity of NiSO₄ on seedlings was reduced considerably. An increase in germination speed,

seedling vigor, stressor tolerance, root length, photosynthetic pigment levels and improvement of root necrosis damage were observed. The results suggest that EEEP considerably relieves Ni toxicity in lettuce seedlings, preventing the absorption of these ions and reducing oxidative stress in seedlings.

KEYWORDS: *Eugenia*, chelators, toxicity, cytoprotective evaluation.

1. INTRODUÇÃO

O descarte de resíduos industriais e a realização inadequada de práticas agrícolas, como aplicação excessiva de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, podem elevar as concentrações ambientais dos metais tóxicos no solo (WUANA e OKIEIMEN, 2011). Os metais tóxicos constituem um grupo de contaminantes ambientais com alta capacidade de persistência em ambientes, uma vez que estes possuem alta afinidade com metaloproteínas diversas e enzimas sulfidrílicas. Esses contaminantes, em altas concentrações, podem trazer prejuízos ao metabolismo basal dos organismos vivos, estresse oxidativo, dano ao DNA e morte celular (PIECHALAK et al., 2002; ROCHA et al., 2012).

Entre os metais tóxicos, o níquel (Ni) se destaca sendo o quinto elemento mais abundante no ambiente. Em baixas concentrações (0,05-10 mg/kg de peso seco), é considerado um microelemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, devido a sua presença em enzimas importantes, como por exemplo, na enzima urease. No entanto, atividades antropogênicas como a mineração, aceleram a liberação desse elemento no ambiente, tornando-se um sério problema para as plantas (SHAHZAD et al., 2018).

Em plantas, as altas concentrações de Ni podem acarretar em bioacumulação, gerando danos no DNA, oxidativos e alterações morfológicas em raízes, folhas, frutos e sementes, contribuindo para a mortalidade das plantas expostas, biomagnificação ou, extinção de espécies em longo prazo (SHAHID et al., 2016). Diante do exposto, pode-se afirmar que plantas

cultivadas para fins alimentícios estão vulneráveis à poluição causada por resíduos sólidos ou por descartes inadequados de contaminantes e podem comprometer a saúde humana através do processo de bioacumulação e biomagnificação.

Nas últimas décadas, há considerável interesse no desenvolvimento de estratégias de remediação de solos contaminados com metais tóxicos que sejam eficientes e duráveis. A recuperação dessas áreas contaminadas pode minimizar ou evitar a dispersão dos contaminantes para outros ambientes, bem como restaurar a funcionalidade e a diversidade dos ecossistemas impactados ou degradados (KHALID et al., 2017).

A remediação consiste na melhoria ou recuperação de solos contaminados (LIU et al., 2018). Sendo assim, processos de estabilização, remoção e fitorremediação são as estratégias biotecnológicas que vêm sendo estudadas, preferencialmente os processos que agridam menos o meio ambiente e estejam em conformidade com os princípios da "Química Verde" (ALI et al., 2013). Muitos estudos de remediação vêm sendo realizados com moléculas sintéticas, como por exemplo o dimetilaminoetil metacrilato, que pode ser usado para adsorver cobre, cádmio mercúrio ou chumbo. No entanto, como são moléculas à base de petróleo, ao decorrer dos anos tem se elevado o custo desses compostos (MOSTAFA et al., 2011). Diante disto, a busca por novas técnicas utilizando biomoléculas tem sido considerada como uma alternativa viável no processo de remediação de solos ou proteção vegetal, pois são naturais e não causam danos ao meio ambiente. Algumas biomoléculas são bem conhecidas na quelação de metais tóxicos e do processo desintoxicante de várias células, são de baixo custo em relação a outros biossorventes podendo ser encontrados em espécies vegetais (VANDENBOSSCHE et al., 2015).

Com ampla distribuição geográfica em todo o continente americano, o gênero *Eugenia* L. é considerado o de maior diversidade na família Myrtaceae (são mais de 500 espécies diferentes identificadas) e muitas se destacam por serem usadas popularmente no tratamento de

ferimentos e infecções intestinais. Muitos estudos também têm evidenciado suas propriedades anti-hipertensivas, anticonvulsivante, hipoglicemiante, antimicrobiano, antirreumático, inseticida e acaricida tanto de extratos quanto de óleos essenciais. Ao mesmo tempo, estudos têm evidenciado a presença de importantes biomoléculas do metabolismo secundário, como flavonoides e terpenos (OLIVEIRA et al., 2005; SALES et al., 2014).

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver técnicas de contenção ou remoção de metais tóxicos do solo para atenuar ou anular os efeitos deletérios sobre cultivares, além do conhecimento de plantas do gênero *Eugenia* como fonte de moléculas potencialmente quelantes e menos tóxicas ao ambiente, objetivou-se avaliar o potencial remediador do extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* como modificador da fitotoxicidade induzida por níquel em *Lactuca sativa* L. (alface) cultivada em microambientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal e obtenção do Extrato Etanólico de Eugenia punicifolia (EEEP)

Folhas de *Eugenia punicifolia* foram coletadas em áreas de brejo de altitude no sítio Laje (7°50'44.5"S 38°04'34.7"W) no município de Triunfo, Pernambuco, Brasil para obtenção do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). O material vegetal foi identificado pelo prof. Dr. André Laurênio de Melo da Universidade Federal Rural de Pernambuco e um exemplar da exsicata foi depositado no Herbário do Semiárido do Brasil (HESBRA/UFRPE/UAST) sob o n° 96.

Para obtenção do EEEP, as folhas foram secas à temperatura ambiente, trituradas no liquidificador e aproximadamente 86 g do material obtido foi adicionado em contato com etanol 50 GL (Dinâmica, Brasil), durante 72 horas. Posteriormente, o extrato foi concentrado em rotaevaporador (IKA® RV 05 basic) e banho maria (TE-056 mag), a 40 °C. O extrato concentrado foi armazenado em recipiente envolvido com papel alumínio e mantido

refrigerado. Por fim, verificou-se a obtenção de um rendimento de aproximadamente 19% do EEEP, calculado a partir da seguinte fórmula de Rodrigues e colaboradores (2011):

$$Re = (P_{\text{extrato}}/P_{\text{folhastrituradas}}) \times 100$$

Onde:

Re: rendimento do extrato (%);

P_{extrato}: massa do extrato concentrado (g);

P_{folhastrituradas}: massa das folhas trituradas inicialmente (g).

2.2 Prospecção e caracterização fitoquímica qualitativa do extrato de *Eugenia punicifolia*

A caracterização fitoquímica qualitativa (identificação de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, flavononas, triterpenóides, esteroides, antocianidinas, chalconas, leucoantocianidinas e catequinas) foi definida através da formação de precipitados, mudança de coloração e formação de espuma, em conformidade com a metodologia de Matos e colaboradores (1998).

2.3 Testes de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

2.3.1 Delineamento Experimental

O estudo consistiu em três etapas: 1. Teste de fitotoxicidade do EEEP, 2. Teste de fitotoxicidade do sulfato de níquel (NiSO₄) e 3. Teste de remediação (EEEEP x NiSO₄), sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. (alface).

Todo o estudo foi realizado a partir de experimentos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para o teste de remediação, os tratamentos foram analisados separadamente, conforme a concentração do NiSO₄ estudado. O fator EEEP consistiu de duas concentrações conhecidas (0,5 e 5,0 µg.mL⁻¹) e o fator NiSO₄ (Proquímios, Brasil) de três concentrações (2,5, 5,0 e 25,0 µg.mL⁻¹). As concentrações selecionadas, foram estimadas com base em uma regressão sigmoidal. Todos os tratamentos foram montados em quadruplicatas.

Os testes 1 e 2 consistiram na avaliação da fitotoxicidade do EEEP (concentrações variando de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e do NiSO_4 (concentrações variando de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente, de forma isolada, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L., para determinação das concentrações inibitórias e subinibitórias utilizadas no teste de remediação.

O teste 3 consistiu da combinação de concentrações não tóxicas do EEEP (determinadas a partir do teste 1) com níveis tóxicos do NiSO_4 (determinadas a partir do teste 2) para avaliar o efeito remediador do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida pelo NiSO_4 na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. Para isto, análises físico-químicas, biométricas e do teor de pigmentos fotossintetizantes das plântulas foram realizados.

2.3.2 Procedimentos de semeadura

Sementes de *Lactuca sativa* L (alface) foram obtidas comercialmente (cultivar Monica SF 31, Feltrin®, Farroupilha, Brasil). Antes da semeadura, as sementes foram esterilizadas superficialmente através da imersão em um béquer contendo hipoclorito de sódio a 3% por 5 minutos, e lavadas com água destilada autoclavada para remoção do excesso do hipoclorito de sódio.

A semeadura foi realizada dentro de uma capela de fluxo laminar (PA 120 ECO), previamente esterilizada com álcool 70 GL e luz UV (tempo de exposição à luz de 15 minutos), em microambientes artificiais constituídos de placas de Petri estéreis com duas folhas de papel filtro qualitativo.

2.3.3 Avaliação do efeito tóxico do EEEP

Com auxílio de pipetas Pasteur, as placas foram embebidas de 3,0 mL das seguintes concentrações do EEEP: $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Quanto ao grupo testemunha, consistiu apenas de água destilada.

Foram adicionadas 25 sementes a cada placa de Petri, embrulhadas em papel filme e colocadas em uma câmara climática (B.O.D), modelo MA-1402/546, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas e temperatura controlada de 25 °C, durante um período de sete dias. Após o sétimo dia, parâmetros de germinação, desenvolvimento inicial e fitotoxicidade foram avaliados.

Concentrações subinibitórias do EEEP na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. foram determinadas pelo cálculo da concentração inibitória média (CI₅₀), ou seja, a concentração necessária para reduzir 50% no crescimento do órgão analisado das plântulas.

2.3.4. Avaliação do efeito tóxico do sulfato de níquel (NiSO₄)

Com auxílio de pipetas Pasteur, os microambientes foram expostos a 3 mL das diferentes concentrações do NiSO₄ (0,1 µg.mL⁻¹, 1 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹ e 1000 µg.mL⁻¹). Quanto ao grupo testemunha, consistiu apenas de água destilada.

Foram adicionadas 25 sementes a cada placa de petri, embrulhadas em papel filme e mantidas em uma câmara climática B.O.D, modelo MA-1402/546, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas e temperatura controlada de 25 °C, durante um período de sete dias. Parâmetros de germinação, desenvolvimento inicial e fitotoxicidade foram avaliados.

Concentrações inibitórias ou tóxicas do NiSO₄ na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. foram determinadas a partir do cálculo da concentração inibitória média (CI₅₀), ou seja, a concentração média necessária para reduzir em 50% o crescimento das radículas quando comparado com o grupo controle.

2.3.5 Teste de remediação ou efeito protetor do EEEP sobre a toxicidade induzida por Ni

Com auxílio de pipetas Pasteur, os microambientes foram expostos a 3 mL das concentrações do EEEP (0,5 e 5,0 µg.mL⁻¹) combinadas com as concentrações do NiSO₄ (2,5,

5,0 e 25,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quanto aos grupos testemunhas, consistiram apenas de água destilada e das concentrações do EEEP e NiSO_4 isoladas.

Foram adicionadas 25 sementes a cada placa de Petri, embrulhadas em papel filme e mantidas em uma câmara climática B.O.D, modelo MA-1402/546, ajustada para um fotoperíodo de 12 horas e temperatura controlada de 25 °C, durante um período de sete dias. No último dia, parâmetros de germinação, desenvolvimento inicial e fitotoxicidade (descritos no item 2.5) foram avaliados.

O experimento foi repetido para obtenção de material vegetal e realização dos testes bioquímicos. Todo material vegetal obtido foi acondicionado em ultra freezer Panasonic/Sanyo MDF -86 °C para análises posteriores.

2.4 Parâmetros de germinação, desenvolvimento inicial e fitotoxicidade em *Lactuca sativa* L.

2.4.1 Porcentagem de germinação (%G)

Durante os sete dias de incubação de *L. sativa* na estufa incubadora (B.O.D.), sementes com emergência radicular a partir de 1 mm foram consideradas germinadas. O número de sementes germinadas foram contabilizadas a cada 24 horas. A porcentagem de germinação total foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\%G = \frac{ng_t}{ns_t} \times 100$$

Onde:

%G = Porcentagem de Germinação (%);

ng_t = Número total de sementes germinadas;

ns_t = Número total de sementes.

2.4.2 Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

Outro parâmetro de germinação avaliado foi o índice de velocidade de germinação (IVG), a partir da seguinte fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = \sum_{i=1}^n \frac{ng_i}{i}$$

Onde:

IVG = Índice de Velocidade de Germinação (sementes germinadas.dia⁻¹);

ng_i = Número de sementes germinadas no dia *i*;

i = Dia observado;

n = Último dia observado.

2.4.3 Comprimento da radícula (CR) e hipocótilo (CH)

Após o período de sete dias, seis plântulas foram coletadas aleatoriamente de cada réplica (placa de Petri), fotografadas e mensuradas as suas radículas e os hipocótilos, com o auxílio do programa Image-Pro Plus.

2.4.4 Índice de Vigor (IV)

O índice de vigor das plântulas de *Lactuca sativa* L. foi calculado de acordo com a metodologia de Abdul Baki e Anderson (1973), utilizando a seguinte fórmula:

$$IV = (CR + CH) \times \%G$$

Onde:

IV = Índice de Vigor (%);

CR = Comprimento da radícula (cm);

CH = Comprimento do hipocótilo (cm);

%G = Porcentagem de germinação (%).

2.4.5 *Índice de tolerância (IT) ao níquel*

Com base nos dados do comprimento radicular, foi determinado o índice de tolerância ao NiSO₄, conforme metodologia proposta por Tuner e Marshall (1972), utilizando a fórmula:

$$IT=1 + \log\left(\frac{c_e}{c_o}\right)$$

Onde:

IT= Índice de tolerância ao níquel;

c_e = Comprimento esperado (Comprimento do grupo controle) (cm);

c_o = Comprimento observado (Comprimento do grupo observado) (cm).

2.4.6 *Percentagem de Necrose Radicular (%NR)*

A necrose radicular foi detectada a partir da identificação de manchas escuras sobre a radícula, o que indica morte tecidual. Neste trabalho, definimos como necrose parcial a ocorrência de manchas escuras em pequenas áreas da radícula (geralmente na sua extremidade) e necrose total como a ocorrência de manchas escuras em sua total extensão, com consequente atrofia radicular (Figura 8). A partir da avaliação da incidência de necrose nas radículas das plântulas foi atribuído a percentagem de necrose total, necrose parcial e plântulas sem necrose.

2.5 *Parâmetros físico-químicos*

Com auxílio de um pHmetro e condutivímetro (Tecnal/TEC-11), foi medido o pH e a condutividade elétrica (CE) das soluções isoladas e combinadas do EEEP e do sulfato de níquel (NiSO₄) utilizadas como tratamentos nos testes de germinação de alface. Em seguida, determinou-se o potencial osmótico (**Ψ_o**) a partir da fórmula adaptada de Ayers & Westcot (1999):

$$\Psi_o = -0,036 \times CE$$

Onde:

Ψ_o = Potencial osmótico (em MPa);

CE= Condutividade elétrica (em dS/m).

2.6 Determinação das concentrações dos pigmentos fotossintéticos

A estimativa das concentrações de clorofilas e carotenoides foi realizada de acordo com o método adaptado de Lichthenthaler (1987).

Com auxílio de uma pinça, aproximadamente 0,05g das folhas cotiledonares das plântulas de cada tratamento foram coletadas e alocadas em tubos de ensaio com rosca, previamente identificados e protegidos com papel alumínio. Em seguida, foi adicionado nos tubos 4 mL de acetona 80% (VETEC, Brasil) e acondicionados no refrigerador durante uma semana para extração dos pigmentos fotossintéticos.

Após o tempo de extração, os pigmentos extraídos foram quantificados através da leitura em espectrofotômetro (Biochrom Libra S60) nos comprimentos de onda de 470 nm, 646,8 nm e 663,2 nm. As concentrações de clorofilas e de carotenoides (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram, então, calculadas por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = C_a = 12,25 A_{663,2} - 0,279 A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila } b = C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

$$\text{Carotenoides (xantofilas + carotenos)} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

Para cada tratamento, os resultados foram expressos na quantidade em μg de clorofilas ou carotenoides por g de massa fresca de folhas cotiledonares de alface.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e de homocedasticidade para avaliar se os dados possuíam distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente. Atendendo a essas premissas, os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Diferenças significativas entre as médias foram consideradas para o valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Fitoquímica do EEEP

A análise fitoquímica qualitativa do EEEP revelou a presença de compostos fenólicos com o aparecimento de uma mancha azul escura no papel filtro no contato do extrato com o cloreto de ferro (FeCl_3) (Tabela 1). Dentro das classes de compostos fenólicos, foi possível observar um indicativo de flavonoides e cumarinas por meio do aparecimento de uma cor amarela e azul, respectivamente, quando exposto a luz UV (Tabela 1, Figura 2A). Por fim, a formação de um precipitado branco indicou a presença de taninos (Tabela 1, Figura 2B).

3.2 Efeito tóxico do EEEP em *Lactuca sativa* L.

Com base nos resultados do efeito do EEEP sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* foi observado fitotoxicidade apenas nas concentrações a partir de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Porcentagem de Germinação (%G), na maior concentração avaliada ($10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foi reduzida em torno de 50%, quando comparado ao controle, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Apesar da %G ter sido reduzida apenas na maior concentração avaliada, o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) sofreu um retardo a partir do tratamento de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cerca de 22% em relação ao controle, seguida de um declínio de aproximadamente 80% na maior concentração testada ($10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 2).

Assim como o IVG, o Índice de Vigor (IV) foi reduzido nas duas maiores concentrações testadas (1.000 e $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cerca de 53% e 95%, respectivamente, em relação ao

controle. Sendo assim, uma redução no comprimento radicular foi diretamente proporcional a essa perda de vigor das plântulas. Na concentração de 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, aproximadamente 99% do tamanho radicular foi comprometido, causando necrose nas radículas das plântulas desse tratamento (Tabela 2). O comprimento do hipocótilo não apresentou diferença significativa nas concentrações de 0,1 a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparado ao controle (Tabela 2).

Com base nos parâmetros avaliados e sob as condições utilizadas no presente estudo, o EEEP causou um efeito tóxico a partir da concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Diante dessa informação e do cálculo da concentração inibitória média (CI_{50}) (Figura 3), foram selecionadas as concentrações de 0,5 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do EEEP para o teste de remediação do EEEP sobre a fitotoxicidade causada pelo NiSO_4 na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

3.3 Toxicidade do sulfato de níquel (NiSO_4) em *Lactuca sativa* L.

Diante dos resultados obtidos no teste de fitotoxicidade do NiSO_4 sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, foi observado um efeito inibidor a partir da concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NiSO_4 , sendo a concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NiSO_4 letal para a germinação e o desenvolvimento dessa hortaliça (Tabela 3).

A %G e o IVG não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (0 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NiSO_4) ($p < 0,05$). No entanto, o IV reduziu cerca de 49% e 93% nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, quando comparado ao controle. O comprimento radicular foi quase que comprometido (97%) na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e reduzido cerca de 57% no tratamento de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação ao controle. Apesar do hipocótilo não estar diretamente em contato com a solução do NiSO_4 , foi observada uma redução no comprimento desse órgão na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando comparado em controle (Tabela 3).

Diante das condições propostas no presente estudo e dos parâmetros avaliados, o NiSO_4 causou toxicidade na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* nas

concentrações de 10, 100 e 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir da cálculo da concentração inibitório média (CI_{50}) foram determinadas as concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do NiSO_4 para o teste de remediação química do EEEP sobre a fitotoxicidade causada pelo NiSO_4 na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* (Figura 4).

3.4 Teste de remediação ou efeito protetor do EEEP

Com base nos parâmetros avaliados no ensaio do potencial remediador do EEEP sobre a toxicidade causada por NiSO_4 na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, a %G não apresentou diferença entre as combinações EEEP x NiSO_4 e os controles (positivo e negativo) avaliados (Tabela 4). Ou seja, os controles positivos (H_2O , 0,5 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EEEP), os controles negativos (2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4) e as combinações EEEP x NiSO_4 não influenciaram na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. No entanto, um aumento de aproximadamente 28% foi observado no IVG no tratamento combinado (5,0 EEEP x 25,0 NiSO_4), diferindo dos controle positivo (H_2O) e do controle negativo (25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4) (Tabela 4).

Conforme os resultados apresentados para o IV, nos controles negativos (2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4) houve uma redução percentual de aproximadamente 61, 43 e 88%, respectivamente, diferindo estatisticamente quando comparado com o controle positivo (H_2O) (Tabela 4). Entretanto, quando foi combinado o EEEP com o NiSO_4 , o IV melhorou ou apresentou-se maior que os valores observados nos controles positivos (H_2O , 0,5 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EEEP) (Tabela 4).

Diante dos dados obtidos no Índice de Tolerância (IT), foi observado um comportamento tolerante das plântulas quando o EEEP foi combinado com o NiSO_4 . Nos tratamentos apenas com NiSO_4 , as plântulas tenderam a aumentar o seu valor do IT, configurando uma menor tolerância ao estressor, que tem como valor padrão de tolerância 1,0 (Tabela 4). Entretanto, quando o EEEP foi combinado com NiSO_4 , os valores do IT tenderam a

se aproximar do valor 1,0, conseqüentemente, melhorando a tolerância das plântulas frente ao estressor analisado (Tabela 4).

O comprimento radicular das plântulas foi significativamente reduzido nos tratamentos apenas com NiSO₄, comprometendo quase que 100% das radículas na maior concentração testada (25,0 µg.mL⁻¹ de NiSO₄) (Figuras 5,6 e 7a). Em contrapartida, os ensaios na presença do EEEP e do NiSO₄ foi observado um efeito protetor do EEEP sobre a toxicidade causada por NiSO₄. Nos tratamentos combinados (EEEP x NiSO₄) foi observado um aumento no comprimento nas radículas das plântulas analisadas, diferindo dos ensaios realizados apenas com o NiSO₄ isolado (Figura 5,6 e 7a). Para o comprimento do hipocótilo, foi observado diferença dos tratamentos (0,5 EEEP x 2,5 NiSO₄; 5,0 EEEP x 25,0 NiSO₄) e os ensaios de NiSO₄ isoladas (Figura 7b).

A partir da avaliação da incidência percentual de necrose radicular das plântulas, foi observado, a partir dos parâmetros adotados, 25% de necrose parcial e 4,17 de necrose total nas radículas das plântulas do tratamento apenas com 2,5 µg.mL⁻¹ de NiSO₄ (Figura 9a). A concentração isolada de 5,0 µg.mL⁻¹ de NiSO₄ apresentou comportamento semelhante, com 41,7% de necrose parcial e 8,3% de necrose total (Figura 9b). Na maior concentração estudada de NiSO₄ (25,0 µg.mL⁻¹), as plântulas apresentaram 100% de necrose total das radículas (Figura 9c). Um possível efeito protetor do EEEP foi observado nos tratamentos combinados (EEEP x NiSO₄), pois não apresentaram nenhum grau de necrose para esses dois níveis de NiSO₄ (2,5 e 5,0 µg.mL⁻¹) (Figura 9a,b). No maior nível de NiSO₄ estudado (25,0 µg.mL⁻¹), os tratamentos combinados tenderam a diminuir a necrose total a medida que os níveis dos EEEP aumentaram (Figura 9c).

3.5 Parâmetros físico-químicos

Dentre os parâmetros físico-químicos analisados nas soluções do teste remediador do EEEP, foi possível observar um pH mais ácido nas concentrações isoladas do NiSO₄ (2,5; 5,0

e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nos tratamentos combinados (EEEP x NiSO_4), o pH tendeu a ficar neutro, diferindo dos tratamentos isolados de NiSO_4 (Tabela 5).

A condutividade elétrica (CE) das soluções tendeu a aumentar nos controles negativos (2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4) e nos tratamentos combinados. Nos controles positivos (2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4), a CE das soluções apresentaram valores menores, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 5).

O potencial osmótico (Ψ_o) das soluções aumentou negativamente nos controles negativos (2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NiSO_4) e nos tratamentos combinados. Nos controles positivos (H_2O , 0,5 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EEEP), o potencial osmótico apresentou valores próximo a zero (Tabela 5).

3.6 Conteúdo de clorofilas a, b, totais e carotenoides

Os pigmentos fotossintéticos analisados nas plântulas do teste do efeito remediador do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por NiSO_4 não apresentaram diferenças significativas nos menores níveis do NiSO_4 (2,5 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), quando comparado com o controle (H_2O) e os tratamentos combinados (Tabela 6). No entanto, para a maior concentração do NiSO_4 estudada (25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foram observadas diferenças significativas desses pigmentos fotossintéticos, entre e os tratamentos isolados e os combinados (Tabela 6).

Os níveis de clorofila *a* foram reduzidos cerca de 46,5% no tratamento isolado com 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NiSO_4 , diferindo quando comparado ao controle (H_2O) (Tabela 6). Entretanto, quando o ensaio foi realizado combinando 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NiSO_4 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do EEEP os teores de clorofila *a* superaram os níveis observados no controle (H_2O) (Tabela 6). Os níveis de clorofilas *b*, totais e carotenóides quantificados seguiram o mesmo comportamento da clorofila *a*, reduzindo em torno de 32%, 42,5% e 54,5%, respectivamente. Todos os pigmentos fotossintéticos voltaram a apresentar níveis acima do controle (H_2O) quando combinado 25,0

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do NiSO_4 com $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do EEEP (Tabela 6).

4. DISCUSSÃO

As plântulas têm a capacidade notável, porém diferente, de absorver os minerais do ambiente externo e acumular vários elementos essenciais e não essenciais, incluindo os metais tóxicos (EMAMVERDIAN et al., 2015). No presente estudo, plântulas de *Lactuca sativa* foram cultivadas na presença de concentrações isoladas e combinadas do EEEP e NiSO_4 para avaliar o possível efeito citoprotetor do EEEP contra a fitotoxicidade induzida por NiSO_4 . Os resultados apresentados aqui indicam que o EEEP quando combinado com o NiSO_4 reduziu ou reverteu a fitotoxicidade causada nas plântulas de alface, de acordo com os parâmetros biométricos e dos pigmentos fotossintéticos avaliados.

4.1 Fitoquímica do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* L.

De acordo com a metodologia de Matos e colaboradores (1998) para determinação fitoquímica qualitativa em extratos vegetais, foi possível observar no presente estudo um forte indicativo de compostos fenólicos (flavonoides, cumarinas e taninos) para o extrato etanólico de *Eugenia punicifolia*. Basting e colaboradores (2014) investigaram o perfil fitoquímico em HPLC do extrato hidroalcolólico das folhas de *Eugenia punicifolia* e detectaram a presença de derivados de flavonóides (quercetina, miricetina e rutina) e galotaninas. Sobral-Souza e colaboradores (2014) trabalhando com o extrato etanólico da espécie *Eugenia jambolana* Lam. identificaram a presença de fenóis totais e flavonóides. Cunha e colaboradores (2016) investigaram o perfil fitoquímico do extrato etanólico da espécie *Eugenia uniflora* L. em HPLC e observaram a presença de derivados de compostos fenólicos e flavonoides (ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina, rutina, kaempferol). O perfil fitoquímico dessas espécies parece ser bem característico dentro do gênero *Eugenia*, corroborando com os dados obtidos na prospecção fitoquímica do presente estudo.

Alguns trabalhos relatam que os compostos fenólicos e flavonoides apresentam características físico-químicas com potencial atividade antioxidante e quelante de metais pesados. Mecanismos de captura de radicais livres (espécies reativas de oxigênio – EROs) e formação de complexos com metais pesados podem conferir proteção as plantas através da ação desses metabólitos secundários (EBRAHIMZADEH et al., 2008; WANG et al., 2009; MLADENKA et al., 2011; PROCHAZKOVA et al., 2011; HUYUT et al., 2017). Com base nesses trabalhos, o EEEP parece ter atividade antioxidante, o que indica o potencial citoprotetor deste extrato.

4.2 Teste do efeito protetor do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por NiSO₄ em plântulas de *Lactuca sativa* L.

4.2.1 Fitotoxicidade do NiSO₄

Os efeitos visíveis do excesso do níquel (Ni) observados em plântulas da alface no presente estudo pode ocorrer devido à interferência desse metal nos processos metabólicos e bioquímicos associados ao crescimento e desenvolvimento normal das plântulas (SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2006).

No presente trabalho, não foi constatado diferenças significativas na %G dos tratamentos avaliados. Porém, Seregin e Kozhevnikova (2006) relataram que a toxicidade do Ni tem efeitos deletérios na germinação e no crescimento das sementes, pois afeta processos metabólicos, a elasticidade da parede celular, divisões celulares e atividades de enzimas hidrolíticas. Contudo, a fitotoxicidade induzida por Ni sobre as plantas dependem da espécie em estudo, estágio de desenvolvimento, condições de cultivo e tempo de exposição ao estressor (ASSUNÇÃO et al. 2003).

O pH da solução é um dos fatores que mais afetam a absorção e consequentemente a toxicidade do Ni sobre as plantas. Isso ocorre porque os íons hidrogênio estão competindo fortemente com os íons metálicos (LODEIRO et al., 2006; HANIF et al., 2007). Em soluções

mais ácidas (pH mais baixo), a planta tende a absorver maior quantidade de Ni. Fato que pode ser explicado porque mais prótons estão disponíveis para protonar grupos ativos da superfície de componentes celulares da planta e íons metálicos estão competindo com o H^+ na solução a baixos valores de pH. Em valores mais altos de pH, a absorção de Ni pelas plantas diminui drasticamente (SAG, KAYA, KUTSAL, 1998).

Além do pH, outros parâmetros físico-químicos das soluções podem explicar a fitotoxicidade do Ni sobre as plantas. A condutividade elétrica (CE) da solução aumenta na presença de Ni. Walker e colaboradores (2004) explicaram o aumento da CE no solo pela acidificação de resíduos sólidos municipais em combinação com a subsequente solubilização dos elementos metálicos. O potencial osmótico (Ψ_o) das soluções é inversamente proporcional a CE. A medida que a CE aumenta o Ψ_o diminui. A redução do Ψ_o nas soluções pode ser devido a solubilização do Ni, induzindo um decréscimo na atividade da água.

Sendo assim, a captação de Ni nas plantas acontece, principalmente, através do sistema radicular por difusões ativas e passivas. Cerca de metade do Ni absorvido fica retido na raiz e o restante é transportado para a parte aérea (folhas, frutos, sementes, brotos) através dos vasos do xilema no fluxo transpiracional (SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2006; NEUMANN, CHAMEL, 1986) e induzido por complexos Ni-ligantes (histidina, nicotinamida, ácidos orgânicos e peptídeos), que ajudam a translocação do Ni via xilema (HAYDON E COBBETT, 2007).

A análise da morfometria da radícula e hipocótilo das plântulas de alface mostraram uma redução significativa no sistema radicular e conseqüentemente no índice de vigor em função das concentrações de $NiSO_4$ estudadas, com efeitos menores sobre o hipocótilo. Isto se dá pelo fato de que, de acordo com Seregin e colaboradores (2003), o acúmulo de Ni é maior nas raízes do que na parte aérea devido ao contato direto e por ocorrer nos locais de troca

catiônica das paredes dos vasos do parênquima do xilema. Conseqüentemente, este fato permite a inibição do crescimento da radícula em maior extensão do que o crescimento da parte aérea (SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2006). Outra possível explicação seria que a redução do crescimento radicular pode estar, geralmente, ligada a uma perda de turgor celular, resultando na diminuição da atividade mitótica e/ou na inibição do alongamento celular (ROBERTSON, MEAKIN, 1980; POWELL et al., 1986; GABBRIELLI et al. ; 1990).

Além disto, o dano celular nas radículas de alface pelo aumento na concentração de Ni é intensificado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), com conseqüente danos oxidativos às suas biomoléculas celulares. Isso indica que as raízes são mais suscetíveis a danos induzidos por Ni do que outros órgãos vegetais (LYU et al., 2018).

O escurecimento das raízes, como conseqüência da alta disponibilidade de metais, foi relatado por vários autores (RAUSER, 1978; BRECKLE, 1989). O escurecimento parece está associado a uma melhor suberização (BARCELO, POSCHENRIEDER, 1990), o que pode limitar a captação de água. No entanto, de acordo com Greger e Lindberg (1987), o escurecimento do sistema radicular e o desenvolvimento de raízes laterais curtas podem ser uma conseqüência da deficiência de Ca^{2+} .

Efeitos fisiológicos e bioquímicos da fitotoxicidade induzida por Ni resultaram em uma redução significativa dos pigmentos fotossintéticos nas plântulas da alface na maior concentração do $NiSO_4$ estudada. Singh e Pandey (2010) encontraram resultados semelhantes em plantas de alface na maior concentração de Ni estudada, observando uma redução significativa nos teores de clorofilas e na eficiência fotossintética. Segundo Somashekaraiah e colaboradores (1992), a diminuição dos teores dos pigmentos fotossintéticos em plantas tratadas com Ni é atribuída a distúrbios na síntese desses pigmentos, bem como a degradação dos cloroplastos. Somado a este fato, pode ainda ocorrer uma menor absorção de magnésio

(Mg) e ferro (Fe) induzida por Ni, levando à deterioração da clorofila com consequente clorose e necrose foliar, além do estresse oxidativo que pode resultar na peroxidação das membranas lipídicas (EWAIS, 1997; MOLAS, 1997; SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2006; SHUKLA, GOPAL, 2009).

O Ni absorvido é predominantemente depositado em regiões lamelares dos cloroplastos que contêm o fotossistema II (VEERANJANEYULU, DAS, 1982). Nesse contexto, o acúmulo de Ni pode interferir no transporte de elétrons durante a reação luminosa no fotossistema II reduzindo a taxa de fotossíntese (MALKIN, NIYOGI, 2000; KRUPA, BASZYNSKI, 1995). Além disso, o Ni reduz a plastocianina, citocromo b6-f e b559 e ferredoxina nas membranas dos tilacóides, além de afetar a atividade de enzimas importantes, como a rubisco e aldolase, envolvidas na regulação do ciclo de Calvin. A baixa atividade dessas enzimas leva ao acúmulo de ATP e NADPH, criando um gradiente de pH alcalino nas membranas dos tilacóides com consequente bloqueio das atividades do fotossistema II (SHEORAN et al. 1990b; KRUPA, BASZYNSKI, 1995).

De um modo geral, a toxicidade causada por Ni modifica a estrutura dos cloroplastos, reduz a síntese de clorofilas, interfere na cadeia transportadora de elétrons, inibe enzimas do Ciclo de Calvin, aumenta o fechamento estomático, induz a deficiência de CO₂, e consequentemente leva a redução da fotossíntese (HERMLE et al., 2007; SEREGIN, KOZHEVNIKOV, 2006; TRIPATHY et al., 1981; SHEORAN et al., 1990b).

4.2.2 Efeito protetor do EEEP sobre a fitotoxicidade induzida por Ni

Os efeitos visíveis do excesso do NiSO₄ observados em plântulas da alface no presente estudo foram amenizados ou revertidos as condições normais (comparados com o grupo controle - H₂O) na presença do EEEP. Os resultados obtidos, como o IVG, o comprimento radicular e o IV das plântulas da alface apresentaram um aumento significativo quando combinado o EEEP com o NiSO₄. Além disso, um aumento da tolerância ao NiSO₄ foi atribuído

as plântulas cultivadas nessas condições. Por fim, os níveis dos pigmentos fotossintéticos foram melhorados ou recuperados as condições normais na presença do EEEP.

Rajpoot e colaboradores (2015) atribuíram aos compostos fenólicos presentes no extrato das cascas de *Terminalia arjuna* como responsáveis pelos mecanismos de proteção contra a fitotoxicidade induzida por Ni em mudas de arroz, devido as propriedades quelantes desses compostos, resultando em uma menor absorção. O mesmo foi concluído por Sobral-Souza e colaboradores (2014) e Cunha e colaboradores (2016), utilizando extratos etanólicos da *Eugenia jambolana* e *Eugenia uniflora* no desenvolvimento inicial de plântulas de *Lactuca sativa* expostas a mercúrio (Hg). Os resultados demonstraram que os fitoquímicos presentes nos extratos citados, principalmente fenóis e flavonoides, podem proteger diferentes organismos contra os danos do metal tóxico, devido à quelação ou potencial antioxidante.

Diante deste fato, é possível que, na presença de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e cumarinas) as atividades enzimáticas que mobilizam o armazenamento de nutrientes do endosperma para o desenvolvimento do embrião, tenham permitido o aumento da velocidade de germinação das sementes de *L. sativa* (HASSAN et al., 2019), bem como, a formação de complexos (Ni-biomoléculas) tenha evitado os danos oxidativos causados pelo aumento da produção de EROs nas radículas e aparelho fotossintético (RAJPOOT et al., 2016).

Como já citado anteriormente, a prospecção fitoquímica do EEEP revelou a presença de compostos fenólicos. Basting e colaboradores (2014) investigaram o perfil fitoquímico em HPLC do extrato hidroalcolólico das folhas de *E. puniceifolia* e detectaram a presença de derivados de flavonóides (quercetina, miricetina e rutina) e galotaninas. De fato, vários flavonoides, principalmente a quercetina, podem pontencialmente formar complexos moleculares com alguns metais tóxicos, dentre eles, o níquel (DOLATABADI et al., 2011). A quercetina atua como um ligante de dois átomos (ligante bidentado), formando um complexo

mononuclear com um íon de Ni e dois ligantes (Figura 10) (ZHOU et al., 2001). Isso reforça a tese que a quercetina e outros compostos fenólicos encontrados nas folhas do EEEP pode, em parte, atuarem como estabilizadores do Ni, impedindo sua absorção pelas plântulas e, conseqüentemente, reduzindo sua fitotoxicidade.

Outra possível explicação sobre esse feito protetor do EEEP, é a eliminação de EROs diretamente por doação de átomos de hidrogênio por metabólitos secundários. Por exemplo, o radical livre fenoxil flavonoide (Fl-O[•]) pode reagir com um segundo radical, formando uma estrutura estável de quinona (Figura 11) (DOLATABADI et al., 2011). Os taninos condensados e os polímeros de catequinas, são excelentes metabólitos secundários antioxidantes devido ao grande número de grupos hidroxila em suas moléculas.

Então, a capacidade dos metabólitos secundários (polifenóis e flavonóides) formarem complexos com metais pesados ou atuarem como antioxidantes, nos remete a inferir que esses compostos presentes no EEEP são os responsáveis pelo efeito protetor observado no presente estudo (CAI et al., 2003; SULTANA et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* possui papel protetor contra a toxicidade induzida por sulfato de níquel em plântulas da alface. Embora os mecanismos de proteção utilizando extratos vegetais não estejam totalmente esclarecidos, podemos inferir que as biomoléculas presentes no EEEP podem ter reduzido a absorção de níquel pelas raízes da alface ou atuaram como sistema antioxidante das plântulas contra o estresse oxidativo causado por níquel. A aplicação exógena de vários metabólitos secundários e seus possíveis efeitos de melhoria na toxicidade induzida por metais pesados em plantas significam um futuro promissor, devido a ação quelante e antioxidante de algumas biomoléculas. No entanto, é necessário melhorar a compreensão dos mecanismos

exatos envolvidos nas ações de tais moléculas biológicas e o nível de sua interação com diferentes espécies de plantas para aliviar os efeitos dos metais tóxicos.

6. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsas e equipamentos; À Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE pelo Edital PRPPG 015/2018 (Apoio à Pesquisa Institucional da UFRPE), ao Grupo de Instrumentação e Análise Química (GIAQ/UAST/UFRPE), ao Herbário do Semiárido do Brasil (HESBRA) e aos Programas de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PGPV) e Biodiversidade e Conservação (PGBC), ambos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

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

7. REFERÊNCIAS

ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Relationship Between Decarboxylation of Glutamic Acid and Vigor in Soybean Seed 1. **Crop Science**, v. 13, n. 2, p. 227-232, 1973.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.

ASSUNÇÃO, A. G. L. et al. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. **New Phytologist**, v. 159, n. 2, p. 411-419, 2003.

BARCELÓ, J. U. A. N.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of plant nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-37, 1990.

- BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 257-267, 2014.
- BRECKLE, S.W. Growth under stress: Heavy metals. In: Y. Maisel, U. Kafkafi, A. Eshel (eds.), *The Root System: The Hidden Half*. **Marcel Dekker, Inc.**, New York, NY. 1989.
- CAI, Yizhong; SUN, Mei; CORKE, Harold. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.
- CUNHA, F. A. B. et al. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4197-4203, 2019.
- DOLATABADI, J. E. N. Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 227-233, 2011.
- EBRAHIMZADEH, M. A.; POURMORAD, F.; BEKHRADNIA, A. R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **African Journal of Biotechnology**. v. 7. p.3188–3192, 2008.
- EMAMVERDIAN, A. et al. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- EWAIS, E. A. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 403-410, 1997.
- GABBRIELLI, P. et al. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. **Plant and Soil**, v. 122, n. 2, p. 271-277, 1990.
- GREGER, M.; LINDBERG, S. Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). II. Net uptake and distribution of Mg²⁺, Ca²⁺ and Fe²⁺/Fe³⁺. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 1, p. 81-86, 1987.
- HANIF, M. A. et al. Ni (II) biosorption by *Cassia fistula* (Golden Shower) biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 139, n. 2, p. 345-355, 2007.

- HASSAN, M. U. et al. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 13, p. 12673-12688, 2019.
- HAYDON, M. J.; COBBETT, C. S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 499-506, 2007.
- HERMLE, S. et al. Leaf responsiveness of *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. **Tree Physiology**, v. 27, n. 11, p. 1517-1531, 2007.
- HUYUT, Z.; BEYDEMIR, S.; GULÇIN, I. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Biochemistry Research Internatonal**. v. 2017, p. 10, 2017.
- KHALID, S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.
- KRUPA, Z.; BASZYNSKI, T. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reactions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 2, n. 17, 1995.
- LICHTENTHALER, H. K. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.
- LIU, L. et al. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 206-219, 2018.
- LODEIRO, P. et al. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: kinetic and equilibrium studies. **Environmental pollution**, v. 142, n. 2, p. 264-273, 2006.
- LYU, J. et al. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 149, p. 225-232, 2018.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, p. 176–177, 1962.

MALKIN, R., NIYOGI, K. Photosynthesis. In: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (eds) Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD, p. 568–628, 2000.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza. 1988.

MLADĚNKA, P. I et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 693-701, 2011.

MOLAS, J. Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel. **Photosynthetica**, v. 34, n. 4, p. 513-522, 1998.

MOSTAFA, K.M.; SAMARKANDY, A. R.; EL-SANABARY, A. A. Preparation of poly (DMAEM)-cross linked pregelled starch graft copolymer and its application in waste water treatments. **Carbohydrate polymers**, v. 86, n. 2, p. 491-498, 2011.

NEUMANN, P. M.; CHAMEL, A. Comparative phloem mobility of nickel in nonsenescent plants. **Plant physiology**, v. 81, n. 2, p. 689-691, 1986.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Comparative study of the essential oil of *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. from different places of Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

POWELL, M. J.; DAVIES, M. S.; FRANCIS, D. The influence of zinc on the cell cycle in the root meristem of a zinc-tolerant and a non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. **New Phytologist**, v. 102, n. 3, p. 419-428, 1986.

PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**. v. 82. p. 513–523, 2011.

RAJPOOT, R. et al. Terminalia arjuna bark extract alleviates nickel toxicity by suppressing its uptake and modulating antioxidative defence in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 253, n. 6, p. 1449-1462, 2016.

RAUSER, W. E. Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel, and zinc in white beans. **Canadian journal of Botany**, v. 56, n. 15, p. 1744-1749, 1978.

ROBERTSON, A. I.; MEAKIN, M. E. R. The effect of nickel on cell division and growth of *Brachystegia spiciformis* seedlings. **Kirkia**, p. 115-125, 1980.

- RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. SPE, p. 587-590, 2011.
- SAĞ, Y.; KAYA, A.; KUTSAL, T. The simultaneous biosorption of Cu (II) and Zn on *Rhizopus arrhizus*: application of the adsorption models. **Hydrometallurgy**, v. 50, n. 3, p. 297-314, 1998.
- SALES, D. S. et al. *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. as an Adjuvant Treatment for Type-2 Diabetes Mellitus: A non-Controlled, Pilot Study. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 12, p. 1816-1821, 2014.
- SEREGIN, I. V. et al. Nickel toxicity and distribution in maize roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 5, p. 711-717, 2003.
- SHAHID, M. et al. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. **Journal of hazardous materials**, v. 325, p. 36-58, 2017.
- SHAHZAD, B. et al. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment-A review. **Plant physiology and biochemistry**, v. 132, p. 641-651, 2018.
- SHEORAN, I. S.; AGGARWAL, Nidhi; SINGH, Randhir. Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant and soil**, v. 129, n. 2, p. 243-249, 1990.
- SHUKLA, R.; GOPAL, R. Excess nickel alters growth, metabolism, and translocation of certain nutrients in potato. **Journal of plant nutrition**, v. 32, n. 6, p. 1005-1014, 2009.
- SINGH, K.; PANDEY, S. N. Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. **Journal of environmental biology**, v. 32, n. 3, p. 391, 2011.
- SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 165-170, 2014.
- SOMASHEKARAIHAH, B. V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A. R. K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 1, p. 85-89, 1992.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1106-1114, 2007.

TRIPATHY, B. C.; BHATIA, B.; MOHANTY, P. Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by Ni²⁺. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 638, n. 2, p. 217-224, 1981.

TURNER, R.C.; MARSHAL, C. Accumulation of Zinc by sub-cellular fraction of root of *Agrotis tennis* Sibith in relation to Zinc tolerance. **New phytologist**. v. 71. 1972. p. 671-676.

VANDEBOSSCHE, M. et al. Remediation of heavy metals by biomolecules: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 15, p. 1644-1704, 2015.

VEERANJANEYULU, K.; DAS, V. S. R. Intrachloroplast localization of ⁶⁵Zn and ⁶³Ni in a Zn-tolerant plant, *Ocimum basilicum* Benth. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, n. 6, p. 1161-1165, 1982.

WALKER, D. J.; CLEMENTE, R.; BERNAL, M. P. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. **Chemosphere**, v. 57, n. 3, p. 215-224, 2004.

WANG, T.; JONSDOTTIR, R.; OLAFSDOTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chemistry**. v. 116. p. 240–248, 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, 2011.

ZHOU, J. et al. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 26, n. 1-2, p. 57-63, 2001.

TABELAS

Tabela 1: Classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EEEP).

Classes de Metabólitos Secundários	EEEP
Alcalóides	-
Triterpenóides	-
Esteróides	-
Saponinas	-
Cumarinas	+
Compostos Fenólicos	+
Taninos	+
Flavonóides	+
Antraquinonas	-
Antocianidinas	-
Leucoantocianidinas	-
Chalconas	-
Catequinas	-
Flavononas	-

+ = resultado positivo; - = resultado negativo

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

TRATAMENTOS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%G	IVG	IV	Radícula (cm)	Hipocótilo (cm)
Controle (H ₂ O)	100 \pm 0,00a	22,83 \pm 1,13a	649,16 \pm 40,22a	5,77 \pm 0,36a	0,72 \pm 0,07ab
0,1	100 \pm 0,00a	22,91 \pm 1,13a	571,41 \pm 50,21a	4,96 \pm 0,42a	0,75 \pm 0,13ab
1	100 \pm 0,00a	22,16 \pm 1,56a	626,37 \pm 93,81a	5,31 \pm 0,98a	0,95 \pm 0,05a
10	100 \pm 0,00a	22,41 \pm 0,94a	548,74 \pm 103,96a	4,50 \pm 0,96a	0,98 \pm 0,15a
100	100 \pm 0,00a	23,62 \pm 1,43a	639,41 \pm 53,25a	5,45 \pm 0,57a	0,94 \pm 0,13a
1000	96 \pm 0,00a	17,76 \pm 0,95b	304,64 \pm 41,56b	2,55 \pm 0,43b	0,62 \pm 0,08b
10.000	50,75 \pm 15,57b	4,61 \pm 1,99c	33,19 \pm 12,41c	0,16 \pm 0,01c	0,48 \pm 0,03b
CV(%)	7,36	8,08	15,28	17,62	15,56

%G – Porcentagem de Germinação; IVG – Índice de Velocidade de Germinação; IV – Índice de Vigor. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 3: Efeito de diferentes concentrações de sulfato de níquel (NiSO₄) sobre parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

TRATAMENTOS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%G	IVG	IV	Radícula (cm)	Hipocótilo (cm)
Controle (H ₂ O)	100 \pm 0,00a	14,64 \pm 0,86a	767,01 \pm 20,83a	6,84 \pm 0,36a	0,83 \pm 0,28ab
0,1	98 \pm 2,00a	12,02 \pm 0,68a	664,58 \pm 114,04a	5,78 \pm 0,90a	1,00 \pm 0,34a
1	98 \pm 2,00a	15,16 \pm 0,56a	661,90 \pm 40,34a	5,95 \pm 0,29a	0,81 \pm 0,21ab
10	98 \pm 3,46a	14,76 \pm 1,19a	391,08 \pm 35,49b	2,93 \pm 0,55b	1,08 \pm 0,15a
100	94 \pm 3,46a	14,21 \pm 0,59a	41,12 \pm 7,88c	0,19 \pm 0,020c	0,24 \pm 0,07b
1000	-	-	-	-	-
CV(%)	2,99	6,72	13,09	13,83	34,17

%G – Porcentagem de Germinação; IVG – Índice de Velocidade de Germinação; IV – Índice de Vigor. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4: Efeito do potencial protetor de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) combinadas com diferentes concentrações do sulfato de níquel (NiSO_4) sobre os parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L.

TRATAMENTOS ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	%G	IVG	IV	IT
Controle (H_2O)	100 \pm 0,00a	16,49 \pm 0,56a	748,13 \pm 15,38ab	1,0 \pm 0,00b
0,5 EEEP	99 \pm 1,73a	17,12 \pm 2,33a	783,60 \pm 50,78ab	1,06 \pm 0,14ab
5,0 EEEP	99 \pm 1,73a	18,28 \pm 1,23a	745,89 \pm 73,17ab	0,97 \pm 0,06b
2,5 NiSO_4	97 \pm 2,00a	16,87 \pm 0,83a	392,55 \pm 91,44c	1,25 \pm 0,10a
0,5 EEEP x 2,5 NiSO_4	99 \pm 1,73a	19,17 \pm 1,64a	860,30 \pm 37,88a	0,91 \pm 0,04b
5,0 EEEP x 2,5 NiSO_4	100 \pm 0,00a	20,06 \pm 1,24a	657,37 \pm 88,40b	1,04 \pm 0,07ab
CV(%)	1,71	9,13	10,85	9,31
Controle (H_2O)	100 \pm 0,00a	16,49 \pm 0,56b	748,13 \pm 15,38a	1,0 \pm 0,00b
0,5 EEEP	99 \pm 1,73a	17,12 \pm 2,33b	783,60 \pm 50,78a	1,06 \pm 0,14b
5,0 EEEP	99 \pm 1,73a	18,28 \pm 1,23ab	745,89 \pm 73,17a	0,97 \pm 0,06b
5,0 NiSO_4	100 \pm 0,00a	20,57 \pm 0,71ab	423,22 \pm 96,15b	1,35 \pm 0,12a
0,5 EEEP x 5,0 NiSO_4	100 \pm 0,00a	16,97 \pm 3,00b	688,43 \pm 197,7a	1,04 \pm 0,13b
5,0 EEEP x 5,0 NiSO_4	100 \pm 0,00a	22,51 \pm 1,43a	806,74 \pm 65,55a	0,95 \pm 0,04b
CV(%)	1,42	10,94	16,62	10,94
Controle (H_2O)	100 \pm 0,00a	16,49 \pm 0,56b	748,13 \pm 15,38a	1,0 \pm 0,00c
0,5 EEEP	99 \pm 1,73a	17,12 \pm 2,33ab	783,60 \pm 50,78a	1,06 \pm 0,14c
5,0 EEEP	99 \pm 1,73a	18,28 \pm 1,23ab	745,89 \pm 73,17a	0,97 \pm 0,06c
25,0 NiSO_4	98 \pm 2,00a	16,88 \pm 2,34b	86,87 \pm 9,78c	2,24 \pm 0,13a
0,5 EEEP x 25,0 NiSO_4	100 \pm 0,00a	18,05 \pm 1,24ab	181,91 \pm 26,11bc	1,85 \pm 0,07b
5,0 EEEP x 25,0 NiSO_4	100 \pm 0,00a	21,53 \pm 1,93a	241,19 \pm 62,25b	1,66 \pm 0,15b
CV(%)	1,5	11,07	11,49	8,72

%G – Porcentagem de Germinação; IVG – Índice de Velocidade de Germinação; IV – Índice de Vigor; IT – Índice de Tolerância ao Níquel. Valores expressos por média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos das soluções isoladas e combinadas do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) e sulfato de níquel (NiSO₄).

TRATAMENTOS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	pH	CE (dS.m^{-1})	Ψ_o (MPa)
Controle (H ₂ O)	6,36 \pm 0,09d	0,0029 \pm 0,00e	- 0,0001 \pm 0,00a
0,5 EEEP	6,51 \pm 0,00cd	0,0047 \pm 0,00d	- 0,0002 \pm 0,00b
5,0 EEEP	6,61 \pm 0,04bc	0,0057 \pm 0,00d	- 0,0002 \pm 0,00b
2,5 NiSO ₄	6,56 \pm 0,07c	0,0285 \pm 0,00a	- 0,0010 \pm 0,00e
0,5 EEEP x 2,5 NiSO ₄	6,74 \pm 0,05ab	0,0158 \pm 0,00c	- 0,0006 \pm 0,00c
5,0 EEEP x 2,5 NiSO ₄	6,84 \pm 0,10a	0,0193 \pm 0,00b	- 0,0007 \pm 0,00d
CV(%)	1,1	4,95	4,41
Controle (H ₂ O)	6,36 \pm 0,09c	0,0029 \pm 0,00e	- 0,0001 \pm 0,00a
0,5 EEEP	6,51 \pm 0,00b	0,0047 \pm 0,00d	- 0,0002 \pm 0,00b
5,0 EEEP	6,61 \pm 0,04ab	0,0057 \pm 0,00d	- 0,0002 \pm 0,00b
5,0 NiSO ₄	6,27 \pm 0,02c	0,0274 \pm 0,00a	- 0,0009 \pm 0,00c
0,5 EEEP x 5,0 NiSO ₄	6,54 \pm 0,00ab	0,0245 \pm 0,00b	- 0,0010 \pm 0,00d
5,0 EEEP x 5,0 NiSO ₄	6,64 \pm 0,02a	0,0272 \pm 0,00a	- 0,0010 \pm 0,00d
CV(%)	0,73	2,53	5,09
Controle (H ₂ O)	6,36 \pm 0,09c	0,0029 \pm 0,00b	- 0,0001 \pm 0,00a
0,5 EEEP	6,51 \pm 0,00b	0,0047 \pm 0,00b	- 0,0002 \pm 0,00a
5,0 EEEP	6,61 \pm 0,04a	0,0057 \pm 0,00b	- 0,0002 \pm 0,00a
25,0 NiSO ₄	6,09 \pm 0,01d	0,1013 \pm 0,00a	- 0,0036 \pm 0,00b
0,5 EEEP x 25,0 NiSO ₄	6,47 \pm 0,00b	0,1044 \pm 0,00a	- 0,0037 \pm 0,00b
5,0 EEEP x 25,0 NiSO ₄	6,55 \pm 0,01ab	0,1046 \pm 0,00a	-0,0037 \pm 0,00b
CV(%)	0,71	3,79	3,92

pH – pH das soluções; Ψ_o – Potencial Osmótico. Valores expressos por média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 6: Efeito do potencial protetor do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel (NiSO₄) nos níveis dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, totais e carotenoides) de *Lactuca sativa*.

TRATAMENTOS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pigmentos Fotossintéticos ($\mu\text{g.g MF}^{-1}$)			
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas Totais	Carotenóides
Controle (H ₂ O)	391,58 \pm 60,10ab	151,98 \pm 25,04ab	543,56 \pm 80,21ab	107,06 \pm 15,72ab
0,5 EEEP	345,05 \pm 80,21b	142,63 \pm 15,72b	487,69 \pm 65,97b	90,64 \pm 9,42b
5,0 EEEP	390,32 \pm 45,90ab	162,39 \pm 16,18ab	552,71 \pm 62,02ab	102,24 \pm 15,85ab
2,5 NiSO ₄	428,32 \pm 0,32ab	172,69 \pm 0,11ab	601,01 \pm 0,43ab	111,09 \pm 0,07ab
0,5 EEEP x 2,5 NiSO ₄	432,88 \pm 61,05 \pm ab	176,53 \pm 18,58ab	609,41 \pm 79,40ab	112,29 \pm 13,62ab
5,0 EEEP x 2,5 NiSO ₄	501,25 \pm 59,71a	192,83 \pm 18,06a	694,09 \pm 77,76a	127,95 \pm 12,54a
CV(%)	14,45	12,82	13,74	13,54
Controle (H ₂ O)	391,58 \pm 60,10ab	151,98 \pm 25,04ab	543,56 \pm 80,21ab	107,06 \pm 15,72ab
0,5 EEEP	345,05 \pm 80,21b	142,63 \pm 15,72b	487,69 \pm 65,97b	90,64 \pm 9,42b
5,0 EEEP	390,32 \pm 45,90ab	162,39 \pm 16,18ab	552,71 \pm 62,02ab	102,24 \pm 15,85ab
5,0 NiSO ₄	508,29 \pm 31,03a	200,58 \pm 10,61a	708,87 \pm 41,62a	127,88 \pm 6,41a
0,5 EEEP x 5,0 NiSO ₄	407,01 \pm 61,02ab	164,97 \pm 22,37ab	571,98 \pm 83,39ab	108,73 \pm 15,14ab
5,0 EEEP x 5,0 NiSO ₄	468,62 \pm 29,91ab	185,55 \pm 8,93ab	654,18 \pm 38,75ab	117,50 \pm 8,02ab
CV(%)	13,14	12,55	13,06	13,46
Controle (H ₂ O)	391,58 \pm 60,10b	151,98 \pm 25,04bc	543,56 \pm 80,21b	107,06 \pm 15,72ab
0,5 EEEP	345,05 \pm 80,21b	142,63 \pm 15,72bc	487,69 \pm 65,97b	90,64 \pm 9,42b
5,0 EEEP	390,32 \pm 45,90b	162,39 \pm 16,18b	552,71 \pm 62,02b	102,24 \pm 15,85b
25,0 NiSO ₄	209,38 \pm 0,32c	103,10 \pm 0,11c	312,48 \pm 0,43c	48,75 \pm 0,07c
0,5 EEEP x 25,0 NiSO ₄	134,76 \pm 12,64c	171,13 \pm 14,24b	305,9 \pm 22,67c	104,53 \pm 10,86ab
5,0 EEEP x 25,0 NiSO ₄	576,92 \pm 4,95a	207,51 \pm 4,61a	724,68 \pm 8,77a	122,68 \pm 1,92a
CV(%)	16,37	13,75	15,14	15,29

Valores expressos por média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

FIGURAS

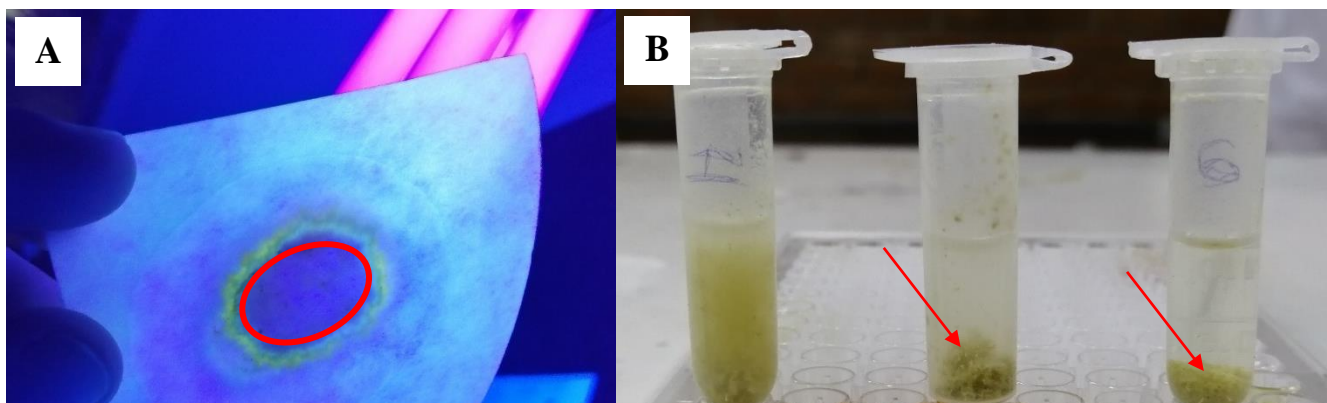


Figura 2: Prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). A) Formação da coloração azul escuro é um indicativo da presença de cumarinas. B) Formação de um precipitado branco é um indicativo da presença de taninos. Setas indicam a formação do precipitado.

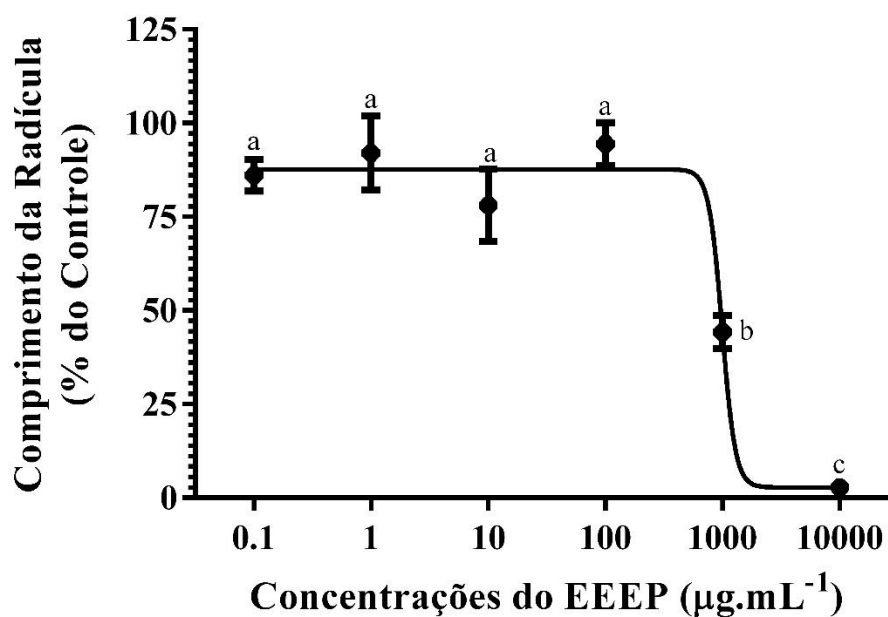


Figura 3: Gráfico da CI_{50} (Concentração Inibitória Média), calculado a partir do comprimento radicular de plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP). Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

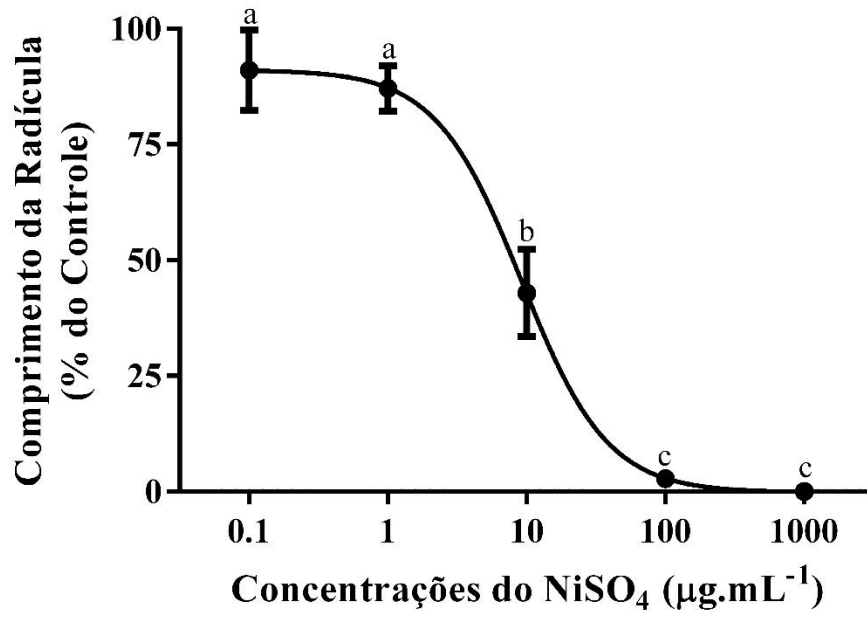


Figura 4: Gráfico da CI_{50} (Concentração Inibitória Média), calculado a partir do comprimento radicular de plântulas de *Lactuca sativa* L. submetidas a diferentes concentrações do $NiSO_4$. Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

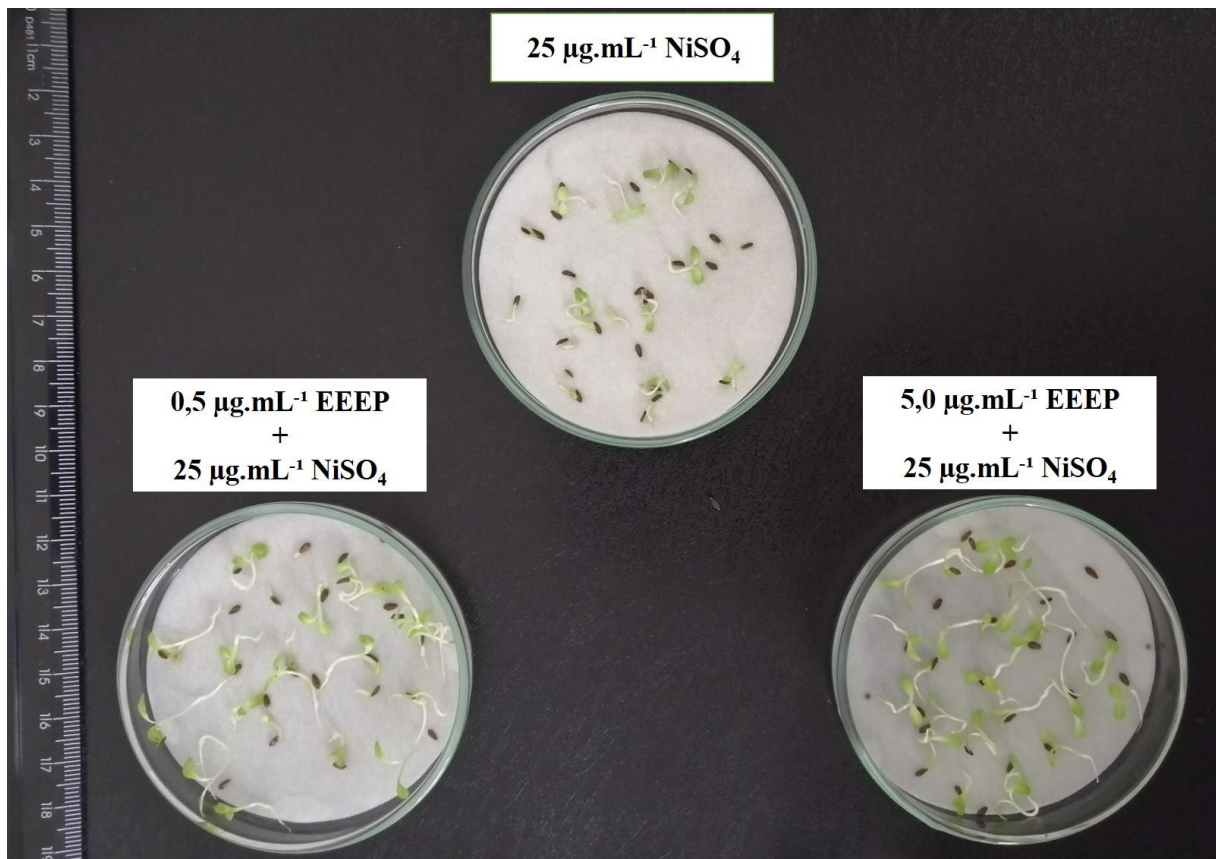


Figura 5: Germinação de sementes de *Lactuca sativa* após sete dias de cultivo em microambientes na presença de sulfato de níquel (NiSO_4) isolado e combinado com o extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP).



Figura 6: Efeito do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel (NiSO_4) no desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

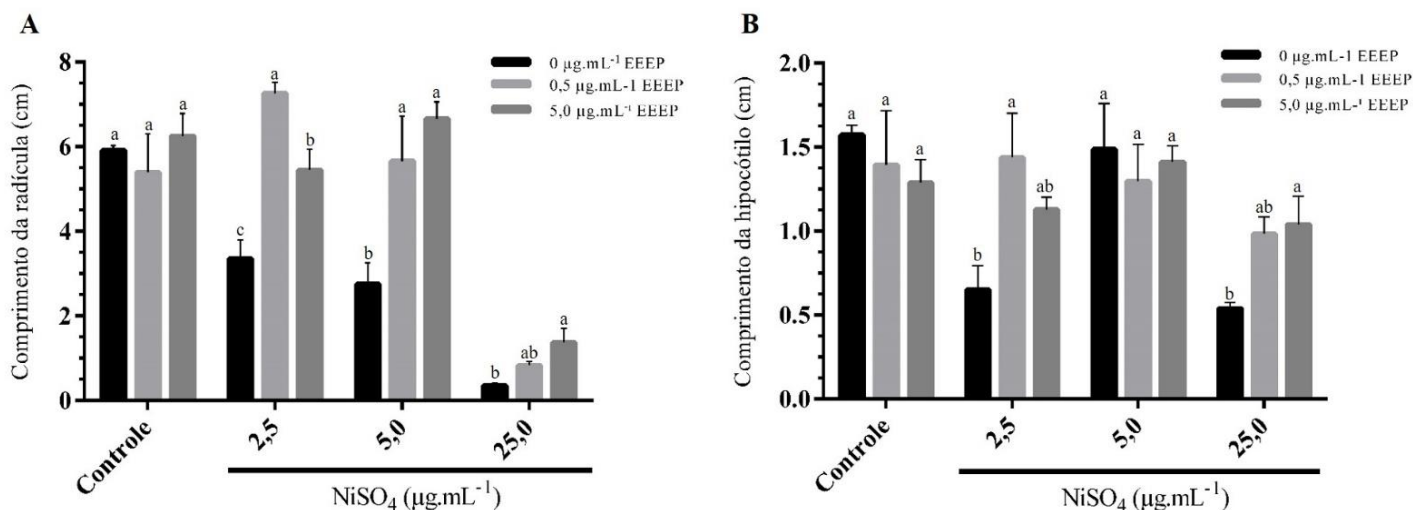


Figura 7: Efeito do potencial protetor de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) sobre a fitotoxicidade induzida por sulfato de níquel (NiSO_4) no (A) comprimento radicular e (B) comprimento do hipocótilo em *Lactuca sativa* L. Valores expressos em média \pm erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si na mesma concentração do sulfato de níquel (NiSO_4) pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

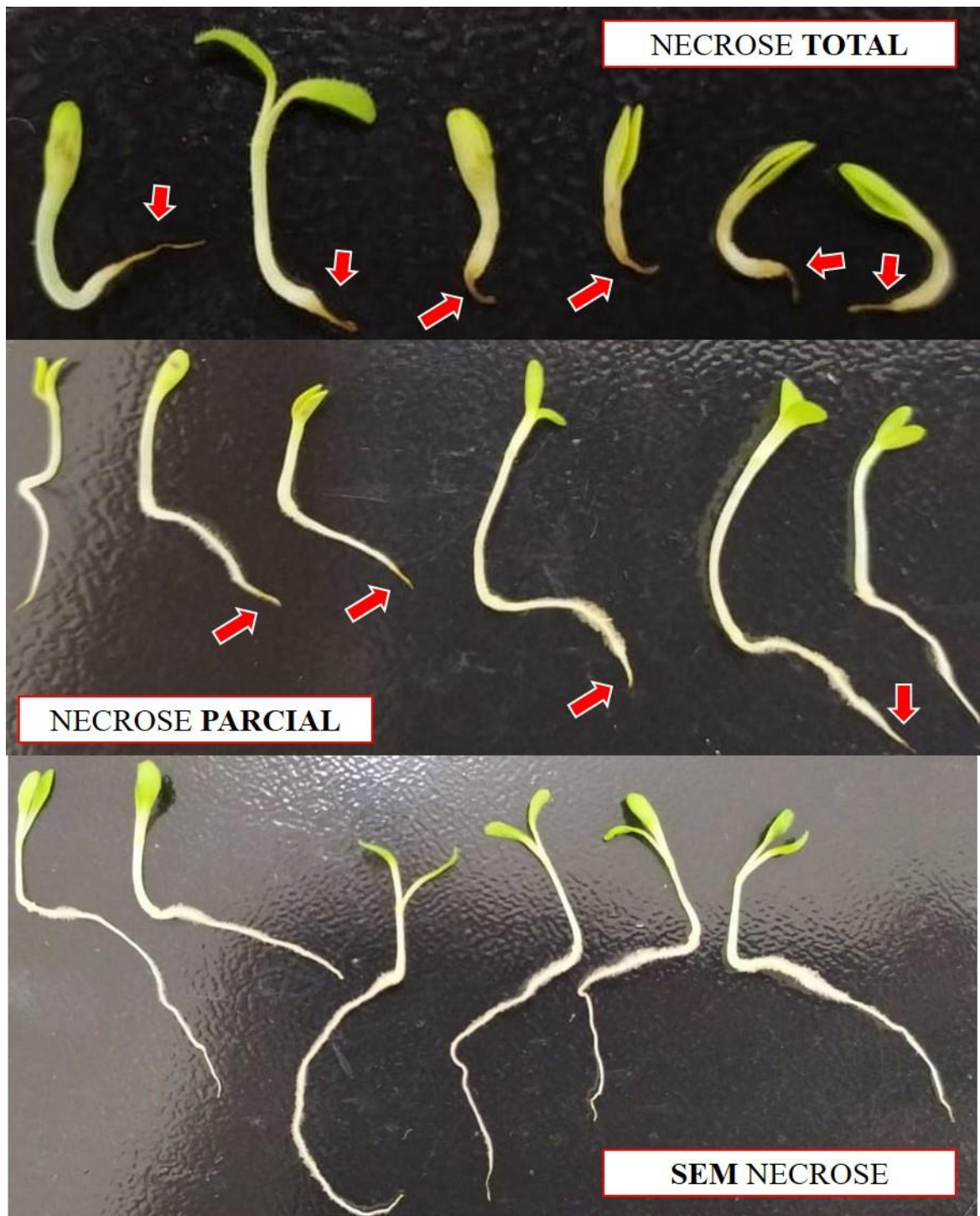


Figura 8: Parâmetros adotados para qualificação do nível de necrose radicular para plântulas de *Lactuca sativa*, as setas indicam a presença de necrose.

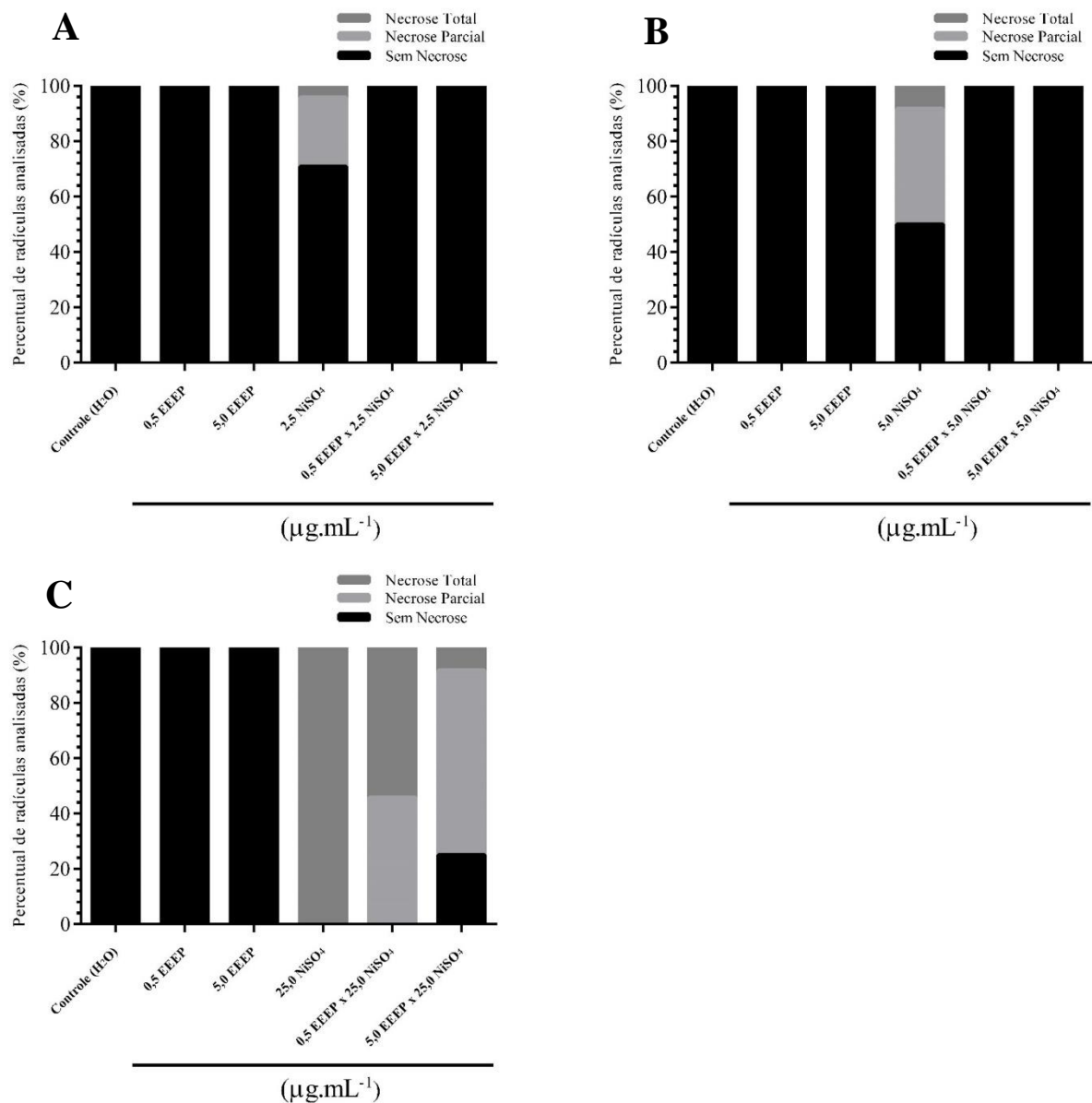


Figura 9: Percentual de necrose radicular das plântulas de *Lactuca sativa* L. cultivadas na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Eugenia punicifolia* (EEEP) e sulfato de níquel (NiSO₄) isoladas e combinadas. A) Concentração de NiSO₄ (2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), B) Concentração de NiSO₄ (5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e B) Concentração de NiSO₄ (25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

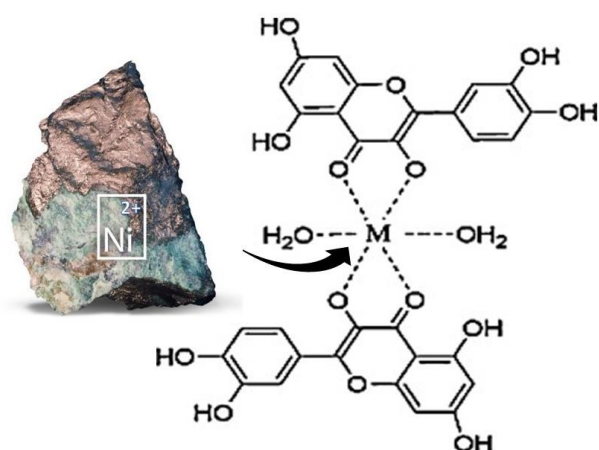


Figura 10: Estrutura do complexo metálico quercetina de níquel (II) adaptado de Dolatabadi (2011).

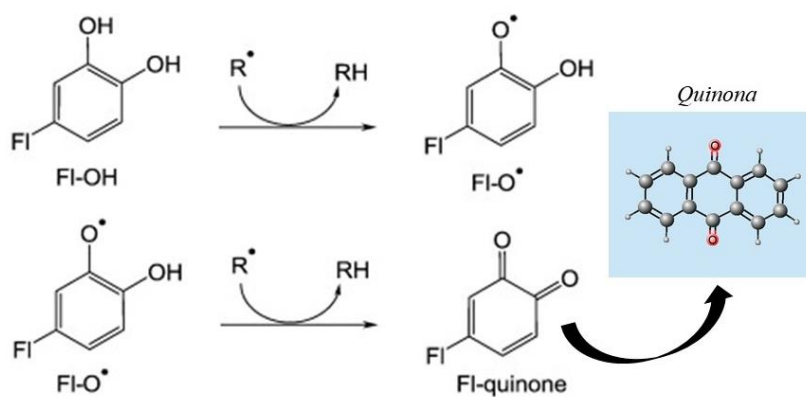


Figura 11: Esquema da eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por flavonoides. Adaptado de Dolatabadi (2011).