

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA MINERAL**

DAIANE MARIA MELO PAZINATO

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *Eugenia uniflora* L.
(PITANGUEIRA) EM RESPOSTA AO AMBIENTE DE
MINERAÇÃO DE CALCÁRIO**

Caçapava do Sul, RS, Brasil

2017

DAIANE MARIA MELO PAZINATO

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *Eugenia uniflora* L.
(PITANGUEIRA) EM RESPOSTA AO AMBIENTE DE
MINERAÇÃO DE CALCÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Mineral da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Mineral.
Área de concentração: Gestão Ambiental e Sustentabilidade na Mineração

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anelise Marlene Schmidt

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline Wagner

Caçapava do Sul, RS, Brasil

2017

DAIANE MARIA MELO PAZINATO

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *Eugenia uniflora* L.
(PITANGUEIRA) EM RESPOSTA AO AMBIENTE DE
MINERAÇÃO DE CALCÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Mineral da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia Mineral.
Área de concentração: Gestão Ambiental e Sustentabilidade na Mineração

Dissertação defendida e aprovada em: 30 de novembro de 2017.
Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Anelise Marlene Schmidt
Orientadora
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Pedro Daniel da Cunha Kemerich
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Vicente Guilherme Lopes
(UNIPAMPA)

Prof.^a Dr.^a Elci Terezinha Henz Franco
(UFSM)

Dedico este trabalho aos meus amados
sobrinhos Dienyfer dos Santos Pazinato
(*in memoriam*) e Cauan Pazinato (*in
memoriam*), que apesar da breve
passagem na vida terrena foram grandes
exemplos de amor e perseverança e me
inspiram a nunca desistir frente aos
obstáculos. Obrigada pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida, por me guiar, e me ajudar a vencer os obstáculos;

Ao meu filho Matheus, razão maior do meu viver, que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor;

Aos meus familiares pela motivação e amor para superar os momentos mais difíceis;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Anelise Schmidt, pela oportunidade, confiança e motivação durante a trajetória e também pela sua amizade;

À Prof.^a Dr.^a Caroline Wagner, minha coorientadora, por compartilhar seus conhecimentos;

Ao Professor Dr. Júlio Soares e a prof.^a Dr.^a Zilda Vendrame pelas valiosas sugestões;

Ao Stener Camargo pela importante contribuição na obtenção dos extratos, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Guilherme Casa Nova, e a Francisca Oliveira e Silva, pelo auxílio prestado durante as minhas pesquisas no Laboratório de Química;

À Ângela Cristina Bertoi Fleck pelas análises realizadas nos solos;

Aos meus queridos amigos Adriane, Darliane, Luiz e Fabiano pela amizade fraterna e apoio em todos os momentos;

À Universidade Federal do Pampa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Mineral pela oportunidade de tornar-me mestre;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido com dedicação;

A todos os colegas de mestrado, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados, em especial ao Bruno Flores e a Joseane Schroeder pelo auxílio prestado nas coletas;

A todos os funcionários da Unipampa, pelo auxílio e bom atendimento;

Aos membros avaliadores da banca desde já agradeço as contribuições;

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Em minhas preces de todo dia, sempre
peço coragem e paciência. Coragem
para continuar superando as dificuldades
do caminho naqueles que não me
compreendem. E paciência, para não me
entregar ao desânimo diante das minhas
fraquezas.”

Chico Xavier

RESUMO

As condições ambientais podem influenciar a composição e produção dos metabólitos secundários, ocasionando maior ou menor capacidade antioxidante nas plantas. Em áreas de mineração ocorrem modificações no meio ambiente, alterações estas que podem vir a interferir nos constituintes do vegetal. Neste trabalho foi comparada a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. presente em área de mineração com uma área controle, bem como, foram feitas investigações da condição do meio ambiente. A atividade antioxidante foi analisada através de dois métodos: complexação do fosfomolibdênio e o método de sequestro de radicais livres DPPH° (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Tendo em vista verificar a qualidade dos solos onde estavam as plantas, foi verificado o pH e investigada a presença de alguns elementos químicos. Na região de mineração não houve detecção de alguns elementos que são essenciais para a nutrição vegetal, são eles: cobre, molibdênio, níquel e zinco, assim como, ocorreu uma menor concentração de cobalto, que também é considerado um elemento essencial. A determinação do pH dos solos possibilitou definir o solo da área de mineração como básico ($8,85 \pm 0,78$), enquanto que o da área controle foi caracterizado como ácido ($5,37 \pm 0,35$). O valor de pH elevado na área de mineração é um fator que causa mais impactos na nutrição vegetal que a acidez do solo da área controle, pois a disponibilidade de nutrientes é afetada em maior proporção. As análises de água indicaram que a qualidade da água na área controle está adequada, enquanto que na área de mineração, os níveis de dureza, condutividade, cálcio e magnésio estavam elevados por se tratar de uma bacia de decantação de efluentes líquidos de fábrica de cal. A atividade antioxidante da planta localizada na área de mineração foi maior que a da planta da área controle, que não está sob influência de atividades de mineração. No método de complexo do fosfomolibdênio, a análise estatística demonstrou que entre os extratos de *Eugenia uniflora* L. das duas áreas analisadas não há diferença expressiva. No método de sequestro de radicais livres (DPPH) houve diferença significativa entre os distintos extratos. O maior percentual de atividade

antioxidante observado foi de 96,55% para o extrato da área de mineração, enquanto que para a área controle foi 92,78%. Alguns fatores podem ocasionar estresse nas espécies vegetais, promovendo um aumento nos compostos antioxidantes, aspecto esse que pode ser relacionado ao aumento dos níveis de pH no solo da área de mineração, assim como a ausência ou deficiência de elementos que são essenciais para a nutrição vegetal.

Palavras-chave: Alteração ambiental. Defesa vegetal. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Environmental conditions can influence the composition and production of secondary metabolites, causing greater or lesser antioxidant capacity in plants. In mining areas there are changes in the environment, which may interfere with the constituents of the plant. In this work, the antioxidant activity of *the Eugenia uniflora* L. ethanolic extract present in a mining area with a control area was compared, as well as investigations of the condition of the environment. The antioxidant activity was analyzed by two methods: phosphomolybdenum complexation and the free radical sequestration method DPPH ° (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). In order to verify the quality of the soils where the plants were, the pH was verified and the presence of some chemical elements was investigated. In the mining region there was no detection of some elements that are essential for plant nutrition: copper, molybdenum, nickel and zinc, as well as a lower concentration of cobalt, which is also considered an essential element. The determination of the pH of the soils allowed to define the soil of the mining area as basic (8.85 ± 0.78), while that of the control area was characterized as acid (5.37 ± 0.35). The high pH value in the mining area is a factor that causes more impacts on plant nutrition than the soil acidity of the control area, because the availability of nutrients is affected to a greater extent. The water analysis indicated that the water quality in the control area is adequate, while in the mining area the hardness, conductivity, calcium and magnesium levels were high because it was a sedimentation basin of liquid effluents from the lime factory . The antioxidant activity of the plant located in the mining area was higher than that of the control area, which is not under the influence of mining activities. In the phosphomolybdenum complex method, the statistical analysis showed that between the extracts of *Eugenia uniflora* L. of the two analyzed areas there is no significant difference. In the free radical sequestration method (DPPH) there was a significant difference between the different extracts. The highest percentage of antioxidant activity observed was 96.55% for the extract from the mining area, while for the control area it was 92.78%. Some factors can cause stress in the plant species, promoting an increase in the antioxidant compounds, which aspect may be related to the increase of pH levels in the soil

of the mining area, as well as the absence or deficiency of elements that are essential for plant nutrition .

Key words: Environmental change. Vegetable defense. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Eugenia uniflora</i> L. (pitangueira). A) Folhas B) Flores C)Frutos D) Planta | 26 |
| Figura 2 - Mapa Indicativo das áreas em estudo..... | 28 |
| Figura 3 - Mapa indicativo da área de mineração | 29 |
| Figura 4 - Mapa indicativo da área controle | 30 |
| Figura 5 - Extrator Soxhlet..... | 31 |
| Figura 6 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e o antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. | 35 |
| Figura 7 - Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) antes e após redução (difenil-picril-hidrazina) | 36 |
| Figura 8 - Influência do pH do solo na disponibilidade de nutrientes | 43 |
| Figura 9 - Atividade antioxidante dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> através do método fosfomolibdênio. | 45 |
| Figura 10 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Análises das amostras de águas das áreas em estudo | 38 |
| Tabela 2 - Elementos e compostos químicos identificados nas amostras de solos das áreas em estudo | 39 |
| Tabela 3 - Valores de pH obtidos nas amostras de solos | 43 |
| Tabela 4 - Atividade Antioxidante dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> através do método fosfomolibdênio | 45 |
| Tabela 5 - Atividade antioxidante em equivalentes de Ácido Ascórbico..... | 46 |
| Tabela 6 - Atividade antioxidante dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> através do método DPPH | 46 |
| Tabela 7 - Atividade antioxidante dos extratos de <i>E. uniflora</i> em equivalentes de Ácido Gálico | 47 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Objetivos | 14 |
| 1.1.1 Objetivo geral | 14 |
| 1.1.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 1.2 Justificativa | 15 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1 Atividades de mineração e impactos ambientais | 16 |
| 2.2 Metabolismo vegetal e defesa antioxidante | 18 |
| 2.3 Antioxidantes | 23 |
| 2.4 <i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitangueira) | 25 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 Área de estudo | 28 |
| 3.1.1 Caracterização Geológica | 29 |
| 3.2 Material vegetal e obtenção dos extratos | 30 |
| 3.3 Análises de águas e solos | 31 |
| 3.4 Determinação da atividade antioxidante | 33 |
| 3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de complexação do fosfomolibdênio | 34 |
| 3.4.2 Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH | 35 |
| 3.5 Análise estatística | 37 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5 CONCLUSÃO | 49 |
| 6 RECOMENDAÇÕES | 50 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

1 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração geralmente causam impacto significativo ao meio ambiente, alterando a água, o ar, o solo, o subsolo e a paisagem como um todo. Os impactos que ocorrem nestas áreas podem levar as plantas a condições de estresse, que como mecanismo de defesa alteram seu metabolismo.

Nas plantas, as respostas aos estímulos ambientais ocorrem através da ativação da produção de metabólitos secundários (WEIDNER et al., 2000). Quando os vegetais estão sob estresse pode ocorrer a produção de radicais livres, que podem ser estabilizados ou desativados pelas defesas antioxidantes (ATOUI et al., 2005; VALKO et al., 2007).

A eficácia da ação antioxidante desses compostos depende de sua concentração no vegetal, que além dos fatores genéticos, são influenciados pelas condições do ambiente (KÄHKÖNEN et al., 1999; MELO et al., 2006).

A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo, frutos, folhas e sementes está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais (VELIOGLU, et al., 1998), tendo a espécie *Eugenia uniflora* comprovada ação antioxidante (BAGETTI, 2009; LIMA, MÉLO, LIMA, 2002; LUZIA, BERTANHA, JORGE, 2010; VERGARA et al, 2016).

A *Eugenia uniflora* é popularmente conhecida como pitangueira, pertence à Família Myrtaceae e tem seu cultivo disseminado por vários países do mundo, inclusive no Brasil (LORENZI, 2008), sendo muito comum no Rio Grande do Sul.

Esta planta começou a ser estudada devido às propriedades benéficas à saúde atribuídas às folhas (ADEBAJO, OLOKI, ALADESANMI, 1989). Diversos trabalhos comprovam os efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo e antimicrobiológico de extratos de frutos e folhas da pitangueira (BAGETTI, 2009; SANTOS et al., 2013; VELAZQUEZ et al., 2003; VICTORIA et al., 2012). A presença de antocianinas aliada aos teores de flavonoides e carotenoides totais fazem desta planta uma fonte promissora de compostos antioxidantes (LIMA, MÉLO, LIMA, 2002).

O estudo da atividade antioxidante da pitangueira faz-se importante em áreas de mineração, pois a produção dos metabólitos secundários pode ser alterada em decorrência das modificações ambientais que podem ocorrer nessas áreas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo consiste em investigar se há alteração na capacidade antioxidante de *Eugenia uniflora* L. que está sob influência dos processos de mineração de calcário.

1.1.2 Objetivos específicos

-Avaliar e comparar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos foliares de *Eugenia uniflora* de duas áreas distintas, uma área utilizada como controle e outra de mineração de calcário;

-Verificar o pH do solo, assim como os minerais presentes e sua relação com a atividade antioxidante da *Eugenia uniflora*.

-Analisar o pH, condutividade, alcalinidade e a dureza das águas localizadas próximas das áreas de coleta do material botânico, e relacionar os resultados com a capacidade antioxidante da *Eugenia uniflora*.

1.2 Justificativa

Todas as atividades de mineração, independente do grau, alteram o meio ambiente, pois modificam ou suprimem a vegetação nativa, alteram o solo e provocam mudanças na qualidade da água.

O estudo da vegetação em áreas de mineração é importante, pois as plantas podem ter o seu metabolismo modificado devido às alterações causadas no ambiente. Desta forma, o presente trabalho é desenvolvido através da investigação da atividade antioxidante da *Eugenia uniflora*, tendo em vista a interferência que a mineração pode vir a causar no metabolismo das espécies vegetais.

Pesquisas sobre a atividade antioxidante da espécie *Eugenia uniflora* vêm sendo realizadas, contudo, estudos sobre plantas localizadas em áreas de mineração têm sido pouco investigados. Desta maneira buscou-se neste trabalho verificar o potencial antioxidante de um exemplar da referida espécie que se encontra sob influência das atividades mineradoras de calcário.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Atividades de mineração e impactos ambientais

A mineração geralmente causa impacto significativo ao meio ambiente, pois quase sempre o desenvolvimento dessa atividade implica na supressão da vegetação, exposição do solo aos processos erosivos com alterações na quantidade e qualidade dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, além de causar poluição do ar, entre outros aspectos negativos (MECHI, SANCHES, 2010).

Por se tratar da extração de recursos naturais não renováveis da crosta terrestre, a mineração geralmente é vista como uma atividade altamente impactante e não sustentável. Por outro lado, a mineração é a base da sociedade industrial moderna, fornecendo matéria-prima para todos os demais setores da economia, sendo, portanto essencial ao desenvolvimento (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2001).

No município de Caçapava do Sul ocorre a prática de atividades ligadas à extração e beneficiamento de calcário, sendo reconhecido seu potencial minerador.

A mineração de superfície é uma atividade responsável por grandes impactos por promover retirada da camada superficial do solo (KOBAYAMA, MINELLA, FABRIS, 2001). E oferece, sem dúvida, um caminho direto à entrada das águas de chuva e escoamento superficial na cava criada pela lavra (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2006).

As minas de lavra de calcário são em sua maioria a céu aberto e, por este motivo, expostas às variações climáticas e atmosféricas. Junto à mineração de calcário há também a ocorrência de outros metais, o que contribui para sua inclusão nos resíduos dos respectivos processos de lavra (SCHMIDT et al., 2015).

A qualidade das águas dos rios e reservatórios da mesma bacia, a jusante do empreendimento, pode ser prejudicada em razão da turbidez

provocada pelos sedimentos finos em suspensão, assim como pela poluição causada por substâncias lixiviadas e carregadas ou contidas nos efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxa, metais pesados (MECHI, SANCHES, 2010).

As águas superficiais e subterrâneas, que percolam os solos, contêm elementos metálicos que são lixiviados alcançando riachos por dissolução iônica ou dispersão coloidal. O potencial hidrogeniônico é importante na dissolução como também na precipitação dos elementos nas águas dentro da área de uma mineradora. Nas estações de muita chuva, as águas contêm mais gás carbônico, havendo predominância de carbonatos em relação a cloretos e sulfatos, sendo o cálcio o cátion predominante. Já nos períodos de seca, os sulfatos e os cloretos predominam e diminuem os teores de cálcio (BRANCO, 1959).

Quando alguns metais permanecem no solo, eles podem atacar fortemente a matéria orgânica e os minerais. Nas águas superficiais, os metais podem percorrer grandes distâncias, tanto de forma suspensa como partículas pequenas, ou na forma de íons livres (BRANCO, 1959).

O meio biótico depende dos elementos que formam o solo bem como participam de sua composição. As relações entre os meios biótico e físico caracterizam-se por uma constante permuta de elementos através de reações físicas, químicas e biológicas (INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO 1992).

A operação de uma mina a céu aberto se desenvolve com a remoção de camadas de solo e estéreis que encobrem o mineral. Os efeitos provocados pela mineração variam de intensidade conforme o tipo de lavra, o tamanho da mina e as características ambientais da região. Como decorrência da exploração mineral os principais impactos no meio biótico são a remoção da flora ou o seu deslocamento, alteração das propriedades físicas do solo e contaminação dos recursos hídricos que irrigam a flora local (INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 1992).

A vegetação pode fornecer dados preciosos à prospecção mineral, pois, o metabolismo vegetal é influenciado por vários elementos, necessários ao desenvolvimento da planta. Disto resulta um maior ou menor desenvolvimento

de algumas espécies vegetais e pode-se dizer que estas apresentam preferências por áreas onde determinados elementos estão presentes (BRANCO, 1959).

As plantas absorvem do solo, sem muita discriminação, os elementos essenciais, os benéficos e os tóxicos, podendo estes últimos, inclusive, levá-las à morte (FAQUIN, 2005).

Os resultados dos efeitos de alguns elementos nas plantas podem variar de acordo com a capacidade de cada espécie em tolerar esses contaminantes. Espécies mais sensíveis apresentam sintomas fitotóxicos com concentrações pequenas do contaminante, enquanto que espécies tolerantes podem acumular grandes concentrações (CARVALHO et al., 2013).

Geralmente, as folhas possuem tecidos mais delicados, tornando-as mais sensíveis às condições ambientais, especialmente, atmosféricas. Mas, o contato da planta com elementos-traço do solo pode ser rapidamente percebido pelos sintomas de fitotoxidez, como a clorose e a necrose foliar. Quando isso acontece, é possível verificar respostas plásticas nos tecidos que resultam em modificações morfológicas e anatômicas nesse órgão das plantas (SHI, CAI, 2009).

2.2 Metabolismo vegetal e defesa antioxidante

Para assegurar sua sobrevivência no meio, as plantas necessitam de diferentes formas de proteção, já que não podem deslocar-se para evitar o ataque de possíveis agressores (NEILSON et al., 2013).

Durante anos a pressão da seleção natural sobre as plantas resultou em mudanças evolutivas na sua estrutura genética e expressão gênica, propiciando a formação de novas rotas biosintéticas, cuja principal função é a síntese de compostos químicos (SCHWAB, 2003). Dessa forma, a produção e característica química desses compostos foram selecionadas ao longo da evolução, de forma a suprir necessidades específicas de grupos restritos de plantas (PICHERSKY, GANG, 2000).

Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007).

Em condições naturais, as plantas mantêm os metabolismos primário e secundário integrados, onde a maior parte do carbono fotoassimilado vai para a manutenção do metabolismo primário e uma parte menor para o secundário, uma vez que os metabólitos secundários, na maioria das vezes, são sintetizados em menor proporção (HAGERMAN, 1987).

Muitas plantas superiores respondem aos estímulos ambientais através da ativação da produção de metabólitos secundários, a produção desses compostos é controlada por diversos fatores internos e externos como hormônios, luz, nutrientes, água, etc. (HARBORNE, 1983; WEIDNER et al., 2000).

Os metabólitos secundários não são distribuídos uniformemente pela planta, a sua produção ocorre num órgão ou tecido específico ou ainda em um tipo de célula em determinado estágio de desenvolvimento. Geralmente são produzidos numa parte da planta e estocados em outra (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

Nos últimos anos ocorreram avanços na compreensão da regulação dos fluxos metabólicos entre o metabolismo primário e secundário. Por sintetizarem uma infinidade de compostos secundários, as plantas passaram a atrair grande interesse científico em estudos que visam manipular essa interface, podendo dessa forma interferir com a produção desses compostos naturais (AHARONI, GALILI, 2011).

A produção dos metabólitos secundários está intimamente ligada ao metabolismo primário das plantas, cujas vias metabólicas promovem os processos fisiológicos comuns a todas as espécies vegetais, entre eles, fotossíntese, respiração e transporte de solutos (AHARONI, GALILI, 2011).

Todas as plantas dependem da disponibilidade de nutrientes, luz e água para o seu crescimento (COLEY, BRYANT, CHAPIN III, 1985). Fatores ambientais podem interferir levando a desequilíbrios na planta, o que pode

gerar estresses, entre eles o estresse oxidativo, causando danos oxidativos, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que funcionam como moléculas de sinalização em plantas envolvidas na regulação de respostas de defesa (APEL, HIRT, 2004).

Essas moléculas de sinalização, de forma geral, estimulam o aumento da concentração de compostos antioxidantes de defesa, embora, por outro lado, o estresse causado também leva a deterioração do vegetal, alterando suas características físicas e sensoriais (WANG, FREI, 2011).

Os mais diversos tipos de estresses podem afetar as plantas, como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar e ataque de patógenos. Como mecanismo de resposta as plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares, e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção. Para sobreviver, durante sua evolução, os vegetais desenvolveram mecanismos de resposta contra danos e doenças que, quando acionados, reconhecem a agressão (SHEWRY, LUCAS, 1997; WIT, 2007).

Outro fator gerador de estresse é a alteração na disponibilidade nutricional, o desequilíbrio gerado pelo excesso ou falta de nutrientes pode produzir radicais livres (GRATTAN, GRIEVE, 1999).

Dentre as substâncias relacionadas à defesa química, destacam-se aminoácidos não proteicos, alcaloides, fenois, saponinas, lectinas, RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) quitinases, glucanases, flavonoides, inibidores de proteases e alérgenos (BOWLES, 1990; XAVIER-FILHO, 1993).

De acordo com Taiz e Zeiger (2009) os metabólitos secundários são divididos em três grupos, compreendidos pelos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

Os compostos nitrogenados são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel (VIZZOTTO, KROLOW, WEBER, 2010), muitos deles são sintetizados a partir de aminoácidos comuns (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

A produção global de metabólitos nitrogenados por uma planta (alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos) geralmente é aumentada com a maior disponibilidade de nitrogênio no solo. Entretanto, como

consequência do aumento da biomassa da planta, a concentração destes nos tecidos pode diminuir (GERSHENZON, 1984; SPRING, BIENERT, 1987).

Os alcaloides estão entre os mais importantes compostos nitrogenados ativos do ponto de vista farmacológico ou medicinal. Aproximadamente 10.000 alcaloides já foram identificados, como por exemplo, a morfina, cocaína, cafeína, nicotina e atropina (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

Os terpenos são a maior classe de metabólitos secundários. Ocorrem em todas as plantas e é a maior classe de metabólitos secundários. As plantas podem sintetizar muitos terpenos diferentes, em distintas partes, para uma grande variedade de propósitos e em épocas diferentes ao longo de seu desenvolvimento (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

Milhares de compostos fenólicos já foram identificados em plantas superiores, e centenas desses compostos são encontrados em plantas comestíveis. Estes compostos são metabólitos secundários das plantas, geralmente envolvidos na defesa contra organismos patogênicos ou raios ultravioletas (ANGELO, JORGE, 2007). Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995).

Os compostos fenólicos são sintetizados por meio de diferentes rotas, constituindo-se num grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e do ácido malônico (AHARONI, GALILI, 2011; TAIZ, ZEIGER, 2009).

Estes compostos apresentam desde moléculas simples, até moléculas com alto grau de polimerização, podendo estar presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a proteínas e açúcares (ANGELO, JORGE, 2007).

Existe uma grande variedade de compostos fenólicos, todos eles têm como característica comum um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel

aromático. Eles estão quase universalmente presentes nas plantas e são conhecidos por acumularem-se em todas as partes do vegetal (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

Os fenóis incluem os compostos que possuem apenas um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxílicos. Os polifenóis compreendem aqueles compostos fenólicos que possuam múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura e podem ser divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que ligam estes (WATERHOUSE, 2002). Eles podem, ainda, associar-se entre si, aumentando a complexidade e diversidade desta classe de compostos. A composição dos polifenóis nas plantas pode variar com o tipo, época de colheita, fatores do meio ambiente, processamento e armazenamento (MANACH et al., 2004).

Os dois grupos principais de polifenóis são os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os ácidos fenólicos podem ser classificados em ácidos benzóicos, e derivados, e ácidos cinâmicos e derivados. Já os flavonoides possuem como subclasses principais os flavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavanois (SATO et al., 1996).

Os flavonoides estão entre os compostos fenólicos mais conhecidos, são importantes na pigmentação de flores, frutas e folhas, principalmente pela ação das antocianinas, e no crescimento e desenvolvimento das plantas, protegendo-as contra possíveis infecções e lesões (GHARRAS, 2009).

Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (HOPIA, HEINONEM, 1999; SATUÉ-GRACIA, HEINONEN, FRANKEL, 1997).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica;

modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (KYNGMI, EBELER, 2008; PODSEDEK, 2007).

2.3 Antioxidantes

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994).

As substâncias antioxidantes são capazes de retardar ou inibir a oxidação de um substrato. Agem bloqueando a formação dos radicais livres ou interagindo com estes, inativando-os. Portanto, os antioxidantes são definidos como qualquer substância capaz de doar elétrons para um radical livre, inativando-o, tornando-o um composto eletricamente estável (ARBOS, 2004).

Essas substâncias podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de ERO (Espécie Reativa de Oxigênio), conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT, PONGSAWATMANIT, 2007).

EROs são, sobretudo, subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem ser gerados com a destruição do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresse. O principal ponto de produção de ERO na célula durante o estresse são as organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxo de elétrons sustentado: cloroplastos e mitocôndrias. Nos cloroplastos, a formação de ERO está relacionada com eventos da

fotossíntese. A produção de ERO em mitocôndrias de plantas recebeu pouca atenção no passado, mas dados recentes sugerem que tais organelas podem ser fontes de ERO sobre condições de estresse específicas (BREUSEGEM et al., 2001).

Vários compostos isolados de plantas e vegetais de natureza química diversificada promovem ação antioxidante reconhecida, em potencial aqueles que possuem na sua estrutura um grupamento fenólico, representados por taninos, cumarinas, antraquinonas e flavonoides (ARBOS, 2004).

Devido a sua diversificada composição é provável que a ação antioxidante de extratos vegetais seja resultante da ação sinérgica de várias substâncias, pertencentes a diferentes grupos químicos (ARBOS, 2004).

A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos depende sua concentração e estrutura química. Além dos fatores genéticos, condições do ambiente, entre as quais, a nutrição mineral, pode influenciar o teor de fitoquímicos (KÄHKÖNEN et al., 1999; MELO et al., 2006).

Atualmente, os antioxidantes têm despertado grande interesse, devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo, portanto, eles são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (PIETTA, 2000).

A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo, frutos, folhas e sementes está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais (VELIOGLU, et al., 1998), tendo a espécie *Eugenia uniflora* comprovada ação antioxidante (BAGETTI, 2009; LIMA, MÉLO, LIMA, 2002; LUZIA, BERTANHA, JORGE, 2010; VELAZQUEZ et al. 2003; VERGARA et al., 2016).

2.4 *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)

A *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira, pertence à família Myrtaceae, sua ocorrência no Brasil vai desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008).

A família Myrtaceae compreende cerca de 130 gêneros e 4.000 espécies de plantas lenhosas, com distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália (SOUZA, LORENZI, 2005).

A pitangueira é um arbusto denso de 2 a 4 m de altura, raramente uma árvore de 6 a 9 m, ramificada, com copa arredondada de 3 a 6 m de diâmetro, com folhagem persistente ou semidecídua. Apresenta um sistema radicular profundo, com uma raiz pivotante e numerosas raízes secundárias e terciárias (FOUQUÉ, 1981; SANCHOTENE, 1985).

As folhas são opostas, simples, elípticas a ovaladas, glabras, levemente discoloradas, brilhantes na face superior, de 3 a 7 cm de comprimento. Suas flores são solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas do ápice dos ramos. O fruto possui drupa globosa e sulcada, brilhante, vermelha, amarela ou preta (LORENZI, 2008).

As flores apresentam pedicelo filiforme medindo de 1 a 3 cm de comprimento, o cálice é composto por 4 sépalas oblongo-elípticas de 2,5 a 4,0 mm de comprimento, a corola é formada por 4 pétalas, livres, de coloração branco-creme, medindo de 6 a 8 mm de comprimento. Elas possuem dezenas de estames, sendo as anteras de coloração amarelada, abundantes em pólen, e os estiletos brancos. O ovário é bilocular, glabro, com 8 saliências. O estilete é filiforme e mede 6,0 mm de comprimento com estigma capitado (SANCHOTENE, 1985).

Segundo Silva (2006) a fruta da pitangueira é rica em cálcio, fósforo, antocianinas, flavonoides, carotenoides e vitaminas C, indicando seu elevado poder antioxidante, sendo caracterizada por possuir em média 77% de polpa e 23% de semente.

Figura 1 - *Eugenia uniflora* L. (pitangueira). A) Folhas B) Flores C) Frutos D) Planta



Fonte: Dados da autora

Divensi e Araújo (2012) demonstraram que as folhas de pitangueira possuem altos teores de fenólicos totais e de acordo com Souza (2013) as folhas possuem maior quantidade de compostos fenólicos que os frutos e também melhor atividade antioxidante.

Na medicina popular, a pitangueira é utilizada para combater várias doenças. As folhas e frutos são considerados excitantes, febrífugos, aromáticos, antirreumáticos e antidisentérico. A infusão de suas folhas tem sido empregada como antirreumática e anti-hipertensiva, e seu extrato alcoólico é utilizado em bronquites, tosses, febres, ansiedade, hipertensão arterial e verminoses (LORENZI, MATOS, 2002).

Vários compostos químicos já foram identificados na *E. uniflora*, como óleos essenciais sesquiterpenos, germacreno e selina trienona (ALICE et al., 1991; MAIA et al., 1999; MORAIS et al., 1996); eugeniflorinas D1 e D2, pentahidroxiindolizidina (AURICCHIO, BACCHI, 2003; LEE et al., 1997) β -

caroteno, vitamina C e vitamina E, licopeno, rubixantina, cisrubixantina, α -criptoxantina, cis-licopeno, α -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina e α -caroteno-5,6-epóxido (AZEVEDO-MELEIRO, RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; WANG, CAO, PRIOR, 1996), antocianinas (LIMA, MÉLO, LIMA, 2002; SATUÉ-GRACIA, HEINONEN, FRANKEL, 1997; WANG, CAO, PRIOR, 1997), miricitrina, quercetina e quercitrina 3-l-ramnosídeos (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

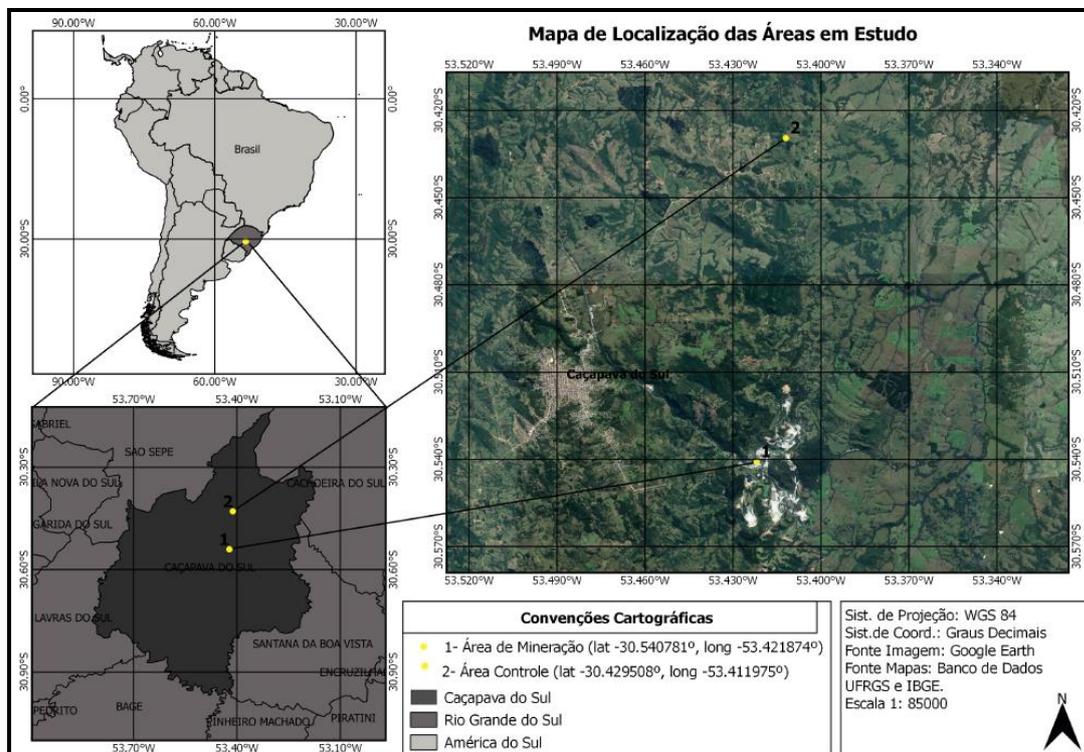
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As áreas em estudo estão localizadas no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul (Figura 2), fazem parte do Bioma Pampa, região zoogeográfica da província Pampeana da Serra do Sudeste. Esta região é caracterizada por uma fisionomia de transição, por apresentar um domínio fisionômico composto por um mosaico de formações herbáceo-arbustivas e florestais (CORDEIRO, HASENACK, 2009).

De acordo com Marchiori (2002) dentre as regiões fitoecológicas que compõem o Rio Grande do Sul, a área estudada está dentro da formação gramíneo lenhosa com matas de galeria.

Figura 2 - Mapa Indicativo das áreas em estudo



Fonte: Google Earth (2017)

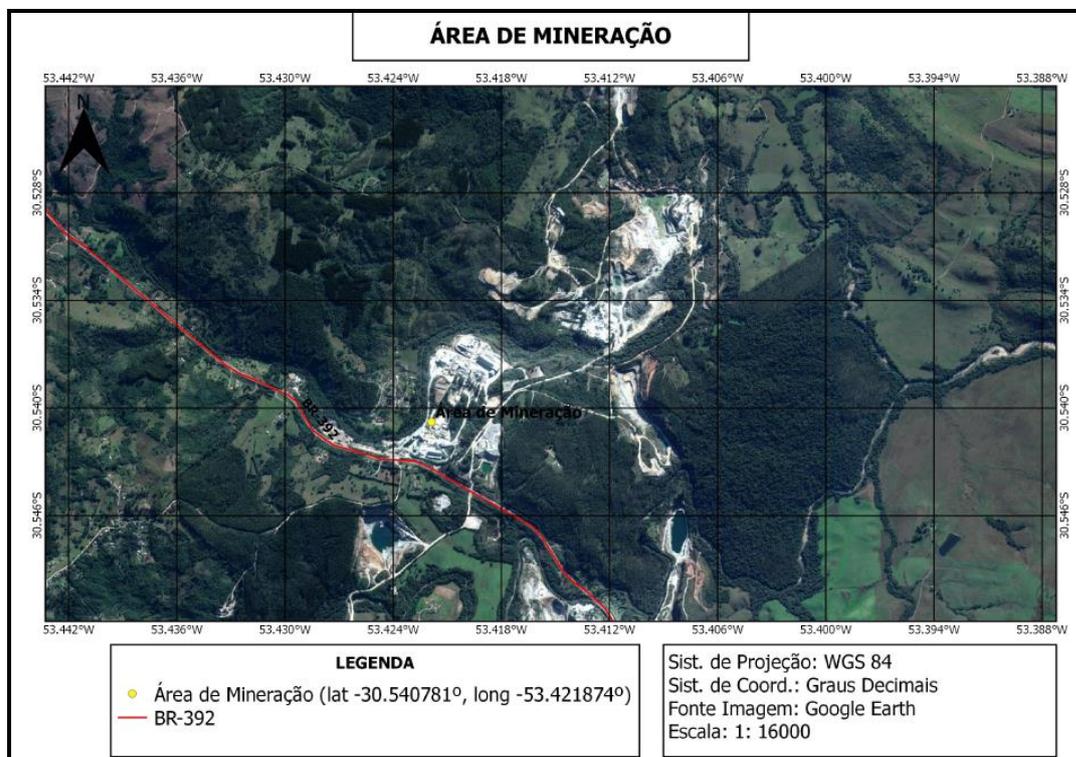
O clima no Município de Caçapava do Sul é classificado como temperado úmido, com precipitação pluvial média de 1588 mm. A temperatura

média do mês mais frio é de 11°C (MALUF, 2000), podendo ocorrer a formação de 15 a 20 geadas durante o inverno, e no verão a temperatura pode chegar até 38°C (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002).

3.1.1 Caracterização Geológica

A área de estudo onde está localizada a mineradora (53°42'18.74"O e 30°54'07.81"S) dista aproximadamente 9 km do centro de Caçapava do Sul (Figura 3), está assentada em metassedimentos do Complexo Metamórfico Vacacaí representados por mármore dolomíticos impuros, como os descritos por Bortolotto (1987), bem como intercalações de silicatos que formam bandas entre partes de composição carbonática uniforme. A coloração predominante do mármore é branca, sendo composto essencialmente por dolomita. Contudo, algumas frações subordinadas apresentam calcita.

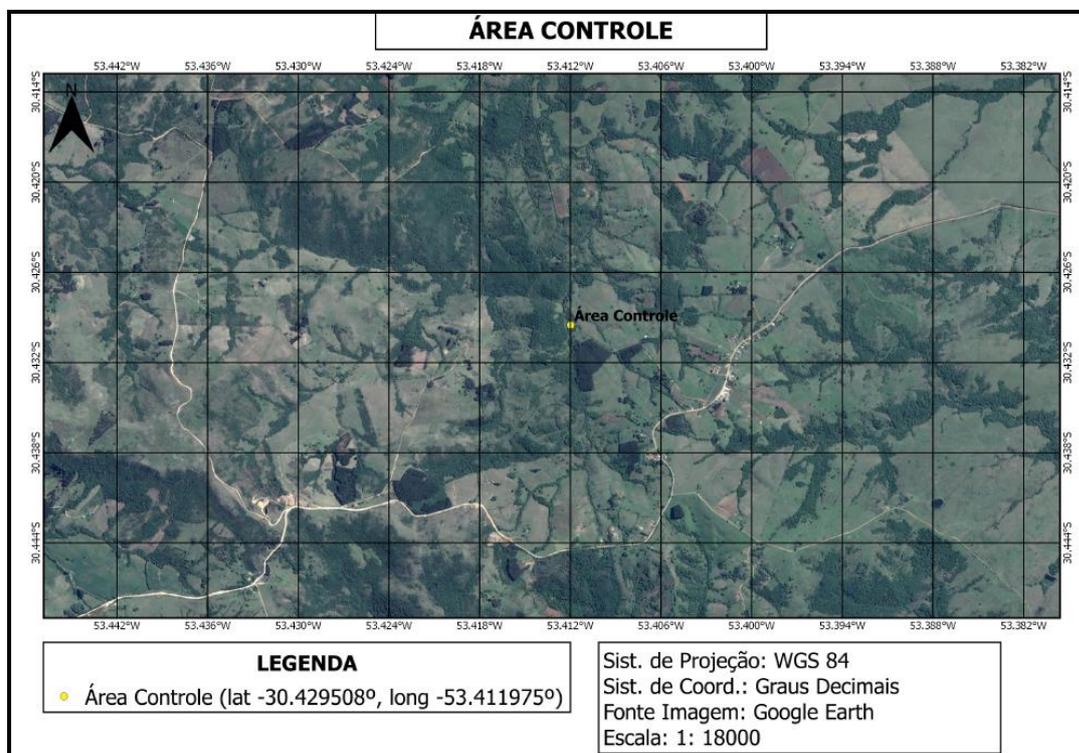
Figura 3 - Mapa indicativo da área de mineração



Fonte: Google Earth (2017).

A região de vegetação da área controle (53°41'19.75"O e 30°42'95.08"S), fica distante da área de mineração cerca de 24 Km, é uma área de mata nativa composta por vegetação arbórea e herbáceo-arbustivas.

Figura 4 - Mapa indicativo da área controle



Fonte: Google Earth (2017).

3.2 Material vegetal e obtenção dos extratos

As folhas de *Eugenia uniflora* L. foram coletadas no município de Caçapava do Sul, em janeiro de 2016, em duas áreas distintas, uma área de mineração de calcário e uma área sem influência das atividades de mineração (controle).

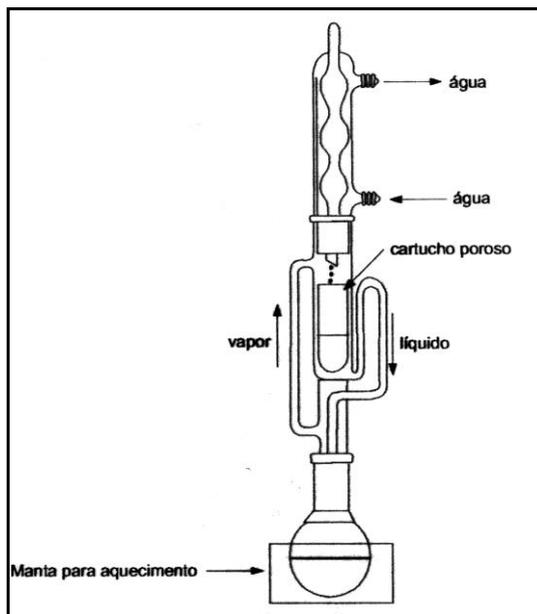
Após a coleta, foram lavadas com água destilada e secas em estufa em temperatura constante de aproximadamente 40°C. Após secas, foram maceradas manualmente com auxílio de gral e pistilo.

Os extratos etanólicos foram preparados a partir de 4g de extrato seco das folhas maceradas e 150mL de etanol utilizando um extrator Soxhlet, em um

tempo de extração de 8 horas, neste método o tempo de extração pode variar de 1 até 72h. (MIGUEL, ANDRADE, 1989)

Este extrator é um aparelho que foi originalmente desenvolvido por Franz von Soxhlet (1879) para a extração de lipídeos, fisicamente caracterizados por serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como o álcool, entre outros.

Figura 5 - Extrator Soxhlet



Fonte: Alves, Jane (2010).

Este equipamento utiliza refluxo de solvente em um processo intermitente. O solvente é aquecido num balão de fundo redondo, originando vapor. O vapor proveniente do solvente aquecido passa para o condensador onde é refrigerado passando ao estado líquido e enchendo o extrator até ao nível do tubo lateral. Ao longo do tempo, o solvente vai arrastando compostos solúveis presentes na amostra e após vários ciclos obtém-se o extrato final.

3.3 Análises de águas e solos

A água contém, geralmente, diversos componentes, os quais provêm do próprio ambiente natural ou foram introduzidos a partir de atividades humanas.

Esses parâmetros são indicadores da qualidade da água e constituem impurezas quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinado uso (MOTA, 2006).

Os parâmetros de qualidade da água analisados foram: pH, condutividade, alcalinidade, cálcio, magnésio e dureza total nas águas superficiais coletadas em bacia de decantação de fábrica de cal na área de mineração e no arroio localizado na área controle, locais estes próximos do material vegetal coletado.

As medidas de pH e condutividade foram efetuadas logo após a coleta, em aparelhos de bancada no laboratório de química do campus.

A alcalinidade (equação 1) foi investigada por volumetria de neutralização, utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄) e indicador misto e a dureza total, cálcio e magnésio através de volumetria de complexação utilizando EDTA como agente complexante (VOGEL, 2002). Para estas análises foram realizadas no mínimo três titulações com alíquotas diferentes de uma mesma amostra para reprodutibilidade.

A alcalinidade total foi determinada utilizando-se a equação 1:

$$mg/L CaCO_3 = V_{\text{ácido}} \times 20 \quad \dots(1)$$

*Onde V_{ácido} é o volume de H₂SO₄ gasto na titulação

Para os cálculos de dureza, cálcio e magnésio, foram utilizadas, respectivamente, as seguintes equações:

$$mg/L CaCO_3 = \frac{V_1 \times 0,01 \times 100000}{V_{\text{amostra}}} \quad \dots(2)$$

$$mg/L Ca = \frac{V_2 \times 0,01 \times 40,08}{V_{\text{amostra}}} \quad \dots(3)$$

$$mg/L Mg = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,01 \times 24,3}{V_{\text{amostra}}} \quad \dots(4)$$

*Onde V₁ e V₂ são os volumes de EDTA gastos nas titulações

Nas áreas onde estavam inseridas as plantas, foram realizadas coletas de solos para a avaliação do pH e da sua constituição de elementos químicos, dados estes que podem auxiliar na avaliação do estado nutricional das plantas e as suas implicações na composição dos produtos metabólicos.

As amostras de solo foram coletadas onde se encontram as plantas em estudo, nas profundidades de 0-10 e a 30-40 cm. Após a coleta foram secas em estufa a 40°C, trituradas e peneiradas a seco (malha de 2mm) (SANTOS, 2008).

Para a análise do pH, cada amostra de solo foi misturada com água destilada, agitada e deixada em repouso por 30 minutos para medida do pH em aparelho de bancada (TEDESCO et al., 1995).

Para a detecção dos elementos presentes nos solos foi utilizado o Espectrômetro Portátil de Fluorescência de raio-X por Dispersão de energia (ED-XRF), da marca Bruker, modelo S1 turbo SD.

Esta técnica é baseada na medição das intensidades de raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra a partir de excitação por meio de um feixe de raios-X. O termo “energia dispersiva” refere-se à técnica de detecção dos raios-X emitidos, que é efetuada por um detector de Si que gera um espectro de intensidade em função da energia. A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada com a concentração de cada elemento presente na amostra (ALEXANDRE, BUENO, 2006). A técnica EDXRF, não atinge limites de detecção comparáveis aos alcançados pelas técnicas de espectrometria de absorção ou emissão atômica, mas possui grandes vantagens como o baixo custo de análise e geralmente requer baixo consumo de reagentes e vidraria, gerando pouco ou nenhum resíduo (PATACA, BORTOLETO, BUENO, 2005).

3.4 Determinação da atividade antioxidante

Neste trabalho a atividade antioxidante foi determinada por dois métodos, o de avaliação da atividade antioxidante total através da complexação do fosfomolibdênio (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999) e o de redução do radical livre DPPH° (BRAND-WILLIANS, CUVÉLIER, BERSET, 1995).

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de complexação do fosfomolibdênio

Este método, baseia-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V), esta redução ocorre em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, resultando na formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

O complexo fosfomolibdênico, é formado pela reação da solução de fosfato de sódio (0,1 mol/L) com solução de molibdato de amônio (0,03 mol/L) e de uma solução de ácido sulfúrico (3 mol/L), em meio aquoso (BALESTRIN et. al., 2008).

Nesta metodologia, o complexo fosfomolibdênio (3 mL) e água deionizada (6,9mL) foram adicionados a alíquotas dos extratos diluídas em etanol (0,1mL), resultando na concentração final do ensaio de 13,3; 26,6; 66; 133 e 200 mg/L. O branco foi obtido utilizando-se 0,1mL de álcool etílico, 3 mL do reativo e 6,9 mL de água deionizada.

Todo os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 minutos, após o resfriamento foi feita a leitura a 695 nm, em espectrofotômetro na marca Bel photonics, modelo SP 2000. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Uma curva padrão foi elaborada a partir das leituras das absorvâncias de ácido ascórbico nas concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 µM, utilizada como referência para analisar a atividade antioxidante dos extratos.

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa. A equação 5 ilustra a fórmula utilizada para o cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante (BALESTRIN et al., 2008).

$$AAR\% = \frac{Abs(amostra) - Abs(branco)}{Abs(\text{ácido ascórbico}) - Abs(branco)} \times 100 \quad \dots(5)$$

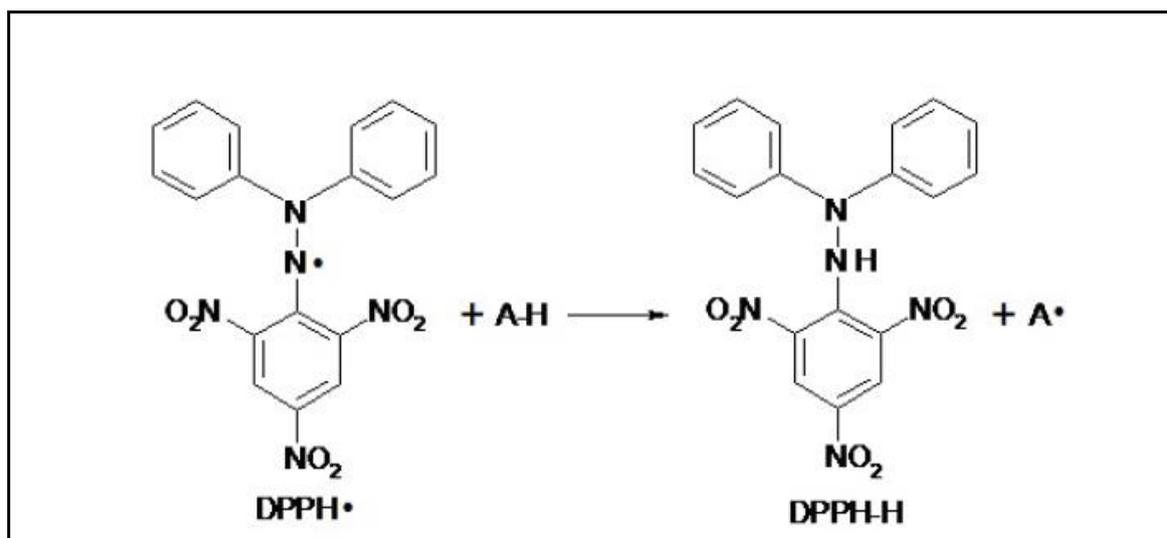
*Onde: AAR: Atividade Antioxidante Relativa; Abs: absorvância

3.4.2 Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH

Este método foi descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), é um dos mais utilizados entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN, SOLER-RIVAS, WICHERS, 2000).

Nesse método (Figura 6), o antioxidante reage com o radical DPPH°, doando a ele um átomo de hidrogênio e convertendo-o em sua forma reduzida (DPPH-H).

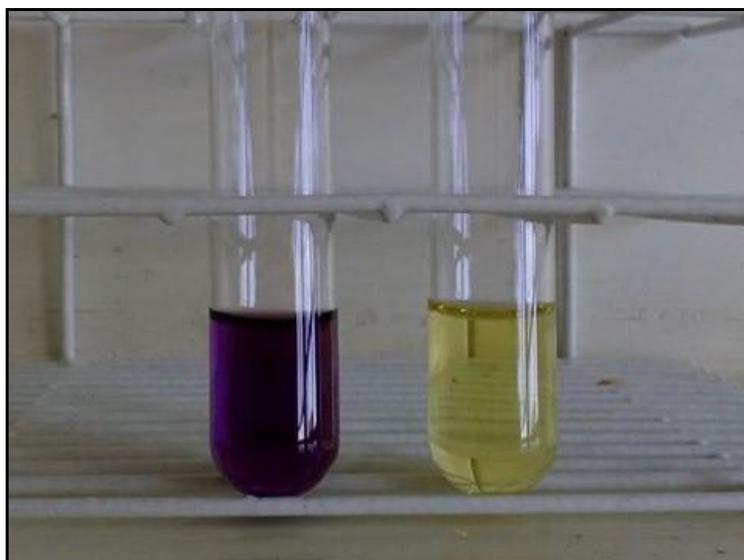
Figura 6 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e o antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Oliveira (2015).

Nesta reação, a solução de DPPH, inicialmente de coloração violeta intensa, torna-se amarelada e o grau deste descolorimento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (BRAND-WILLIANS, CUVELIER, BERSET, 1995; HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Figura 7 - Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) antes e após redução (difênil-picril-hidrazina)



Fonte: Dados da autora

Segundo Deng, Cheng e Yang (2011) a absorção do DPPH ocorre na faixa de 515 a 520nm. Neste trabalho as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 515 nm, em espectrofotômetro Bel photonics, modelo SP 2000.

Uma curva de calibração foi construída a partir da solução etanólica de DPPH em diferentes concentrações (200, 150, 100, 50 e 10 μM), tendo como branco o etanol.

Para a avaliação da atividade captadora do radical livre DPPH $^{\circ}$, foram empregadas alíquotas de 10, 50 e 100 μL de extrato, que correspondem à concentração final no ensaio de 133, 666 e 1333 mg/L, respectivamente. Em cada amostra acrescentou-se 50 μL de DPPH a 10mM dissolvido em etanol e completou-se o volume com álcool etílico até atingir 2mL. Após 40 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 515 nm, contra um branco equivalente para cada avaliação, formado somente pelos extratos nas suas respectivas diluições em etanol.

Um controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (ácido gálico) e DPPH.

As leituras das absorbâncias das amostras foram correlacionadas com o controle negativo.

A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação (MOLYNEUX, 2004):

$$\%SRL = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100 \quad \dots(6)$$

*Onde: SRL: Sequestro de Radicais Livres; Ac: Absorbância controle; Aam: absorbância da amostra.

A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em equivalentes de ácido gálico, tendo como base as absorbâncias medidas na curva padrão em seis concentrações diferentes (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M) e calculados de acordo com a equação da reta obtida. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Para a comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, usando o software Prisma 7.03 (GraphPad). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As águas naturais possuem pH na faixa de 4 a 9, e a maioria é ligeiramente básica, devido a presença de bicarbonatos e carbonatos dos metais alcalinos e alcalinos terrosos (CLESCERI, GREENBERG, EATON, 2005). A água da área controle apresentou caráter levemente ácido e a da área da mineração caráter básico (Tabela 1). Cumpre lembrar que na área de mineração a água foi coletada em bacia de decantação da fábrica de cal, contendo, portanto, carbonatos de cálcio e magnésio dissolvidos, o que confere o caráter básico.

Tabela 1 - Análises das amostras de águas das áreas em estudo

| | Área Controle | Área de Mineração |
|-------------------------------|---------------|-------------------|
| pH | 6,70 | 8,70 |
| Alcalinidade mg/L | 40 | 40 |
| Dureza mg/L CaCO ₃ | 85 | 409 |
| Cálcio mg/L | 16,03 | 115,43 |
| Magnésio mg/L | 10,94 | 29,42 |
| Condutividade µs/cm | 160 | 742 |

Fonte: Dados da autora

As águas naturais mesmo consideradas “puras” contêm quantidades significativas de dióxido de carbono e de íons que são por ele produzidos, bem como cátions de cálcio e magnésio, além disso, o pH dessas águas raramente é igual a 7,0 (BAIRD, CANN, 2011).

Na área controle o pH da água esteve bem próximo desse valor (6,70), apresentando um pH levemente ácido e de acordo com sua dureza pode ser classificada como moderada, diferentemente da água da área de mineração classificada aqui como dura, conforme escala internacional de dureza. Na área de mineração o valor esteve acima, por se tratar de uma bacia de decantação de efluentes líquidos oriundos de fábrica de cal, estando em conformidade com a legislação, que permite o lançamento de efluentes líquidos com pH entre 6 e 9 (CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2006).

A dureza é considerada como a concentração de cátions multimetálicos em solução. Os cátions mais frequentemente associados à dureza são o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg). Em condições de supersaturação esses cátions reagem com ânions da água formando precipitados (VON SPERLING, 2005). A dureza total da água pode possuir até 300 mg/L em CaCO₃ (CLESCERI, GREENBERG, EATON, 2005).

A condutividade elétrica de uma solução depende da quantidade de sais dissolvidos, sendo aproximadamente proporcional à sua quantidade (HELLER, PÁDUA, 2006). As análises das águas indicaram uma alta condutividade da água na área de mineração que podem ser relacionados aos processos de dissolução e arraste de carbonatos, confirmados pelos altos valores de dureza e de cálcio (SCHMIDT, 2015).

Não foi estabelecida uma correlação significativa nos resultados das análises de águas com o metabolismo vegetal. Na área controle, todos os parâmetros analisados estão em conformidade com a literatura e apesar do alto valor de cálcio e magnésio observado na água da mineradora, estes elementos não se apresentaram elevados no solo, sendo até mais expressivos na área controle.

Os resultados obtidos na investigação de elementos presentes nos solos são fundamentais para a avaliação da nutrição vegetal. A seguir (Tabela 2), são apresentados os resultados da análise da composição dos solos pela difração de raio-X.

Tabela 3 - Elementos e compostos químicos identificados nas amostras de solos das áreas em estudo

| Elemento | Área de Mineração Concentração (%) | Área Controle Concentração (%) |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Cádmio (Cd) | 0,17±0,02 | 0,12±0,03 |
| Cloro (Cl) | 0,02±0,02 | 0,04±0,03 |
| Chumbo (Pb) | 0,01±0,01 | ND |
| Cobalto (Co) | 0,017±0,02 | 0,3±0,26 |
| Cobre (Cu) | ND | 0,1±0,00 |
| Dióxido de Silício (SiO ₂) | 35,83±1,40 | 29,13±0,83 |

| | | |
|---|-----------|-------------|
| Dióxido de Titânio (TiO ₂) | 0,57±0,15 | 1,11±0,23 |
| Estrôncio (Sr) | 0,18±0,27 | 0,003±0,005 |
| Molibdênio (Mo) | ND | 0,01±0,00 |
| Níquel (Ni) | ND | 0,07±0,05 |
| Óxido de Alumínio (Al ₂ O ₃) | 6,42±0,16 | 6,66±0,26 |
| Óxido de Cálcio (CaO) | 2,37±0,31 | 4,36±0,5 |
| Óxido de Ferro (Fe ₂ O ₃) | 1,85±0,4 | 10,41±1,81 |
| Óxido de Magnésio (MgO) | 2,5±0,97 | 3,88±0,71 |
| Óxido de Manganês (MnO) | 0,06±0,02 | 0,26±0,07 |
| Óxido de Potássio (K ₂ O) | 2,64±0,46 | 0,55±0,15 |
| Ródio (Rh) | 0,17±0,18 | 0,17±0,14 |
| Rubídio (Rb) | 0,02±0,02 | 0,03±0,05 |
| Vanádio (V) | ND | 0,007±0,011 |
| Zinco (Zn) | ND | 0,007±0,005 |
| Zircônio (Zr) | 0,07±0,06 | 0,026±0,04 |
| Material não identificado | 47,10 | 42,76 |
| TOTAL | 100 | 100 |

Fonte: Dados da autora

*Valores expressos como média ± desvio-padrão; ND: não detectado

Até o momento são reconhecidos 15 elementos minerais essenciais, que de acordo com a sua concentração, são classificados em macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (ferro, cloro, cobre, zinco, manganês, boro, molibdênio, cobalto e níquel) (CASTRO, KLUGE, PERES, 2005).

O cloro esteve presente em ambas as áreas, mas como pode ser observado (Tabela 2), alguns dos elementos que são essenciais para as plantas não foram detectados na área de mineração, são eles: cobre, molibdênio, níquel e zinco. Esses micronutrientes são utilizados pelas plantas

em pequenas quantidades, mas sua ausência, no entanto, pode acarretar problemas no metabolismo vegetal.

O cobre está envolvido em processos de oxidação e redução, entre as várias substâncias que possuem cobre estão as enzimas fenolase e lacase, que catalisam a oxigenação dos fenóis. A deficiência de cobre provoca redução na lignificação ao mesmo tempo em que se acumulam fenóis (CASTRO, KLUGE, PERES, 2005).

As necessidades quantitativas de molibdênio pelos vegetais estão entre as menores dentre todos os elementos essenciais conhecidos, mas a deficiência deste elemento promove mudanças metabólicas e no desenvolvimento vegetal. Sua essencialidade é justificada por ser componente de várias enzimas, (CASTRO, KLUGE, PERES, 2005), incluindo a nitrato redutase e a nitrogenase, envolvidas na redução do nitrato e fixação do nitrogênio, respectivamente (TAIZ, ZEIGER, 2009).

O Níquel entra na composição da enzima urease, plantas deficientes em níquel acumulam ureia em suas folhas, resultando em necrose nos ápices foliares.

A deficiência de zinco pode provocar numerosas alterações metabólicas, particularmente na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos, o zinco é um constituinte estrutural e também atua como ativador ou regulador de várias enzimas (CASTRO, KLUGE, PERES, 2005).

As plantas absorvem do solo, sem muita discriminação, todos os elementos químicos que se apresentam na forma disponível. Portanto, além dos elementos essenciais, as plantas absorvem outros elementos não essenciais que apresentam efeitos benéficos no seu desenvolvimento (FAQUIN, 2005).

Os papéis específicos dos elementos essenciais não estão completamente elucidados, assim como, outros elementos não configurados como essenciais desempenham papéis relevantes para um adequado desenvolvimento do vegetal. Pesquisas com o dióxido de titânio demonstraram que há influência positiva deste composto no crescimento e desenvolvimento vegetal, (YANG et al., 2006), sendo que na área controle houve uma maior concentração deste composto que na área de mineração.

O solo da área controle revelou teor mais alto de óxido de ferro III, o que está em conformidade com o caráter ácido. O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, envolvido em vários processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA e hormônios (SAHRAWAT, 2004). Mesmo quando o solo apresenta elevada concentração de Fe, normalmente isto não traz danos às plantas, pois a maior parte desse nutriente encontra-se numa forma pouco disponível (GUERINOT, YI, 1994).

O cádmio foi observado nas duas áreas, este metal é considerado tóxico quando em altas concentrações, mas pode estar presente naturalmente nos solos em quantidades moderadas devido aos processos pedogenéticos ao longo do tempo (ALLOWAY, 1995). O chumbo foi detectado somente no solo da região mineradora, apesar de ser um metal tóxico, esteve presente em baixa concentração.

Os solos ácidos normalmente apresentam concentrações baixas de potássio, pois as perdas de bases são características do processo de acidificação dos solos (LUCHESE, FAVERO, LENZI, 2002). Da mesma forma, o cálcio geralmente encontra-se em baixa concentração nos solos ácidos, que são típicos do território brasileiro (MARSCHNER, 2012).

Apesar do solo da área controle ser ácido, este apresentou maiores teores de óxidos de cálcio do que na área de mineração, no entanto em concentrações menores do que o óxido de ferro. O óxido de magnésio também esteve presente em maior concentração na área controle.

As diferenças na concentração dos elementos detectados nas duas áreas estudadas podem auxiliar no esclarecimento do diferencial encontrado na capacidade antioxidante da espécie, já que o suprimento inadequado de um elemento essencial pode provocar um distúrbio metabólico.

Assim como os elementos minerais presentes no solo são importantes para o desenvolvimento e crescimento vegetal, o pH também deve ser considerado, pois interfere em vários mecanismos que ocorrem no solo.

Sendo assim, os solos também foram analisados para verificar o nível do pH. Foram medidos os valores das amostras superficialmente e a 30-40 cm de profundidade (Tabela 3).

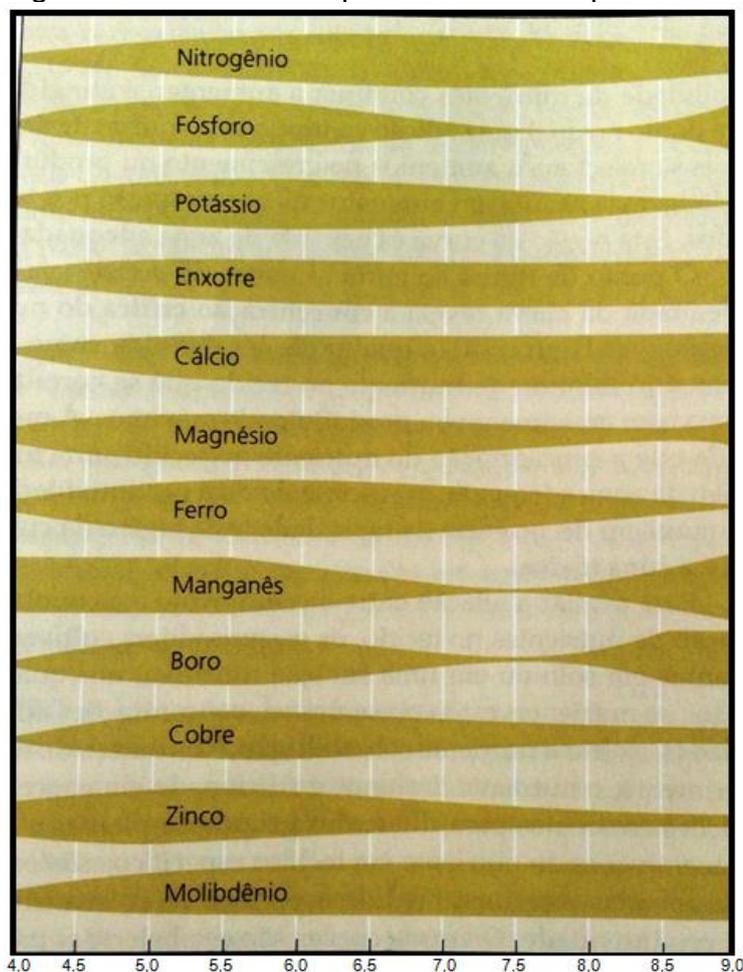
Tabela 4 - Valores de pH obtidos nas amostras de solos

| Profundidade (cm) | Área controle (pH) | Área de Mineração (pH) |
|-------------------|--------------------|------------------------|
| 0-10 | 5,62 | 9,40 |
| 30-40 | 5,13 | 8,30 |

Fonte: Dados da autora

Os níveis de pH controlam vários processos químicos que acontecem no solo, de acordo com Taiz e Zeiger (2009) a faixa ideal de pH para a maioria das plantas é entre 5,5 e 6,5 (Figura 8), pois facilita a absorção da maior parte dos nutrientes.

Figura 8 - Influência do pH do solo na disponibilidade de nutrientes



Fonte: Taiz, Zeiger (2009)

*A espessura das áreas sombreadas indica o grau de disponibilidade.

Na área de mineração, o pH de 9,40 na superfície, confirma a alcalinidade do solo no local devida ao processo de mineração de calcário. Mesmo em maior profundidade o solo apresenta-se básico, característica dos solos da região de mineração. Entretanto, o pH do solo na área controle

apresentou valores abaixo de 6 indicando acidez média de acordo com Tomé Júnior (1997).

A disponibilidade de nutrientes é influenciada pelo pH (TAIZ, ZEIGER, 2009). A faixa de pH de 5 a 5,5 (área controle) apresenta uma maior disponibilidade para a maioria dos nutrientes quando em comparação com a faixa de pH em torno 8 (área de mineração), afetando a disponibilidade de nutrientes como fósforo, potássio, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco.

O desequilíbrio entre nutrientes ocorre por diversos fatores, como a disponibilidade de nutrientes no solo e a absorção destes pelas plantas. Os principais fatores que afetam a disponibilidade e absorção de nutrientes são, principalmente, o tipo de solo, o pH, a concentração e o equilíbrio entre a fração trocável e em solução do solo, além de interações iônicas (MALAVOLTA, 1980).

Os nutrientes afetam não somente o metabolismo primário, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários (GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Em solos pobres em nutrientes, paralelamente à menor taxa de crescimento, se verifica maior produção de metabólitos secundários (COLEY, BRYANT, CHAPIN III, 1985; GERSHENZON, 1984).

As reações metabólicas na qual participam cada elemento essencial são muito variadas, mas toda deficiência mineral perturba o metabolismo e o funcionamento vegetal, o que pode estimular uma maior produção de compostos antioxidantes.

Tendo em vista comparar a capacidade antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora* das diferentes amostras, foi realizada avaliação destes através do método fosfomolibdênio. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico (vitamina C), considerando a absorbância da vitamina C (200µM) como 100% de atividade antioxidante.

A seguir, na Tabela 4, são apresentadas as porcentagens de atividade antioxidante para cada concentração de extrato em relação ao ácido ascórbico.

Tabela 5 - Atividade Antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora* através do método fosfomolibdênio

| Concentração (mg/L) | Área Controle AAR (%) | Área de Mineração AAR (%) |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| 13,3 | 25±2,63 | 28±3,85 |
| 26,6 | 29±2,12 | 32±2,17 |
| 66 | 39±1,71 | 46±6,72 |
| 133 | 68±2,05 | 72±3,70 |
| 200 | 93±3,56 | 97±5,18 |

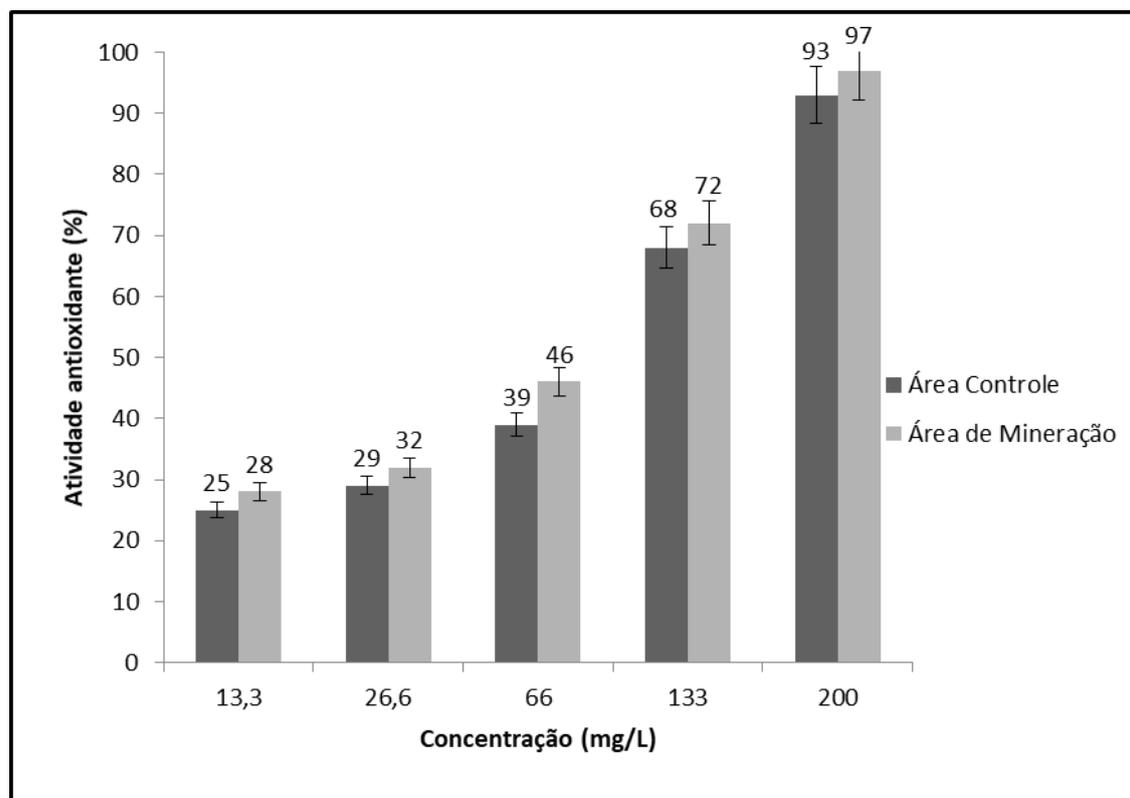
Fonte: Dados da autora

*Valores expressos como média ± desvio-padrão

Onde: AAR: Atividade Antioxidante Relativa

A Figura 9, a seguir, ilustra o gráfico com os resultados expressos em porcentagem de atividade antioxidante.

Figura 9 - Atividade antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora* através do método fosfomolibdênio.



Fonte: Dados da autora

A concentração de compostos antioxidantes dos extratos em equivalentes de ácido ascórbico (Tabela 5) foram determinados através do cálculo de fator de calibração, tendo como base a curva padrão.

Tabela 6 - Atividade antioxidante em equivalentes de Ácido Ascórbico

| Extrato (mg/L) | Área Controle (μM) | Área de Mineração (μM) |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 13,3 | 48 | 52 |
| 26,6 | 55 | 60 |
| 66 | 73 | 87 |
| 133 | 128 | 137 |
| 200 | 175 | 183 |

Fonte: Dados da autora

A área de mineração apresentou sempre maior atividade antioxidante, em todas as concentrações (SCHMIDT et al. 2017), mas não difere estatisticamente do apresentado para a área controle de acordo com a análise de variância ($p=0,81$).

Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* em capturar radicais livres foi feita análise das soluções destes com DPPH.

Os resultados (Tabela 6) foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante.

Tabela 7 - Atividade antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora* através do método DPPH

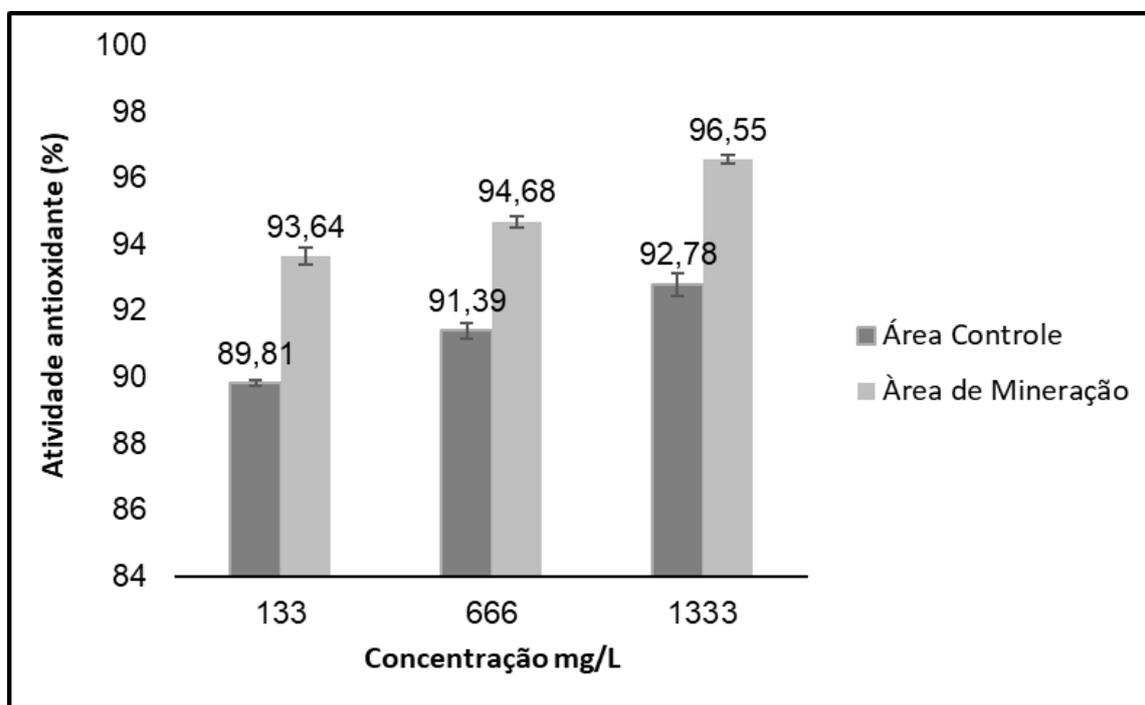
| Concentração (mg/L) | Área Controle AA (%) | Área de Mineração AA (%) |
|---------------------|----------------------|--------------------------|
| 133 | 89,81 \pm 0,080 | 93,64 \pm 0,246 |
| 666 | 91,39 \pm 0,249 | 94,68 \pm 0,178 |
| 1333 | 92,78 \pm 0,347 | 96,55 \pm 0,139 |

Fonte: Dados da autora

*Valores expressos como média \pm desvio-padrão

Onde: AA: Atividade Antioxidante

Figura 10 – Atividade antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora* através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)



Fonte: Dados da autora

Um teste de inibição de radicais livres pelo método DPPH foi realizado com ácido gálico, para efeito de comparação com os extratos das folhas de *Eugenia uniflora*. Apesar do resultado ser expresso em equivalentes de ácido gálico, a metodologia não apresenta seletividade para os tipos de compostos antioxidantes vegetais. Quanto maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalentes por grama de extrato, maior a atividade antioxidante apresentada.

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos de *E. uniflora* em equivalentes de Ácido Gálico

| Extrato (mg/L) | Área Controle (μ M) | Área de Mineração (μ M) |
|----------------|--------------------------|------------------------------|
| 133 | 61,55 | 65,05 |
| 666 | 63,00 | 66,00 |
| 1333 | 64,28 | 67,72 |

Fonte: Dados da autora

Através dos resultados obtidos é possível observar que a atividade antioxidante das folhas de pitangueiras coletadas na área de mineração é maior que da planta utilizada como controle.

A área de mineração apresentou sempre maior atividade antioxidante, em todas as concentrações e de acordo com a análise de variância (ANOVA) os resultados são estatisticamente significativos ($p=0,04$). A análise post-hoc (Tukey) confirmou que os valores obtidos para as amostras da área de mineração foram significativamente diferentes dos obtidos para a área controle em todas as concentrações.

Sendo assim, a concentração de compostos antioxidantes na planta localizada na área de mineração encontra-se mais elevada, e de acordo com Wang e Frei (2011), isto ocorre quando a planta está sob estresse.

As plantas têm seu metabolismo alterado sob condições de estresse, produzindo compostos que permitam a sua sobrevivência durante a condição adversa (HÄLLGREN, ÖQUIST, 1990). Estudos com diferentes espécies aromáticas verificaram que alguns compostos fenólicos responderam positivamente a diferentes condições de estresse (BEERHUES, BERGER, 1995; BRISKIN, GAWIENOWSKI, 2001; BRISKIN, LEROY, GAWIENOWSKI, 2000; WALKER, BAIS, VIVANCO, 2002).

A produção dos metabólitos secundários é suscetível a interferência do meio no qual a planta se encontra, esses estímulos decorrentes do ambiente, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese destes compostos em maior quantidade, em consequência ocorre um menor crescimento e desenvolvimento da planta.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, a planta localizada em área de mineração mostrou maior capacidade antioxidante do que a planta da área controle, nos dois métodos utilizados, sendo que o método de captura de radicais livres (DPPH) apresentou diferencial mais significativo, dados estes confirmados estatisticamente.

Alguns fatores ambientais podem gerar estresse nas espécies vegetais, produzindo radicais livres, em resposta, as plantas aumentam sua produção de compostos antioxidantes. Assim sendo, a maior capacidade antioxidante observada na planta localizada em área de mineração pode ser explicada pela ausência ou déficit de alguns elementos minerais essenciais e pelo pH elevado, que afeta a disponibilidade de alguns nutrientes.

Estes resultados demonstraram que na planta localizada em área de mineração houve uma maior produção de compostos antioxidantes, o que ocorre devido ao estresse causado por fatores ambientais.

Para que haja um maior esclarecimento sobre a atividade antioxidante de *Eugenia uniflora* sob influência de mineração, mais estudos são necessários para avaliar a composição da planta, qualitativamente e quantitativamente quanto aos seus compostos fenólicos, assim como, elucidar os demais fatores que podem vir a causar desequilíbrios nos vegetais.

6 RECOMENDAÇÕES

Outras opções de estudos foram consideradas, mas em virtude de fatores restritivos, como indisponibilidade de reagentes e equipamentos para análises, não foram colocadas em prática.

Este último tópico da presente dissertação sugere algumas possibilidades de continuidade de estudos nesta linha de pesquisa, as recomendações para futuros trabalhos são as seguintes:

-Estudos que visem monitorar as possíveis variações na capacidade antioxidante de *Eugenia uniflora*, para que seja possível aprofundar mais o conhecimento a respeito dos fatores que interferem na síntese e composição dos metabólitos secundários, correlacionando se há uma maior variação durante as diferentes etapas de extração e beneficiamento de calcário, já que a poluição resultante das atividades de mineração de calcário é um fator variável;

-Análise dos elementos presentes no solo por espectroscopia de absorção atômica e/ou molecular para uma maior precisão nos resultados com o objetivo de relacionar a atividade antioxidante com a presença dos nutrientes nos solos avaliados;

-Análise do tecido foliar para a avaliação nutricional das plantas, e verificar a correlação dos nutrientes presentes nos solos;

-Estudos envolvendo trocas gasosas poderiam demonstrar se há diferenças nas taxas fotossintéticas da espécie sob as diferentes condições, pois na planta localizada em área de mineração ocorre acúmulo de partículas na região foliar, devido aos particulados que são resultantes da atividade de lavra, beneficiamento e transporte o que poderia alterar a eficiência fotossintética;

-A avaliação da composição dos metabólitos secundários presentes nas plantas, pois poderia esclarecer quais antioxidantes sofrem as influências dos impactos causados pelas atividades de mineração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAJO, A. C.; OLOKI, K. J.; ALADESANMI, A. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. **Journal of Phytotherapy Resource**, v. 3, n. 6, p. 258-259, 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **A gestão dos recursos hídricos e a mineração**. Agência Nacional de Águas, Coordenação-Geral das Assessorias; Instituto Brasileiro de Mineração; DOMINGUES, A. F.; BOSON, P. H. G.; ALÍPAZ, S. (Org.) Brasília: ANA, 2006.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p.239-244, 2011.

ALEXANDRE T. L.; BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry. **X-ray spectrometry**, v. 35, n.4, p. 257- 260, 2006.

ALICE, C. et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n.2, p. 165–171, 1991.

ALLOWAY, B. J. Cadmium. In: **Heavy metals in soils**. ALLOWAY, B. J. (ed). New York., 1995, p. 122-151.

ALVES, A.; JANE, P. **Métodos de extração de produtos naturais**. Itacoatiara, Universidade Federal do Amazonas, 2010. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABarwAJ/relatorio-metodos-extracao-cromatografia-cg-clc-clae>> Acesso em: 14 ago. 2017. il.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66(1), p.1-9, 2007

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.373-399, 2004.

ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. 2004. 86 f. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n.1, p. 27-36, 2005.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.1, p. 55–61, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, n. 3-4, p.385-396, 2004.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844p.

BAGETTI, M. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 85f. Dissertação. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos-Universidade Federal de Santa Maria- Santa Maria, RS, 2009.

BALESTRIN et. al., Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 230-235, 2008.

BEERHUES, L.; BERGER, U. Differential accumulation of xanthonenes in methyl-jasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaurium erythraea* and *Centaurium littorale*, **Planta**, v. 197, n. 4, p. 608–612, 1995.

BORTOLOTTI, O. J. Petrografia dos Mármoreos de Caçapava do Sul, **Ciência e Natura**, v. 9, p. 37-65, 1987.

BOWLES, D. J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837- 907, 1990.

BRANCO, J. J. R., **Prospecção Geoquímica**, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1959.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Research**, v. 28, p. 25–30. 1995.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BRISKIN, D. P; GAWIENOWSKI, M. C. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1075-1081, 2001.

BRISKIN, D. P; LEROY, A; GAWIENOWSKI, M. C. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 413-420, 2000.

CARVALHO, M. T. V. et al. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 4, p. 1-10, 2013.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agrônoma Ceres, 2005, 650p.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. (Ed.) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA)**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 21th ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S.; Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, n.4728, 1985.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 128, de 07 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado**, Secretaria do Meio Ambiente, Rio Grande do Sul, 2006.

CORDEIRO, J. L. P.; HASENACK, H. Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, et al. (Ed.). **Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. p. 285-299.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DIVENSI, H. F.; ARAÚJO, J. H. B. DE. Estudo da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Bromelia balansae* Mez e *Eugenia uniflora* L. visando sua aplicação na produção de cosméticos. In: SEMINÁRIO DE EXTENSÃO E INOVAÇÃO, 2, 2012, Paraná, **Anais...** Paraná: Universidade tecnológica Federal do Paraná, 2012.

ESPIN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. **J. Agric. Food Chem.** v. 48(3), p. 648-656, 2000.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. 2005. 186f. Especialização. Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" Solos e Meio Ambiente-Universidade Federal de Lavras- Lavras, MG, 2005.

FOUQUÉ, A. Les plantes médicinales présentes en Forêt Guyanaise. **Fruits**, v.36, n.10, p.567-592, 1981.

GERSHENZON, J. Changes in the Levels of Plant Secondary Metabolites Under Water and Nutrient Stress. **Rec. Adv. Phytochem.**, v.18, p.273-320, 1984.

GHARRAS, H. EL. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 12, p. 2512–2518, 2009.

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

GOOGLE EARTH. Version 7.1.8.3036 (32-bit). 2017. Disponível em: <<https://www.google.com.br/earth/download/gep/agree.html/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 78, 127-157, 1999.

GUERINOT, M. L., YI, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, v. 104, p. 815-820, 1994.

HAGERMAN, A. E. Phenolic Biosynthesis: pathways and regulation. In: NEWMAN, D. W.; WILSON, K. G. **Models in plant physiology and biochemistry**, 1987, 425p.

HÄLLGREN, J. E.; ÖQUIST, G. **Adaptations to low temperatures**. In: ALSCHER R.G; CUMMING, J. R. (Ed.). **Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms**. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 265–293.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4th ed. London: Academic Press, 1983, 384p.

HELLER, L.; PÁDUA, V. L. **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, 2006.

HOPIA, A.; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemical Society**, 76, p.139-144, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Perfil dos municípios brasileiros: Meio ambiente**. Livro com CD, 2002, 394 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Mineração e meio ambiente**. Brasília, 1992. 126p.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KOBIYAMA, M.; MINELLA, L. P. G.; FABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 210, p. 10-17, 2001.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p.1003-1010, 1994.

KYNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.96-104, 2008.

LEE, M. I. et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n.7, p. 1343-1349, 1997.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, A. F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 384 p.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo: teoria e prática**. 2.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2002. 182p

LUZIA, D. M. M.; BERTANHA, B. J.; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 69(2):175-80, 2010.

MAIA, J. G. S. et al. New chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.727-729, 1999.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980, 251p.

MALUF, J. R. T. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Piracicaba, v. 8, n. 1, p. 141-150, 2000.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCHIORI, J. N. C. **Fitogeografia do Rio Grande do Sul: enfoque histórico e sistema de classificação**. Porto Alegre: Ed. EST, 2002, 118p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic Press, 1986. 2012. 672p.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos avançados**, 24 (68), p. 209-220, 2010.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Qualidade Ambiental nos Assentamentos Humanos. Programa de Proteção e Melhoria da Qualidade Ambiental. **Texto Básico sobre Impactos Ambientais no Setor de Extração Mineral**. Brasília – DF, 2001.

MIGUEL, A. H.; ANDRADE, J. B. Rapid Quantitation of Ten Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols by Direct Hplc Separation After Ultrasonic Acetonitrile Extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, p. 35-41, 1989.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORAIS, S. M. et al. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p. 449- 451, 1996.

MOTA, S. **Introdução à engenharia ambiental**. 4. ed., Rio de Janeiro: ABES, 2006. 388 p.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007, 858 p.

NEILSON, E. H. et al. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**, vol. 18, n. 5, 2013.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015. il.

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-x por Energia dispersiva. **Química Nova**, v. 28, n. 4, n. 579-582, 2005.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends Plant Sci.**, v.5, p.439-445, 2000.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p.1-11, 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, p. 337–341, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, E. S. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2007. 906p.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**, v. 27, p. 1471-1504, 2004.

SANCHOTENE, M. do C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FERPLAM, 1985. 311p.

SANTOS et al., Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n.1, p. 47-50, 2013.

SANTOS, E. S. **Caderno pedagógico de química. Análises físico químicas de águas e solos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Secretaria de Estado da Educação, Superintendência da Educação, Pinhais, Paraná, 2008, 61p.

SATO, M. et al. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 37-41, 1996.

SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome, systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.9, p.3362-3367, 1997.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.21, p.183-186, 1987.

SCHMIDT, A. M. et al. Avaliação de Impacto Ambiental de Lavras de Calcário em Caçapava do Sul, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOLOGIA DE ENGENHARIA E AMBIENTAL, 15, 2015, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Associação Brasileira de Geologia de Engenharia e Ambiental, 2015.

SCHMIDT, A. M. et al. Impacto de Processo de Mineração de Calcário na Atividade Antioxidante das Folhas de Pitangueira. In: CONGRESSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL DO SUL DO BRASIL, 2, 2017, Lages, SC. **Anais...** Lages: Editora UDESC, Lages, 2017.

SCHWAB, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 837-849, 2003.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHI, G.; CAI, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.67, p. 112–117, 2009.

SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28 n.1 abr., 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 639p.

SOUZA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes: von Dr. F. Soxhlet. **Polytechnisches J.**, 232 p.461-465, 1879.

SPRING, O.; BIENERT, U. Capitulate Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. **J. Plant Physiol.**, v. 130, n. 4–5, p. 441-448, 1987.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719p.

TEDESCO et al. **Análise de Solo, Plantas e Outros Materiais**. (Boletim Técnico de Solos, 5), 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p.

TOMÉ JÚNIOR, J. B. **Manual para interpretação de análise de solo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1997. 246p.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 39:44-84, 2007.

VELAZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v 74, n1-2, p.91-97, 2003.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46 (10), p. 4113–4117, 1998.

VERGARA, L. P. et al. Compostos bioativos em polpa de pitanga vermelha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., 2016, Gramado, RS, **Anais...** Gramado: FAURGS, 24 a 27 de outubro de 2016.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p.2668–2674, 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** (Documentos, 316). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462p.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

WALKER, T. S. BAIS, H. P. VIVANCO, J. M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 289-293, 2002.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.304-309, 1997.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.701-705, 1996.

WANG, Y.; FREI, M. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.141, p.271-286, 2011.

WATERHOUSE, A. L. Wine phenolics. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 957, p. 21-36, 2002.

WEIDNER, S. et al. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains. **Plant Physiol. Biochem.** v. 38, n. 7-8, p. 595-602, 2000.

WIT, P. J. G. M. Cell. Visions & Reflections (Minireview). How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 64, p. 2726-2732, 2007.

XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos**. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organizações dos Estados Americanos, p. 1-3, 1993.

YANG, F. et al. Influences of Nano-anatase TiO₂ on the Nitrogen Metabolism of Growing Spinach. **Biological Trace Element Research**, v.110, n.2, p.179-190, 2006.