

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PARÂMETROS FITOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E
DE CRESCIMENTO DE ALECRIM (*Rosmarinus
officinalis* L.) EM DIFERENTES SALINIDADES E
DOSES DE NITROGÊNIO**

TESE DE DOUTORADO

Viviane Dal-Souto Frescura

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**PARÂMETROS FITOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E DE
CRESCIMENTO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM
DIFERENTES SALINIDADES E DOSES DE NITROGÊNIO**

Viviane Dal-Souto Frescura

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de **Doutora em Agronomia.**

Orientador: Prof^a Dr^a Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DAL SOUTO FRESCURA, VIVIANE
PARÂMETROS FITOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E DE CRESCIMENTO
DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM DIFERENTES
SALINIDADES E DOSES DE NITROGÊNIO / VIVIANE DAL SOUTO
FRESCURA.-2014.

111 p.; 30cm

Orientador: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2014

1. *Rosmarinus officinalis* L. 2. Óleo volátil 3.
Extratos aquosos 4. Compostos fenólicos 5. *Allium cepa*
L. I. BOSIO TEDESCO, SOLANGE II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

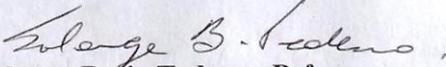
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

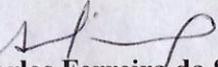
**PARÂMETROS FITOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E DE
CRESCIMENTO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM
DIFERENTES SALINIDADES E DOSES DE NITROGÊNIO**

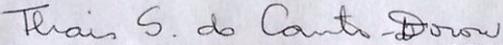
elaborada por
Viviane Dal-Souto Frescura

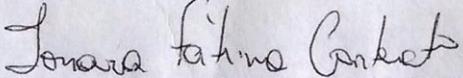
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Agronomia

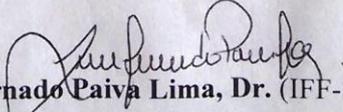
COMISSÃO EXAMINADORA:


Solange Bósio Tedesco, Dr.^a
(Presidente/Orientador)


Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)


Thais Scotti do Canto Dorow, Dr. (UNIFRA)


Ionara Fátima Conterato, Dr.^a. (FEPAGRO)


Luis Fernando Paiva Lima, Dr. (IFF-SVS)

Santa Maria, 14 de novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ademir e Maria, à minha irmã e amiga Kelen e ao meu amado Juliano, por tudo o que passamos, pelos momentos que precisei me ausentar para realizar mais este sonho, por aguentarem os momentos de ansiedade e estresse durante o período de doutorado e acima de tudo, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se faz presente em todos os momentos de minha vida, proporcionando-me realizar todos os meus sonhos.

Aos meus pais, Ademir e Maria, pela excelente educação, por sempre estarem ao meu lado, por serem meus exemplos de vida, por serem as pessoas mais humildes que conheço e por me mostrarem que na vida nada se consegue sem humildade. Por me mostrarem a cada dia que não importa de onde vim, o que importa é que sei onde quero chegar.

À minha querida irmã Kelen que se faz presente em momentos fáceis e difíceis, sempre com muita dedicação e compreensão. Obrigada por aguentar meus momentos de ansiedade e me ensinar que apesar das dificuldades, quando nos esforçamos as coisas sempre acabam bem.

Ao meu noivo Juliano, que sempre esteve presente nessa caminhada, aceitando e respeitando os momentos que precisei estar ausente, momentos estes que não foram poucos. Obrigada por me ensinar que preciso ser paciente com os momentos de dificuldade e que eles existem para nos ensinar alguma coisa, sempre.

Pai, Mãe, Kelen e Juliano: Amo vocês e se Deus me desse a chance de viver outra vez, eu só aceitaria se tivesse vocês comigo. Essa conquista é nossa.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Solange, amiga e muitas vezes orientadora/mãe, por me mostrar o melhor caminho sempre. Por ter se dedicado incansavelmente na realização desse trabalho estando sempre disposta a me auxiliar nos momentos de aflições e dúvidas. Obrigada pela excelente orientação.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Jerônimo e Prof. Dr. Sidnei, por sempre estarem dispostos a auxiliar nos momentos de dúvida. Obrigada pela excelente co-orientação.

Prof^a Dr^a Solange, Prof. Dr. Jerônimo e Prof. Dr. Sidnei: com vocês aprendi muito mais que conteúdos nas disciplinas e momentos de orientações. Com vocês aprendi que um bom profissional tem humildade e respeito ao trabalho de outrem. Vocês serão meu espelho para seguir em frente com o ensino e a pesquisa nessa instituição.

Aos demais mestres do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, que muito contribuíram com minha formação e que fizeram e fazem um ótimo trabalho. Muito obrigada.

A todos os colegas do LABCITOGEN, em especial: Leonardo, Andrielle, Marília, Kássia, Jéssica, Carmine, Felipe, Ana Paula, Clarissa e Karine que além de colegas tornaram-

se grandes amigos. Obrigada pela ajuda nos momentos que mais precisei, mesmo sendo o meu trabalho, você ajudaram como se fosse o trabalho de vocês.

À Prof^a Dr^a Cristiane De Bona da Silva e à aluna Júlia A. de Lima, pela paciência e pelos ensinamentos no Laboratório de Farmacotécnica.

À Prof^a Dr^a Margareth Linde Athayde e à aluna Aline A. Boligon pela ajuda com as análises cromatográficas realizadas nesse trabalho.

Aos grandes parceiros de experimento da Fitotecnia, Odair, Jéssica, Maíne, Franciele, Miriane e Ana Paula. Obrigada pela ajuda e pelos ensinamentos. Espero poder retribuir em dobro a ajuda de cada um de vocês.

Aos colegas de doutorado, em especial Tiago, Alana e Sílvia. Nessa caminhada nos tornamos grandes amigos, compartilhamos tantos momentos de aflição, dúvidas, tristezas e muitas alegrias, e por estarmos passando pelos mesmos medos sempre nos entendemos. Obrigada pela amizade, desejo que seja para sempre.

A todos que de alguma maneira ajudaram na realização desse sonho, em especial a Tia Maria, tia de coração, que me acolheu no momento de maior necessidade como se eu fosse da sua família, à amiga-mãe Vanessa pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos, e aos demais amigos que fizeram e fazem parte de minha vida.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS FITOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E DE CRESCIMENTO DE ALECRIM EM DIFERENTES SALINIDADES E DOSES DE NITROGÊNIO

AUTORA: VIVIANE DAL-SOUTO FRESCURA

ORIENTADOR: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de novembro de 2014.

Rosmarinus officinalis L., popularmente conhecida como alecrim, é uma espécie medicinal e aromática utilizada na indústria de cosméticos e agroalimentícia, com interesse para a indústria de fitoterápicos. Objetivou-se determinar a produção de fitomassa, óleo volátil, composição química do óleo e compostos fenólicos presentes nos extratos, durante o crescimento de plantas de alecrim cultivadas com diferentes salinidades (concentrações de solução nutritiva) e diferentes doses de nitrogênio (N), além de avaliar o efeito dos extratos e óleo volátil da espécie sobre o ciclo celular e material genético de *Allium cepa* L.. Foram coletadas as folhas de alecrim para determinação da fitomassa, extração de óleo volátil e preparo de extratos aquosos por infusão. Avaliou-se a produção de fitomassa e óleo volátil durante o crescimento de plantas de alecrim cultivadas com diferentes salinidades (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0 dS.m⁻¹) e em diferentes doses de N (5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹), além de avaliar o efeito do óleo (3 e 10%) e dos extratos (nas concentrações de 5, 20, e 50 g L⁻¹ para as plantas cultivadas em diferentes salinidades e nas concentrações de 5 e 50 g L⁻¹ a partir das plantas cultivadas em diferentes doses de N), sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*. O óleo volátil foi submetido à análise por Cromatografia Gasosa para conhecimento de sua constituição, e os extratos aquosos à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a determinação dos compostos fenólicos. As plantas cultivadas em diferentes salinidades foram coletadas aos 100 e aos 160 dias após o plantio (DAP) e as cultivadas em diferentes doses de N aos 90, 180, 270 e 365 DAP. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, os dados de produção de fitomassa e rendimento de óleo volátil foram submetidos à análise de variância com regressão polinomial e os demais dados foram comparados pelo teste Scott-Knott (p<0,05). A salinidade, a dose de N e a idade fisiológica da planta interferem na produção de fitomassa e consequentemente no rendimento de óleo volátil de alecrim e não alteram o efeito do óleo e dos extratos sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*. O óleo volátil e os extratos inibiram a divisão celular em todas as concentrações estudadas e esse efeito é dose dependente, mas sem apresentar genotoxicidade, exceto na concentração de 10% quando o óleo foi genotóxico. Os compostos majoritários do óleo foram cânfora, 1.8 cienol, α -pineno, β -myrceno e verbenona, além dos compostos β -pineno majoritários apenas no óleo de plantas cultivadas nas concentrações de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹. Os compostos fenólicos presentes nos extratos foram ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido carnósico, canferol, quercetina e rutina.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* L. Óleo volátil. Extratos aquosos. Compostos fenólicos. *Allium cepa* L.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

PHYTOCHEMICAL, GENOTOXIC AND GROWTH PARAMETERS OF ROSEMARY IN DIFFERENT SALINITIES AND NITROGEN DOSES

AUTHOR: VIVIANE DAL-SOUTO FRESCURA

ADVISER: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Santa Maria November 14, 2014.

Rosmarinus officinalis L., popularly known as rosemary, is a medicinal and aromatic species used in the cosmetics and food processing industries, with interest for the herbal industry. This study aimed to determine the biomass production and volatile oil during the growth of rosemary plants cultivated under different salinity (nutritious solution concentrations) and different nitrogen (N) concentrations, and to evaluate the effect of the extracts and volatile oil of the species on the *Allium cepa* L. cell cycle and genetic material, as well as knowing the phenolic compounds present in the extracts and the chemical composition of volatile oil. The work was divided into two stages: the first aimed evaluating the production of biomass and volatile oil during the rosemary plants growth cultivated under different nutritious solution concentrations, as well as the effect of oil and extracts on the *A. cepa* cell cycle and genetic material, besides determining the chemical composition of the oil and the phenolic compounds present in the extracts; the second stage aimed evaluating biomass and volatile oil production during the rosemary plants growth cultivated under different N concentrations, as well as the effect of oil and the extracts on the *A. cepa* cell cycle and genetic material, and determining the chemical composition of the oil and the phenolic compounds present in the extracts as well. The rosemary leaves were collected and analyzed for dry matter, volatile oil extraction and preparation of aqueous extracts by infusion at 5, 20, and 50 g.L⁻¹ concentrations for plants cultivated under different salinities, and 5 and 50 g.L⁻¹ concentrations for plants cultivated at different N concentrations. The volatile oil was analyzed by Gas Chromatography to knowledge of its constitution, and the aqueous extracts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography for phenolic compounds determination. The oil and extracts effect was evaluated on the *A. cepa* cell cycle and genetic material. The completely randomized design was used, and the biomass production and volatile oil yield data were subjected to analysis of variance with polynomial regression and the remaining data were compared by the Scott-Knott test at the 5% level of probability. The nutritious solution concentration, the N concentration and the plant age interfere into the biomass production, and consequently into the rosemary volatile oil yield. However, do not alter the oil and extracts effect on the *A. cepa* cell cycle and genetic material. The volatile oil and extracts inhibited cell division in all concentrations, and this effect is dose-dependent. In addition, extracts did not show genotoxicity, in spite of oil concentration of 10% being genotoxic. The majority compounds camphor, 1.8 cineole, α -pinene, β -myrcene and verbenone, beyond of β -pinene compounds only controlling the oil crop plants in the concentrations of 8:05, 13:05 and 15:55 mmol.L⁻¹. The phenolic compounds present in the extracts were rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, carnosic acid, kaempferol, quercetin and rutin.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L. Volatile oil. Aqueous extracts. Phenolic compounds. *Allium cepa* L.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1- Content of volatile oil of *Rosmarinus officinalis* at different concentration of nutrient solution 31
- Figure 2- Yield of volatile oil of *Rosmarinus officinalis* per plant at different concentration of nutrient solution 31
- Figure 3- Dry weight per plant of *Rosmarinus officinalis* after five days of drying in shade at different concentration of nutrient solution 31

ARTIGO 2

- Figura 1- Massa seca de folhas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ nas idades de 90, 180, 270 e 365 DAP 44
- Figura 2- Rendimento de óleo volátil nas folhas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ nas idades de 90, 180, 270 e 365 DAP..... 44
- Figura 3- Massa seca acumulada de folhas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ e submetidas a uma, duas, três e quatro coletas durante o período experimental 45
- Figura 4- Rendimento acumulado de óleo volátil nas folhas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ e submetida a uma, duas, três e quatro coletas durante o período experimental 45

ARTIGO 3

- Figura 1- As setas em a b e c indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* 10% 66

ARTIGO 4

- Figura 1- Alterações cromossômicas observadas nas células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com glifosato 1,5% (controle positivo). As setas indicam as alterações 85
- Figura 2- Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 20 g.L⁻¹, coleta realizada aos 100 DAP..... 90
- Figura 3: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 20 g.L⁻¹, coleta realizada aos 160 DAP..... 91
- Figura 4: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 50 g.L⁻¹, coleta realizada aos 100 DAP..... 92
- Figura 5- Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 50 g.L⁻¹, coleta realizada aos 160 DAP..... 93
- Figura 6- Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 50 g.L⁻¹, coleta realizada 180 e 365 DAP 94
- Figura 7- Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *Rosmarinus officinalis* na concentração de 50 g.L⁻¹, coleta realizada aos 180 e 365 DAP 95

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1- Analysis of variance for the interactions of collection times and nutrient solution concentration for the variable content (%) of volatile oil of <i>Rosmarinus officinalis</i> (CV%=9.04).....	29
Table 2- Analysis of variance for the interactions between collection periods and nutrient solution concentration for the variable yield of volatile oil per plant of <i>Rosmarinus officinalis</i> (CV%=7.47).....	29
Table 3- Analysis of variance for the interactions between collection periods and nutrient solution concentration for the variable plant dry weight after 5 days of drying in shade of volatile oil per plant of <i>R. officinalis</i> (CV%= 7.15).....	29
Table 4- Content (%) of volatile oil, yield of volatile oil (g.plant ⁻¹) and dry weight (g. plant ⁻¹) after five days of drying in shade <i>Rosmarinus officinalis</i> in the different concentrations of nutrient and collection time	29
Table 5- Chemical composition of the volatile oil of collected plants at 100 and 160 days after planting, collections 1 and 2, respectively, at five electrical conductivities of the nutrient solution	30

ARTIGO 3

Tabela 1- Tratamentos utilizados para avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de <i>Rosmarinus officinalis</i> pelo teste de <i>Allium cepa</i>	55
Table 2- Média do índice mitótico (IM) de células de <i>Allium cepa</i> , tipos de alterações observadas em células de <i>A. cepa</i> em 2000 células; porcentagem e média de alterações em cada tratamento (MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; PA/PT= ponte em anaphase e/ou telófase; %A= porcentagem de alterações; MA= média de alterações	60
Tabela 3- Média do índice mitótico (IM) de células de <i>Allium cepa</i> , tipos de alterações observadas em células de <i>Allium cepa</i> em 2000 células; porcentagem e média de alterações em cada tratamento (MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; PA/PT= ponte em anáfase e/ou telófase; %A= porcentagem de alterações; MA= média de alterações	61
Tabela 4- Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> coletadas aos 100 DAP, nas diferentes concentrações de solução nutritiva.....	62
Tabela 5- Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> coletadas aos 160 DAP, nas diferentes concentrações de solução nutritiva.....	63
Tabela 6- Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> coletadas aos 180 DAP, nas diferentes concentrações de N na de solução nutritiva	64
Tabela 7- Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> coletadas aos 365 DAP, nas diferentes concentrações de N na de solução nutritiva	65

ARTIGO 4

Tabela 1- Média do índice mitótico (IM), média de alterações cromossômicas (AC) e os tipos de alterações (micronúcleo (MN), cromossomo perdido (CP) e ponte em anáfase (PA) ou ponte em telófase (PT)) observados em células de <i>A. cepa</i> nos diferentes tratamentos.....	86
Table 2- Média do índice mitótico (IM), média de alterações cromossômicas (AC) e os tipos de alterações (micronúcleo (MN), cromossomo perdido (CP) e ponte em anáfase (PA) ou ponte em telófase (PT)) observados em células de <i>Allium cepa</i> nos diferentes tratamentos.....	87
Tabela 3- Concentração de compostos fenólicos, em mg.g ⁻¹ , nos extratos de <i>Rosmarinus officinalis</i> nas diferentes salinidades aos 100 e aos 160 dias após o plantio	88

Tabela 4- Concentração de compostos fenólicos, em mg.g^{-1} , nos extratos de *Rosmarinus officinalis* nas diferentes concentrações de N na solução nutritiva aos 6 e aos 12 meses após o plantio 89

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
ARTIGO 1: NUTRIENT SOLUTION CONCENTRATION AND COLLECTION TIME IN PHYTOMASS PRODUCTION, CONTENT, YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF VOLATILE ROSEMARY OIL	16
Introduction	17
Materials and Methods	18
Results and Discussion.....	21
Conclusion.....	25
References.....	26
ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE FITOMASSA E ÓLEO VOLÁTIL DURANTE O CRESCIMENTO DE ALECRIM EM CULTIVO FORA DO SOLO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO	32
Introdução	33
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	38
Referências Bibliográficas	41
ARTIGO 3: POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DO ÓLEO DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) CULTIVADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO NUTRITIVA E DOSES DE NITROGÊNIO DURANTE O CRESCIMENTO DA PLANTA.....	46
Introdução	48
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	56
Referências Bibliográficas	68
ARTIGO 4: ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) EM CULTIVO COM DIFERENTES SALINIDADES, CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO E IDADE DA PLANTA.....	70
Introdução	72
Material e Métodos	74
Resultados e Discussão	80
Referências Bibliográficas	96
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

INTRODUÇÃO

O uso de plantas como uma forma de terapia alternativa acessível para a população em geral desperta o interesse de pesquisadores, que têm dado importância às plantas medicinais usadas desde a antiguidade, sendo *Rosmarinus officinalis L.* uma espécie de interesse biológico, farmacológico, agrônomico, alimentício e industrial.

Rosmarinus officinalis, conhecida popularmente como alecrim, é uma espécie da família Lamiaceae, originária da Região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado de Portugal à Austrália. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5 m de altura, folhas lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura, flores azulado-claras, pequenas e de aroma forte e muito agradável (LORENZI; MATOS, 2008).

O alecrim é considerado uma espécie medicinal e aromática e o principal produto oriundo do alecrim, conhecido mundialmente, é o óleo volátil com propriedades medicinais que agem nos sistemas circulatório, nervoso e digestório, havendo também registros de usos na forma de banhos, aplicações locais, compressas, inalações, massagens, aplicações localizadas no couro cabeludo (BERWICK, 1998), além de ser empregado como essência para a perfumaria (FERRARI et al., 2011). Os extratos de alecrim são utilizados na indústria agroalimentícia, devido as suas propriedades antioxidantes e conservantes (FERRARI et al., 2011) e comercialmente para aumentar a vida de prateleira dos alimentos e, dentre os antioxidantes naturais, é citado como um daqueles com a mais alta atividade antioxidante (PENG et al., 2005), atribuída à presença de compostos fenólicos na sua constituição (SILVA et al., 2011) como ácido rosmarínico e ácido carnósico (PENG et al., 2005).

Para a produção industrial do alecrim, o cultivo fora do solo é uma boa alternativa, pois, segundo Martinez (2005), é um sistema menos complexo, podendo-se estabelecer condições ótimas de crescimento e produção. Com esse tipo de cultivo, seria possível otimizar a produção de óleo volátil e outros compostos químicos como os compostos fenólicos e, conseqüentemente, aumentar a oferta para utilização pela indústria de cosméticos, medicamentos e agroalimentícia, pois, de acordo com Martins et al. (2000) e Castro et al. (2004) existe grande variação na produção de metabólitos secundários, e estes dependem do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio.

No sistema de cultivo fora do solo utiliza-se solução nutritiva para a fertirrigação, onde a concentração dessa solução é medida pela condutividade elétrica que indica a

concentração salina (salinidade), ou seja, a quantidade de sais dissolvidos na água e, a tolerância à salinidade varia entre as espécies (ANDRIOLO, 1999).

As variações da concentração salina do meio nutritivo implicam em mudanças na absorção de água e nutrientes, levando a alterações fisiológicas das plantas (BELTRÃO et al, 1997), pois estresses como períodos muito úmidos ou muito secos induzem respostas como o fechamento de estômatos, acúmulo de solutos e antioxidantes, expressão de genes relacionados a estresse e síntese de determinados metabólitos secundários. Geralmente, condições de estresse hídrico estimulam positivamente a produção desses metabólitos (PROBST, 2012).

O desequilíbrio nutricional também tende a induzir a planta a apresentar modificações no seu metabolismo (FILHO; ABDALLA, 2011) e, como o nitrogênio (N) é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, sua deficiência causa a inibição do crescimento, devido a redução da fotossíntese, a qual diminui a divisão, a expansão e o tamanho das células e, por consequência, de todos os órgãos da planta, principalmente flores e folhas (AËGREN; FRANKLIN, 2003), então, variações na disponibilidade desse nutriente também podem interferir na produção de metabólitos secundários (CASTRO et al., 2004).

A idade fisiológica das folhas é outro fator de relevância que afeta o metabolismo secundário, pois, durante a ontogenia da planta, a área foliar sofre modificações devido ao envelhecimento das folhas consideradas individualmente e às variações nos elementos meteorológicos ao longo das estações do ano, as quais induzem alterações bioquímicas quantitativas e qualitativas (CASTRO et al., 2004; FLOSS, 2011).

O alecrim tem potencial para uso como alimento funcional e medicinal pela sua ação antioxidante (MORENO et al., 2006), o chá e o óleo volátil dessa espécie são utilizados pela população para tratamento de doenças (CUNHA et al., 2003). Assim, faz-se necessário estudo sobre o efeito dos extratos e do óleo de alecrim sobre organismos alvo, o que pode ser avaliado com o teste de *Allium cepa* L., a partir da avaliação do índice de proliferação celular e de alterações cromossômicas, o que pode alertar a população sobre possíveis danos à saúde, auxiliar na descoberta de novos fármacos e até mesmo de novas substâncias para serem utilizadas como herbicidas naturais (FRESCURA, 2012).

Entre os modelos vegetais, o sistema teste *A. cepa* apresenta-se como um bom indicador para um primeiro screening de genotoxicidade de extratos de plantas medicinais, pelo baixo custo, confiabilidade e concorda com outros testes de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). O teste de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o

Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo determinar a produção de fitomassa e óleo volátil, composição química do óleo e compostos fenólicos presentes nos extratos, durante o crescimento de plantas de alecrim cultivadas com diferentes salinidades (concentrações de solução nutritiva) e diferentes doses de N, além de avaliar o efeito dos extratos e óleo volátil da espécie sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*.

ARTIGO 1

Nutrient solution concentration and collection time in phytomass production, content, yield and chemical composition of volatile rosemary oil

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the biomass production, content, yield and chemical composition of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* L. in cultivation out of soil with different concentrations of nutrient solution in both harvests. The cultivation of rosemary was conducted in a protected system off the ground, with concentrations of nutrient solutions of 1, 2, 3, 4, and 5 dS.m⁻¹ for fertigation. Two collections of leaves for extraction of volatile oil by hydrodistillation are emphasized: the first at 100 days after planting and the second at 160 days after planting. Following the extraction of the volatile oil, content of oil in samples and the yield per plant were calculated, in addition to the chromatographic analysis of the volatile oil. The factorial arrangement (5x2) was used in a completely randomized design. The collection periods did not affect the content of volatile oil of *R. officinalis*, however, there were distinct behaviors among the compounds of the volatile oil, the yield of oil per plant, as well as the production of phytomass in the different sampling times. Nutrient solution concentration influences phytomass production and the content and yield of volatile oil in *R. officinalis*, though not its chemical composition.

Key-words: *Rosmarinus officinalis*; Lamiaceae; Fertigation; Salinity; Hydrodistillation; Chromatography.

INTRODUCTION

Rosmarinus officinalis L. is a well-known plant worldwide and has been used since ancient times. Originating in the Mediterranean region, it is mainly grown in temperate countries from Portugal to Australia. The plant has a woody subshrub size, is erect, and sparsely branched; up to 1.5 m tall; having linear leather and aromatic leaves, measuring 1.5 to 4 cm long by 1 to 3 mm wide; the flowers are light-blue, small and have a strong and pleasant aroma (Lorenzi and Matos, 2008). One of the important factors of this species is the production of its volatile oil, which is used in the cosmetics industry (Siani et al., 2000) and there is a growing interest for its medicinal use worldwide (Marchiori, 2004).

The volatile oil is found in globular microscopic cells in the leaves (Berwick, 1998). In fresh leaves, the volatile oil content ranges from 0.2% to 0.5%, and in dry leaves from 1 to 2.5%. The main components of the volatile oil are pinene (up to 30%), camphor (15 to 25%) and eucalyptol (15 to 50%). However, it has been demonstrated that this composition varies according to cultivation region (Cunha et al., 2003). They are produced by plants in small quantities, and can be synthesized throughout the period of plant development or only upon specific stimuli. The plant's response depends both on the intensity of the stimulus and the moment it occurs, and the composition of secondary metabolites can be modified by stressful situations (Furlan, 1999; Martins et al., 2000; Serafini et al., 2002).

Studies by Boyle et al. (1991) showed that the growth of rosemary does not respond well to high levels of fertilizer, but did not determine the levels of nutrients required, and stated that the species reaches highest growth in greenhouse soilless cultivation. The cultivation system without soil allows greater control of mineral nutrition and of water availability to plants, compared to the conventional system in soil (Andriolo, 2002). This control can be done through the composition and concentration of the nutrient solution used in fertigation, measured by electrical conductivity (EC) (Beltrão et al., 1997; Costa, 2001).

In plants that produce volatile oil, Morais (2009) indicated that water stress is a factor that affects performance and composition. In parsley (*Petroselinum crispum* L.) water restriction might cause physiological changes related to photosynthesis and transpiration by reducing growth. However, a trade-off with increased production of volatile oil per weight unit occurs (Petropoulos et al., 2008). Angry mint (*Mentha arvensis* L.) has better yield of phytomass and oil in a nutrient solution with a EC of 1.99 dS.m⁻¹ when compared with conductivity 25% inferior (Paulus et al., 2008).

Another factor that may alter production of volatile oil is the physiological age of the leaves, since as leaves age qualitative and quantitative biochemical modifications occur (Floss, 2011), which are also affected by climate availability throughout the year, especially solar radiation and air temperature (Morais, 2009). The greenhouse allows partial control of some environmental variables such as solar radiation, temperature and humidity (Cardoso et al., 2008), and the physiological age of the leaves to be used for the extraction of oil can be controlled through green pruning (Thomaziello and Pereira, 2008), and/or deferral of harvest dates. Research results reporting the effect of these factors on biomass production, yield and composition of the volatile oil of rosemary are scarce.

This study aimed to evaluate the production of phytomass, content, yield and chemical composition of the volatile oil of rosemary growing out of soil with different concentrations of nutrient solution in both harvest times.

MATERIALS AND METHODS

Phytomass production

The production of phytomass was carried out in a greenhouse of 115 m², covered with 200 µm thick anti-UV activated polyethylene in the Department of Phytotechniques of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul (Brazil) from 21 August 2012 to 29 January 2013.

During the plant growth period and development, between 21 August 2012 and 29 January 2013, the average air temperature and accumulated global solar radiation were collected daily by an automatic weather station about 300 meters away. The average values for these variables were, respectively, 1.89 °C and 134.25 MJ.m⁻² in August; 17.5 °C and 425.04 MJ.m⁻² in September; 20.41 °C and 463.37 MJ.m⁻² in October; 23.23 °C and 726.09 MJ.m⁻² in November; 24.74 °C and 753.85 MJ.m⁻² in December; 23.12 °C and 710.33 MJ.m⁻² in January.

Rosemary plants were obtained by cuttings in June 2012 from a stake of approximately 12 cm, with three apical leaves and using indolebutyric acid (IBA) at 3000 ppm to induce roots for a period of 2 months of rooting. Planting was undertaken in August of the same year; with plants measuring approximately 15 cm long and the soil was maintained. Polypropylene pots of 3 dm³ were used on benches formed by 1.1 m x 4 m cement tiles, coated by a polypropylene tarp. The pots were filled with washed sand if a grain

size between 1 mm and 3 mm. The maximum water holding capacity of the sand in the pots was 0.238 L.dm^3 . The pots were placed at 0.80 m above ground, in four rows on the benches, with 0.3 m between pots and 0.27 m between rows (12 pots per m^2). On each bench a reservoir of fiberglass to store 500 L of nutrient solution was installed. Nutrient solution was supplied using a submersible pump connected to drip taped, with one dripper per pot, with the mean flow rate of 1.3 L.h^{-1} , driven by a time switch. A draining coefficient of no less than 30% was used in each fertigation and the drained solution was collected and returned to the reservoir, in a closed system.

A nutrient solution with a mean concentration of total nitrogen with the following ionic composition (in mmol.L^{-1}): 11.02 of NO_3^- ; 2.32 of NH_4^+ ; 0.8 of H_2PO_4^- ; 6 of K^+ ; 1.75 of Ca^{+2} ; 1.25 of Mg^{+2} , and 1.25 of SO_4^{-2} was adjusted. The micronutrients were supplied at (in mmol.L^{-1}): 0.03 of Mo; 0.26 of B; 0.06 of Cu; 0.50 of Mn; 0.22 of Zn, through a stock solution and iron chelate was supplied separately, at 1 mg.L^{-1} . Macronutrients were supplied with potassium nitrate, potassium phosphate, calcium-Calcinit® nitrate, magnesium sulfate, and ammonium nitrate fertilizers.

The treatments consisted of multiple concentrations of this solution, adjusted by adding water or additional amounts of fertilizer in order to obtain electrical conductivity (EC) in dS.m^{-1} of: 1.0 (T1), 2.0 (T2), 3.0 (T3), 4.0 (T4), and 5.0 (T5), being that T1 with electrical conductivity of 1.0 dS.m^{-1} was considered as the control since it was the reference nutrient solution.

One to four fertigations were carried out daily to replace the volumes of water transpired by the plant, estimated as described by Pardossi et al. (2011). The pH was maintained between 5.5 and 6.0, tolerating a deviation of 0.2 units, by adding 0,01 N NaOH or 0,01 N H_2SO_4 , as needed. The electrical conductivity of each treatment was corrected whenever a deviation less than 10% from the reference value was found. The corrections were made by adding water or fertilizer, calculated from a previously determined linear relationship between the EC and the total amount of dissolved salts. There was no disposal of nutrient solution during the entire experiment and the volume in each reservoir was maintained above 250 L.

Two harvests of plants were undertaken, 100 days (collection 1) and 160 days after planting (collection 2). At each collection, leaves of 10 plants were dried at room temperature in shade for 5 days, to reduce leaf humidity, easing the process of volatile oil extraction, according to Khordishi et al. (2009). Leaf dry weight of four of these plants was then

determined and volatile oil extraction was undertaken on compound samples prepared from leaves of the 10 collected plants.

Extraction of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis*

To extract volatile oil, samples of 30 g of whole leaves were prepared in four replicates. The samples were weighed and frozen until hydrodistillation. Volatile oil extraction was performed in a Clevenger apparatus for 3 hours. The oil was dried in anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C until chromatographic analysis.

The content of volatile oil (%) was calculated from a ratio of the mass of volatile oil and the sample biomass, while the yield (g) of volatile oil used the plant weight.

Chromatographic analysis of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis*

Gas chromatography (GC-FID)

The gas chromatography (GC) analyses were carried out using an Agilent Technologies 6890N GC-FID system, equipped with DB-5 capillary column (30 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and connected to an FID detector. The injector and detector temperatures were set to 280°C. The carrier gas was helium, at a flow rate of 1.3 mL/min. The thermal programmer was 50-300°C at a rate of 5°C/min. Two replicates of samples were processed in the same way. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors. The injection volume of the oil was 1 µL (Tzakou and Loukis, 2009; Verma et al., 2010).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS analyses were performed on an Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS operating in the EI mode at 70 eV, equipped with a split/splitless injector (250°C). The transfer line temperature was 280°C. Helium was used as carrier gas (1.3 mL/min) and the capillary columns used were an HP 5MS (30 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 mm) and an HP Innowax (30m x 0.32mm i.d., film thickness 0.50 mm). The temperature program was the same as that used for the GC analyses. The injected volume was 1 µL of the volatile oil.

Identification of the components

Identification of the constituents was performed on the basis of retention index (RI), determined with reference of the homologous series of *n*-alkanes, C₇-C₃₀, under identical experimental conditions, comparing with the mass spectra library search (NIST and Wiley), and with the mass spectra literature data Adams (1995). The relative amounts of individual components were calculated based on the CG peak area (FID response).

Statistical analysis

The experimental design was a factorial arrangement (five concentrations of nutrient solution and two sampling times) in a completely randomized design and data were submitted to an analysis of variance (ANOVA). With no interactions between factors, quantitative treatments were analyzed by a polynomial regression while the qualitative were analyzed by the F test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The F test of the analysis of variance revealed no interactions between sampling times and the different concentrations of nutrient solutions for the variable content of volatile oil of *R. officinalis* (Table 1) and the polynomial regression analysis showed a significant quadratic effect for the content of volatile oil in both samples (Figure 1).

The F test of the analysis of variance revealed no interactions between sampling times and the different concentrations of nutrient solutions for the yield of volatile oil per plant of *R. officinalis* (Table 2) and the polynomial regression analysis showed a quadratic effect (Figure 2).

The collection at 160 days after planting (collection 2) had a higher yield of volatile oil per plant, since the plants had a higher dry weight (after 5 days of drying in shade) (Figure 3), in agreement with observations by Silva et al. (2005) when harvests in August 1999 had a smaller yield of volatile oil than that undertaken in January 2000 for *Ocinum basilicum* L (basil).

Simon et al. (1992) demonstrated that *O. basilicum* has a decrease in dry weight yields under stress conditions, while producing twice more volatile oil. The same happened to *R. officinalis* during the stress conditions induced by the different nutrient solutions, since the polynomial regression analysis showed a linear effect for dry weight, decreasing with the concentration of nutrient solution (Figure 3). Thus, the stress caused by the increase of concentrations of nutrient solution caused an increase in the content of volatile oil of up to 3.4 dS.m^{-1} , while the dry weight of the plants decreased, reducing the yield of volatile oil per plant. The best concentration of nutrient solution to volatile oil yield per plant was of 1.86 dS.m^{-1} .

According to Azizi et al. (2009), consistent water deficiency caused reduction of dry matter, but not essential oil content in *Origanum vulgare* L (oregano), and the same was observed in the present study with rosemary.

The increase in the content of volatile oil accompanied by lower phytomass production and a consequent lower yield of oil was also observed in *Mentha x gracilis* Sole (mint), an aromatic species of the family Lamiaceae, as rosemary (Garlet et al., 2007).

The F-test of analysis of variance revealed that there was no interaction between collection times and the nutrient solution concentrations for plant dry weight after 5 days of drying in shade (Table 3), with a decrease of plant phytomass with an increase in the concentration of nutrient solution and higher accumulation of phytomass at 160 days (Table 4 and Figure 3).

The collections at 100 and 160 days after planting, collections 1 and 2 respectively, did not differ in the content of volatile in *R. officinalis* (Table 4); however, the same variable was influenced by the nutrient solution concentration (Figure 1). The concentration of 3.4 dS.m⁻¹ provided a better result for this variable at both ages examined.

The contents of the volatile oil obtained in the present study with the different concentrations of nutrient solution at the two sample collections (between 2.19% and 3%) were superior to those obtained by other researchers with extraction by hydrodistillation of *R. officinalis* leaves which were: 2.1% and 2.6% (Jamshidi et al., 2009); 0.9%, 1.3%, and 1.8% (Khorshidi et al., 2009); and 0.44% (Boutekdjiret et al., 2003). This demonstrates effectiveness in the use of the cultivation method in a protected environment outside of soil with fertigation at both collection times for the species.

The difference between the ideal nutrient concentration to achieve the highest yield per plant (1.86 dS.m⁻¹) and to achieve the highest concentration of volatile oil (3.4 dS.m⁻¹) is due to the fact that in order to calculate the yield, plant biomass is considered, while for content it is the oil quantity per 30 grams of leaves. Since the increase in concentration of the nutrient solution decreased plant phytomass, higher concentrations of the solution may increase the content of volatile oil, however, decreasing the phytomass reducing the yield of volatile oil per plant.

Variations in the nutrient solution concentration or the salt concentration in the nutrient medium can cause changes in nutrient and water absorption leading to physiological changes of plants (Beltrão et al., 1997), with water deficiency as the leading cause of productivity loss (Ortolani and Camargo, 1987).

Plants harvested at 160 days had a longer growth period and consequently higher volatile oil yield per plant, even though there was no difference in volatile oil content (Table 4). Therefore, we suggest the most appropriate is to use the nutrient solution at $1.86 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ harvesting after 160 days to obtain the highest yield of volatile oil per plant when there is interest in volatile oil production. Plants with a high content of volatile oil and low leaf production do not have agricultural interest, since they result in low yield of oil per acreage (Garlet, 2007).

In the volatile oil from leaves collected at 100 and 160 days after planting terpenes were identified by GC in the classes of monoterpenes and sesquiterpenes, in greater quantities monoterpenes with 21 compounds among the 28 compounds identified (Table 5). Monoterpenes and sesquiterpenes are the main substances that compose volatile oils and the abundance of these compounds is associated with the metabolic pathway of acetate derived from providing the acetyl units that comprise the reactive intermediate, acetyl-CoA, the true precursor of several substances, among them the terpenoids derived from the mevalonate pathway (Santos, 2001).

There were no significant differences in the chemical composition of the volatile oil of rosemary in different concentrations of nutrient solution, so, only the comparison among samples at 100 and 160 days after planting were performed (Table 5). The major compounds of the volatile oil in the different sampling times were the monoterpenes; at 100 and 160 days after planting they were: camphor (23.05% to 21.33%), 1,8 cineole (16.41% to 16.78%), α -pinene (9.60% to 11.15%), β -myrcene (8.37% to 8.18%,) and verbenone (6.98% to 7.20%) (Table 5) corresponding to 64.41% of 92.87% of the volatile oil derived from the collection at 100 days after planting and 64.64% of 91.37% of the collection at 160 days. Besides the compounds considered major, other compounds were identified in the volatile oil of *R. officinalis*, which are described in Table 5.

In the literature it was observed that the composition of the volatile oil of *R. officinalis* varies in the different studies, for example: the camphor compounds (26.40%), 1,8 cineole (23.48%), α -pinene (9.94%) and verbenone (3.32%) were described by Rahman et al. (2007) as dominant in rosemary cultivated in India, along with camphene (5.83%), myrcene (4.86%), bornyl acetate (3.97%), limonene (3.08%), borneol (2.05%) and α -terpineol (2.68%) with described as dominant. In a study carried out by Atti-Santos et al. (2005) the dominant compound were α -pinene (40.55 to 45.20%), 1,8 cineole (17.40 to 19.35%), camphene (4.73 to 6.06), verbenone (2.32 to 3.86%) and borneol (2.24% to 3.10%) in harvests in 1998, 1999

and 2000; and, for the authors Ribeiro et al. (2012), the dominant constituents were α -pinene (19.8%), β -myrcene (24.2%), 1.8 cineole (22.2%) and verbenone (9.3%).

Among the compounds of the volatile oil of *R. officinalis* the compounds 1.8 cineole, β -myrcene, β -pinene, δ -terpinene, terpin-4-ol, pinocarvone, naphthalene and α -cadinene did not change their concentration at 100 and 160 days after planting, while the compounds α -pinene, verbenone, α -caryophyllene, α -phellandrene, p-cymene, caryophyllene and aromadendrene were identified in higher concentration in plants collected at 160 days (Table 5). Still, the compounds camphor, linalool, isoborneol, borneol, menthol, α -terpinol, piperitol<cis->, pulegone, eugenol, α -copaene, α -muurolene, α -bisabolene and caryophyllene oxide were identified in higher concentrations in plants collected at 100 days after planting (Table 5).

As with rosemary, variability in chemical composition of volatile oil in aromatic plants has been observed in studies by other authors, in *M. x gracilis* by Garlet et al. (2007) where the maximum dose of K (690 mg.L^{-1}) in the nutrient solution increased the content of linalool, the main compound of interest in the volatile oil of the species, and doses of poultry litter in acreage under winter irrigation influenced the content of linalool, in *O. basilicum* (Luz et al., 2009).

We found that monoterpene and sesquiterpene concentrations in the volatile oil of *R. officinalis* varied, being that some compounds varied in concentration according to time of collection, while others did not (Table 5). This variation can result from the complex interactions among biosynthesis, transportation, storage and degradation (Wink, 1990) and it seems that the production of these metabolisms is associated to the degree of differentiation and development of tissues (Santos, 2001).

According to Garlet et al. (2007), various efforts have been made to provide increased yield of monoterpenes in plants in order to meet the growing global demand for flavoring, flavors, fragrances and medicines. Thus, the results of this study may help in choosing harvest to obtain material for the extraction of volatile oil, since there were different behaviors between the components of the volatile oil of *R. officinalis* in collections performed at 100 and 160 days after planting.

CONCLUSION

The concentration of the nutrient solution (1, 2, 3, 4 and 5 dS.m⁻¹) did not interfere with the chemical composition of volatile oil of rosemary; however, it did interfere in biomass production, yield and content of volatile oil.

The concentration of 3.4 dS.m⁻¹ provided higher content of volatile oil, while the highest yield of volatile oil per plant occurs in nutrient solution at a concentration of 1.86 dS.m⁻¹.

The collection time does not interfere in the content of essential oil of *R. officinalis*, however, the production of phytomass and the yield of oil per plant are higher in collections at 160 days after planting.

The chemical composition of volatile oil varies at 100 and 160 days after planting, taking into account that one should observe the behavior of the compound of greatest interest for the choice of time for collecting plant material, since the compounds behave differently among themselves at the evaluated times of collection.

REFERENCES

- Adams RP, 1995. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Illinois USA.
- Andriolo JL, 2002. Olericultura geral: princípios e técnicas. Santa Maria : Edufsm, 2002.
- Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD, Rech JC, Pansera MR, Agostini F, Serafini LA and Moyna P, 2005. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. Brazilian Archives of biology and Tecnology, 48(6): 1035-1039.
- Azizi A, Yan F and Honermeier B, 2009. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. Industrial Crops and Products, 29(2-3):554-561.
- Beltrão J, Trindade D and Correia PJ, 1997. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. Acta Horticulturae, 449: 623-627.
- Berwick A, 1998. Os 24 óleos essenciais. In:_____. Aromaterapia holística. Rio de Janeiro: Nova Era.
- Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R and Bessiere JM, 2003.. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour and Fragrance Journal, 18: 481-484.
- Boyle TH, Cracker LE and Simon JE, 1991. Growing medium and fertilization regime influence growth and essential oil content of rosemary. HortScience, 26 (1): 33-34.
- Cardoso LS, Bergamaschi H, Comiran F, Chavarria G, Marodin GAB, Dalmago GA, Santos HP and Mandelli F, 2008. Alterações micrometeorológicas em vinhedos pelo uso de coberturas de plástico. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43: 441-447.
- Costa PC, Didone EB, Sesso TM, Cañizares KAL and Goto R, 2001. Condutividade elétrica da solução nutritiva e produção de alface em hidroponia. Scientia Agricola, 58(3):595-597.
- Cunha AP da, Roque OR and Silva AP da, 2003. Monografia das plantas e dos produtos vegetais mais usados na fitoterapia. In: Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Furlan M B, 1999. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá : SEBRAE/MT.
- Floss EL, 2011. Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo do que está por trás do que se vê. 5. ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo.
- Garlet TMB, 2007. Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L. (Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio. 2007. 113p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Garlet TMB, Santos OS, Medeiros SLP, Manfron PA, Garcia DC, Borcioni E and Fleig V,

2007. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Ciência Rural*, 37(4): 956-962.
- Jamshidi R, Afzali Z and Afzali D, 2009. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5(1):78-81.
- Khorshidi J, Rahmat M, Mohammad FT and Himan N, 2009. Influence of Drying Methods, Extraction Time, and Organ Type on Essential Oil Content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nature and Science*, 7(11): 42-44.
- Lorenzi H, and Matos FJ, 2008. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Luz JMK, Morais TPS, Blank AF, Sodré ACB and Oliveira GS, 2009. Teor, rendimento e composi o química do óleo essencial d manjericão sob doses de cama de frango. *Horticultura Brasileira*, 27(3): 349-353.
- Marchiori VF, 2004. Monografia de *Rosmarinus officinalis*. Funda o Herbarium Associa o Argentina de Fitomedicina.
- Martins ER, Castro DM, Catellani DC and Dias JE, 2000. Plantas Medicinais. Viçosa: UFV.
- Morais LAS, 2009. Influência dos fatores abióticos na composi o química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27:4050-4063.
- Ortolani AA and Camargo MBP, 1987. Influência dos fatores climáticos na produ o. In: Castro R.C. et al. *Ecofisiologia da produ o agrícola*. Piracicaba: Associa o Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato.
- Pardossi A, Carmassi G, Diara C, Incrocci L, Maggini R and Massa D, 2011. Fertigation and Substrate Management in Closed Soilless Culture. University of Pisa, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie.
- Paulus D, Medeiros SLP, Santos OS, Paulus E, 2008. Solu o nutritiva para produ o de menta em hidroponia. *Horticultura Brasileira*, 26(1): 61-67.
- Petropoulos SA, Olympios C M and Passam HC, 2008. The effect of nitrogen fertilization on plant growth and the nitrate content of leaves and roots of parsley in the Mediterranean region. *Scientia Horticulturae*, 118: 255-259.
- Rahman L, Kukerja AK, Singh SK, Yadav A and Khanuja SPS, 2007. Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttanvhal Hills, India. *Journal of spices and Aromatic Crops*, 16(1)55-57.
- Ribeiro DS, Melo DB, Guimarães AG and Velozo ES, 2012. Avalia o do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina*, v.33, n. 2, p.687-696.

- Santos RI, 2001. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed. ver. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC.
- Serafini LA, Santos ACA, Touguinha LA, Agostini G and Dalfovo V, 2002. Óleos essenciais : Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. Caxias do Sul: EDUCS.
- Siani AC, Sampaio ALF, Sousa MCD, Henriques MDGMO and Ramos MFS, 2000. Óleos essenciais: Potencial anti-inflamatório. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, 16: 38-43.
- Silva F, Silva RH, Andrade NJ, Barbosa LCA, Casali VWD, Lima RR and Passarinho RVM, 2005. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 40: 323-328.
- Simon JE, Reiss-Bubenheim D, Joly RJ and Charles DJ, 1992. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research, 4: 71-75.
- Thomaziello RA and Pereira SP, 2008. Poda e condução do cafeeiro arábica. Campinas: IAC.
- Tzakou O and Loukis A, 2009. Chemical composition of the essential oil of *Achillea umbellate* growing in Greece. Natural Product Research, 23:264-270.
- Verma RS, Padalia RC, Chanotiya CS and Chauhan A, 2010. Chemical investigation of the essential oil of *Thymus linearis* (Benth. ex Benth) from western Himalaya, India. Natural Product Research, 24: 1890-1896.
- Wink M, 1990. Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood, B.D.; Rhodes, M.J.C. (ed.). Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon.

TABLE 1: Analysis of variance for the interactions of collection times and nutrient solution concentration for the variable content (%) of volatile oil of *Rosmarinus officinalis* (CV%= 9.04).

SV	DF	SS	MS	F calculated
Factor A	4	1.98946	0.49737	8.4246 ^{ns}
Factor D	1	0.00342	0.00342	0.0580 ^{ns}
Interaction AXD	4	0.09239	0.02310	0.3912 ^{ns}
Treatments	9	2.08527	0.23170	3.9246 [*]
Error	30	1.77113	0.05904	
Total	39	3.85640		

CV= Coefficient of Variation; SV= Sources of Variation; DF= Degrees of Freedom; SS= Sum of Squares; MS= Mean Square; Factor A= Concentration of the nutrient solutions (5 levels); Factor D= Collection time (2 levels); ^{ns} In quantitative treatments F test not applied; * Significant at 5% probability of error; ^{ns} Not significant at 5% probability of error.

TABLE 2: Analysis of variance for the interactions between collection periods and nutrient solution concentration for the variable yield of volatile oil per plant of *Rosmarinus officinalis* (CV%= 7.47).

SV	DF	SS	MS	F calculated
Factor A	4	0.35079	0.08770	25.7277 ^{ns}
Factor D	1	0.29816	0.29816	87.4723 [*]
Interaction AXD	4	0.00139	0.00035	0.1019 ^{ns}
Treatments	9	0.65034	0.07226	21.1990 [*]
Error	30	0.10226	0.00341	
Total	39	0.75260		

CV= Coefficient of Variation; SV= Sources of Variation; DF= Degrees of Freedom; SS= Sum of Squares; MS= Mean Square; Factor A= Concentration of the nutrient solutions (5 levels); Factor D= Collection time (2 levels); ^{ns} In quantitative treatments F test not applied; * Significant at 5% probability of error; ^{ns} Not significant at 5% probability of error.

TABLE 3: Analysis of variance for the interactions between collection periods and nutrient solution concentration for the variable plant dry weight after 5 days of drying in shade of volatile oil per plant of *Rosmarinus officinalis* (CV%= 7.15).

SV	DF	SS	MS	F calculated
Factor A	4	1074.17725	268.54431	60.4316 ^{ns}
Factor D	1	441.29449	441.29449	99.3063 [*]
Interaction AXD	4	22.09126	5.52281	1.2428 ^{ns}
Treatments	9	1537.56300	170.84033	38.4449 [*]
Error	30	133.31320	4.44377	
Total	39	1670.87620		

CV= Coefficient of Variation; SV= Sources of Variation; DF= Degrees of Freedom; SS= Sum of Squares; MS= Mean Square; Factor A= Concentration of the nutrient solutions (5 levels); Factor D= Collection time (2 levels); ^{ns} In quantitative treatments F test not applied; * Significant at 5% probability of error; ^{ns} Not significant at 5% probability of error.

TABLE 4: Content (%) of volatile oil, yield of volatile oil (g.plant⁻¹) and dry weight (g. plant⁻¹) after five days of drying in shade *Rosmarinus officinalis* in the different concentrations of nutrient and collection times.

	Content	Yield	Dry weight
Collection 1 = 100 days	2.69 ^a	0.69 ^b	26.14 ^b
Collection 2 = 160 days	2.67 ^a	0.86 ^a	32.78 ^a

Means followed by the same letter in the column do not differ by the F test at 5% probability of error.

TABLE 5: Chemical composition of the volatile oil of collected plants at 100 and 160 days after planting, collections 1 and 2, respectively, at five electrical conductivities of the nutrient solution.

	Compounds	RI ^a	RI ^b	Collection 1	Collection 2	
				%	%	
M	α -pinene	936	939	9.60 ^B	11.15 ^A	
	α -camphene	954	953	3.57 ^B	4.52 ^A	
	β -pinene	980	980	3.20 ^A	3.29 ^A	
	β -myrcene	991	991	8.37 ^A	8.18 ^A	
	α -phellandrene	1003	1005	0.37 ^A	0.25 ^B	
	p-cymene	1026	1026	0.75 ^A	0.44 ^B	
	1.8 cineol	1037	1033	16.41 ^A	16.78 ^A	
	Camphor	1143	1143	23.05 ^A	21.33 ^B	
	δ -terpinene	1065	1062	1.34 ^A	1.28 ^A	
	Linalool	1098	1098	2.63 ^A	2.54 ^B	
	Isoboneol	1156	1156	3.83 ^A	2.74 ^B	
	Borneol	1165	1166	1.89 ^A	1.82 ^B	
	Menthol	1173	1173	1.01 ^A	0.94 ^B	
	Terpin-4-ol	1178	1177	0.48 ^A	0.51 ^A	
	Pinocarvone	1160	1162	1.16 ^A	1.11 ^A	
	Naphthalene	1178	1179	0.31 ^A	0.34 ^A	
	α -terpineol	1189	1189	1.98 ^A	1.70 ^B	
	piperitol <cis->	1195	1193	1.13 ^A	0.93 ^B	
	S	Verbenone	1205	1204	6.98 ^B	7.20 ^A
		Pulegone	1237	1237	0.21 ^A	0.15 ^B
Eugenol		1356	1356	0.89 ^A	0.73 ^B	
α -copaene		1376	1376	0.13 ^A	0.01 ^B	
Caryophyllene		1417	1418	0.75 ^B	1.34 ^A	
Aromadendrene		1440	1439	0.34 ^B	0.48 ^A	
α -muurolene		1498	1499	0.13 ^A	0.07 ^B	
α -bisabolene		1504	1504	0.55 ^A	0.46 ^B	
α -cadidene		1538	1538	0.26 ^A	0.25 ^A	
	Caryophyllene oxide	1580	1581	1.55 ^A	0.83 ^B	
	Total identified (%)			92.87	91.37	

Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages. ^aRetention indices experimental (based on homologous series of *n*-alkane C₇-C₃₀). ^bRetention indices from literature (Adams, 1995); T1, T2, T3, T4 and T5 = electrical conductivities of 1; 2; 3; 4 and 5 dS.m⁻¹, respectively; M= monoterpenes; S= sesquiterpenes; Means followed by the same letter in the column do not differ by the F test at 5% probability of error.

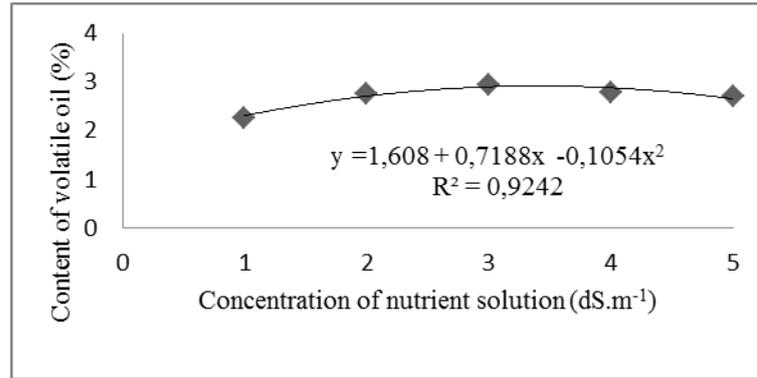


Figure 1: Content of volatile oil in *Rosmarinus officinalis* at different concentration of nutrient solution.

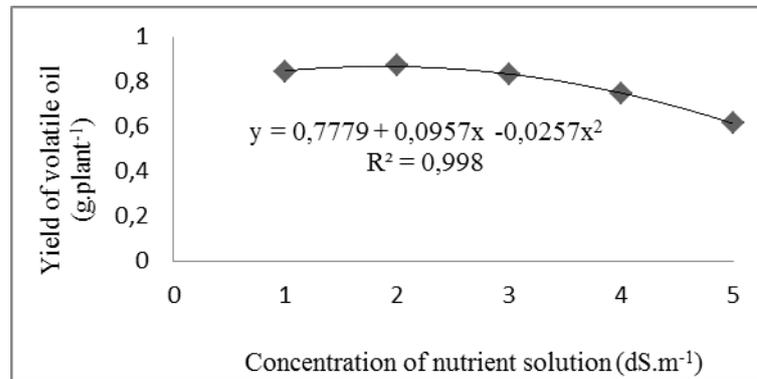


Figure 2: Yield of volatile oil of *Rosmarinus officinalis* per plant at different concentration of nutrient solution.

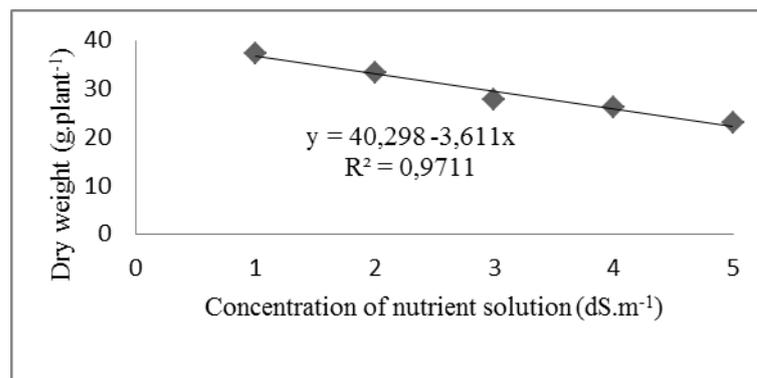


Figure 3: Dry weight per plant of *Rosmarinus officinalis* after five days of drying in shade at different concentration of nutrient solution.

ARTIGO 2

Produção de fitomassa e óleo volátil durante o crescimento de alecrim em cultivo fora do solo com diferentes concentrações de nitrogênio

RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar o efeito da concentração de nitrogênio (N) e da periodicidade de coletas na produção de fitomassa e óleo volátil durante o crescimento de plantas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivadas fora do solo. As plantas foram cultivadas em vasos de polipropileno de 3 dm³ preenchidos com areia e fertirrigadas com soluções nutritivas contendo concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol.L⁻¹ e iguais concentrações dos demais nutrientes. O número total de coletas durante o período variou de uma a quatro (C1, C2, C3 e C4), com intervalos de 90 dias, sendo avaliadas também aos 90, 180, 270 e 365 dias após o plantio (DAP). Em C4 a primeira coleta foi feita em abril de 2013, aos 90 dias após o plantio (DAP), e repetidas três vezes totalizando quatro ao final do experimento; em C3 a primeira coleta foi feita em julho de 2013, aos 180 DAP, e repetidas duas vezes totalizando três; em C2 a primeira coleta foi feita em outubro de 2013, aos 270 DAP, e repetida uma vez, totalizando duas; em C1 a primeira e única coleta foi feita em janeiro de 2014, aos 365 DAP, sem nenhuma coleta anterior. Foi empregado o arranjo fatorial 5x4 em delineamento inteiramente casualizado com 44 plantas por parcela. Foi determinada a massa seca de folhas após secagem em estufa de circulação forçada de ar na temperatura de 60°C até alcançar massa constante entre duas pesagens sucessivas, e o rendimento de óleo volátil extraído em aparelho de Clevenger a partir de amostras de 30 g de folhas secas à sombra em temperatura ambiente durante cinco dias. Os resultados indicaram que para produção de óleo volátil deve-se maximizar a produção de fitomassa de folhas, a qual é favorecida realizando apenas uma coleta aos 365 DAP empregando na fertirrigação uma solução nutritiva com concentração de N em torno de 9,40 mmol L⁻¹.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* L.; Massa seca; Fertirrigação. Plantas aromáticas.

32 **Shoot growth and volatile oil production of soilless rosemary plants grown under different**
33 **nitrogen concentrations in the nutrient solution.**

34

35

ABSTRACT

36

37 The objective of this research was to determine the effect of nitrogen concentration and the
38 periodicity of harvests on shoot growth and volatile oil production of rosemary (*Rosmarinus*
39 *officinalis* L.) plants in soilless cultivation. Plants were grown in 2.5 dm³ polypropylene pots
40 filled with sand and fertigated by means of nutrient solutions at N concentrations of 5.55;
41 8.05; 10.55; 13.05 and 15.55 mmol L⁻¹, with similar concentrations of the other nutrients.
42 The total number of harvests during the experimental period varied from one to four, at 90
43 days intervals (C1, C2, C3 and C4), at 90 days intervals, and were evaluated ages of 90, 180,
44 270 and 365 days after planting (DAP). In C4, the first harvest was made on April 2013, at 90
45 (DAP), and repeated three times reaching four harvests at the end of the experiment; in C3,
46 the first harvest was 26 July 2013, at 180 DAP, and repeated two times, reaching three
47 harvests; in C2, the first harvest was 28 October 2013, at 270 DAP, and repeated once a
48 time, reaching two harvests; in C1, only one harvest was made January 2014, at 365 DAP,
49 any harvest being done before. It was used a 5 x 4 factorial entirely randomized
50 experimental design with 44 plants per plot. It was determined the shoot dry mass and yield
51 of volatile oil extracted in a Clevenger. Results showed that for the production of volatile oil
52 the shoot growth have to be maximized, which can be reached by only one harvest at 365
53 DAP and using a nutrient solution at N concentration of 9.40 mmol L⁻¹.

54

55 **Keywords:** *Rosmarinus officinalis* L.; Dry mass; Fertirrigation; Aromatic plants.

56

57

58

INTRODUÇÃO

59

60 *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecida como alecrim, originária da região
61 Mediterrânea, é considerada uma espécie medicinal e aromática, sendo os extratos
62 utilizados na indústria agroalimentícia, devido as suas propriedades antioxidantes e
63 conservantes (Ferrari *et al.*, 2011). O óleo volátil é o principal produto oriundo do alecrim,

64 conhecido mundialmente pelas propriedades medicinais com ação nos sistemas circulatório,
65 nervoso e digestório, havendo registros de usos na forma de banhos, aplicações locais,
66 compressas, inalações, massagens e aplicações localizadas no couro cabeludo (Berwick,
67 1998), sendo empregado também como essência para a perfumaria (Ferrari *et al.*, 2011).

68 Para a produção industrial do alecrim, o cultivo fora do solo é uma das alternativas,
69 pois permite estender o período de produção ao longo do ano e aumentar a produção de
70 fitomassa. Esse sistema de cultivo possibilita maior controle do ambiente em relação ao
71 cultivo no solo (Martinez, 2005).

72 Existe grande variação na produção de metabólitos secundários pela planta de
73 alecrim a qual é influenciada pelo genótipo e pelo ambiente, e um dos fatores que podem
74 alterar o metabolismo secundário é a disponibilidade de nutrientes minerais. Tal
75 disponibilidade afeta o crescimento da planta, a produção de fitomassa e de óleos voláteis
76 (Martins *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004). Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas, o
77 nitrogênio (N) é um dos mais importantes, sendo constituinte de aminoácidos, proteínas,
78 clorofila e ácidos nucleicos e sua deficiência causa a redução da fotossíntese, a qual diminui
79 a divisão, a expansão e o tamanho das células e, por consequência, de todos os órgãos da
80 planta, principalmente flores e folhas (Aêgren & Franklin, 2003). Doses elevadas de N
81 resultaram em maior crescimento da planta e rendimento de óleo volátil em *Chamomila*
82 *recutita* (L.) Rauschert (camomila) (Amaral *et al.*, 2008) e maior crescimento da planta em
83 *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (sabiá) (Marques *et al.*, 2006). Com relação à composição
84 química da planta, tem sido sugerido na literatura que plantas crescendo em condições
85 nutricionais limitantes priorizam o metabolismo secundário em detrimento do crescimento
86 vegetativo (Glynn *et al.*, 2007; Le Bot *et al.*, 2009).

87 A idade fisiológica das folhas é outro fator de relevância que afeta o metabolismo
88 secundário da planta. Durante a ontogenia, a área foliar da planta sofre modificações devido
89 ao envelhecimento das folhas e às variações nos elementos meteorológicos ao longo das
90 estações do ano, as quais induzem alterações bioquímicas quantitativas e qualitativas
91 (Castro *et al.*, 2004). Em camomila, Amaral *et al.* (2014) realizaram colheitas aos 85, 92, 99,
92 106 e 113 dias após o plantio e verificaram que aos 106 dias ocorreu a maior produção de
93 fitomassa de capítulos e de óleo volátil. Em plantas de *Mentha piperita* L. (hortelã) cultivadas
94 em hidroponia Souza *et al.* (2007) observaram que aos 29 dias após o transplante as plantas
95 estão aptas para serem colhidas para a extração de óleo volátil, o que significa maior

96 precocidade de colheita e rendimento de óleo em comparação com o cultivo convencional
97 no solo.

98 Em *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta longa) o rendimento de óleo volátil foi maior
99 quando se realizou apenas um corte no intervalo de 12 meses comparado a dois cortes
100 durante esse período (Bergo *et al.*, 2005), enquanto, em *Mentha citrata* Ehrh. (menta-do-
101 levante) o rendimento de óleo volátil não variou quando foram realizados seis, quatro e três
102 cortes durante o ano (May *et al.*, 2010). Em alecrim, são escassos os resultados de pesquisas
103 indicando o efeito do intervalo de tempo entre as colheitas na produção de fitomassa e no
104 rendimento de óleo volátil. Por ser o alecrim uma planta perene que pode ser submetida à
105 sucessivas coletas da parte aérea no decorrer do ano, essas informações são necessárias
106 para determinar a conveniência dessa prática em relação a uma única colheita anual.

107 O presente trabalho objetivou determinar o efeito da concentração de N e da
108 periodicidade de coletas na produção de fitomassa e óleo volátil durante o crescimento de
109 plantas de alecrim cultivadas fora do solo.

110

111

MATERIAL E MÉTODOS

112

113 O experimento foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade
114 Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul (Brasil), em estufa com 5m de largura e
115 23m de comprimento, com cobertura de polietileno aditivado anti-UV de 200 µm de
116 espessura, no período entre 26 de janeiro de 2013 e 26 de janeiro de 2014. A extração do
117 óleo volátil foi feita no laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do
118 Departamento de Biologia da UFSM.

119 Durante o período de crescimento e desenvolvimento das plantas entre 26 de janeiro
120 de 2013 e 26 de janeiro de 2014, a temperatura média do ar e a radiação solar global
121 acumulada foram coletadas diariamente por uma estação meteorológica automática
122 localizada a 300 metros da área experimental. Os valores médios para essas variáveis foram
123 em 2013 de 25,45°C e 171,194 MJ.m⁻² em janeiro; 24,15°C e 560,872 MJ.m⁻² em fevereiro;
124 21,08 °C e 483,984 MJ.m⁻² em março; 19,81°C e 434,742 MJ.m⁻² em abril; 15,85°C e 291,787
125 MJ.m² em maio; 13,87°C e 249,630 MJ.m⁻² em junho; 14, 36°C e 298,007 MJ.m⁻² em julho;
126 13,73°C e 387,972 MJ.m⁻² em agosto; 17,85°C e 519,137 MJ.m⁻² em setembro; 20,10°C e

127 635,189 MJ.m⁻² em outubro; 23,05°C e 718,866 MJ.m⁻² em novembro; 25,95°C e 815, 365
128 MJ.m⁻² em dezembro, e em janeiro de 2014 de 26,61°C e 636,055 MJ.m⁻².

129 As mudas foram obtidas em comércio local e empregaram-se vasos de polipropileno
130 de 3 dm³, preenchidos com areia lavada de granulometria entre 1 mm e 3 mm, sobre
131 bancadas de 0,80 m de altura formadas por telhas de fibrocimento de 1,10 m de largura e
132 3,6 m de comprimento e revestidas com lona de polipropileno. Os vasos foram dispostos em
133 quatro fileiras, com 0,3 m entre vasos e 0,27 m entre fileiras, na densidade de 12 vasos por
134 metro quadrado. A capacidade máxima de retenção de água da areia nos vasos foi de 0,238
135 L.dm⁻³. Em cada uma das bancadas foi instalado um reservatório de fibra de vidro com
136 capacidade de 500 L para estocagem da solução nutritiva que foi fornecida através de uma
137 bomba submersa acionada por um programador horário e conectada a fitas gotejadoras,
138 com um gotejador por vaso, na vazão média de 1,3 L.h⁻¹. Foi empregado um coeficiente de
139 drenagem não inferior a 30% em cada fertirrigação e a solução drenada foi recolhida e
140 retornada ao reservatório de origem, em sistema fechado.

141 Foram realizadas de uma a quatro fertirrigações diárias de forma a repor os volumes
142 de água transpirados pelas plantas, estimados conforme descrito por Pardossi *et al.* (2011).
143 O pH foi mantido entre 5,5 e 6,0, tolerando-se um desvio de 0,2 unidades, mediante adição
144 de NaOH ou H₂SO₄ na concentração 0,1 N, conforme a necessidade. A condutividade elétrica
145 de cada tratamento foi corrigida sempre que um desvio igual ou superior a 10% do valor de
146 referência foi constatado. As correções foram feitas mediante adição de água ou
147 fertilizantes, calculados a partir de uma relação linear previamente determinada entre a CE e
148 a quantidade total de sais dissolvidos. Não houve descarte de solução nutritiva durante todo
149 o período do experimento e o volume em cada reservatório foi mantido sempre superior a
150 250 L.

151 As concentrações de N total na solução nutritiva em mmol.L⁻¹ foram: 5.55, 8.05,
152 10.55, 13.05 e 15.55. As concentrações dos demais nutrientes em mmol.L⁻¹ foram iguais em
153 todos os tratamentos, de: 1,0 de H₂PO₄⁻; 4,0 de K⁺; 2,0 de Ca²⁺ e 1,0 de Mg²⁺. Os
154 micronutrientes foram fornecidos nas concentrações de, em mg.L⁻¹, 0,03 de Mo; 0,26 de B;
155 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn, através de uma solução estoque e o ferro fornecido
156 separadamente, na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ na forma quelatizada. A condutividade
157 elétrica (CE) de cada uma das soluções nutritivas foi de 0,93; 0,95; 0,97; 1,0 e 1,1 dS.m⁻¹,
158 respectivamente.

159 As plantas foram avaliadas quanto à produção de fitomassa e óleo volátil aos 90, 180,
160 270 e 365 dias após o plantio (DAP) e o número de coletas realizadas em cada planta
161 durante o período experimental variou de uma a quatro (C1, C2, C3 e C4). Em C4, a primeira
162 coleta foi feita em abril de 2013, aos 90 DAP, a parte aérea dessas plantas foram coletadas
163 mais três vezes durante o período experimental totalizando quatro coletas ao final do
164 experimento; em C3 a coleta ocorreu em julho de 2013, aos 180 DAP, essas plantas foram
165 coletadas mais duas vezes durante o período experimental totalizando três coletas ao final
166 do experimento; em C2 a coleta foi em outubro de 2013, aos 270 DAP, essas plantas foram
167 coletadas mais uma vez durante o período experimental totalizando duas coletas ao final do
168 experimento; em C1 a coleta foi em janeiro de 2014, aos 365 DAP, sem nenhuma coleta
169 anterior.

170 Foi utilizado o arranjo fatorial 5x4 em um delineamento inteiramente casualizado
171 com 44 plantas por parcela.

172 Em cada coleta todas as ramificações foram cortadas imediatamente após a terceira
173 gema axilar visível. As folhas foram separadas das hastes e a massa seca determinada após
174 secagem em estufa de circulação forçada de ar na temperatura de 60°C até alcançar massa
175 constante entre duas pesagens sucessivas.

176 Para a extração do óleo volátil, folhas de outras quatro plantas remanescentes foram
177 secas à sombra com temperatura ambiente durante cinco dias (Khordishi *et al.*, 2009). Após
178 esse período foi realizada a pesagem das folhas de cada planta, as quais foram misturadas e
179 separadas quatro amostras de 30 g para a extração do óleo volátil pelo método de
180 hidrodestilação em um aparelho de Clevenger, durante 3 horas, sendo o óleo seco em
181 sulfato de sódio anidro e armazenado a - 4 °C. O rendimento do óleo de cada coleta foi
182 calculado a partir de uma relação entre a massa de folhas da planta e a massa de óleo
183 volátil.

184 Assim, obteve-se massa seca das folhas e rendimento de óleo por planta nas idades
185 de 90, 180, 270 e 365 DAP. Ao final do experimento, os dados das quatro, três e duas coletas
186 foram somados para obter a produção acumulada de plantas submetidas a quatro, três e
187 duas coletas durante todo o período experimental e os dados da coleta realizada aos 365
188 DAP foram utilizados para os resultados de uma coleta durante o período.

189 Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as variáveis que
190 diferiram significativamente pelo teste F foram analisadas por regressão polinomial ao nível
191 de 5% de probabilidade de erro.

192

193

194

RESULTADOS E DISCUSSÃO

195

196 A análise da variância revelou que ocorreu interação da concentração de N na
197 solução nutritiva com a idade da planta (Figuras 1 e 2) e também com a periodicidade de
198 coletas (uma, duas, três e quatro coletas no período experimental) (Figuras 3 e 4).

199 A produção de fitomassa respondeu de forma polinomial à concentração de N nas
200 diferentes coletas (Figura 1). Entretanto, o efeito dessa concentração foi mais intenso nas
201 coletas efetuadas aos 270 e 365 DAP. Nesta última, a produção máxima de fitomassa foi
202 obtida na concentração de N de $9,40 \text{ mmol L}^{-1}$, com decréscimo de 12,6% na concentração
203 mais elevada. Efeito semelhante foi observado no rendimento de óleo volátil, com
204 decréscimo mais acentuado por efeito da concentração do N também aos 270 e 365 DAP. O
205 rendimento máximo de óleo foi obtido na concentração de N igual a $8,52 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 2).

206 A redução do crescimento da planta e, conseqüentemente, da produção de fitomassa
207 com o aumento da disponibilidade de N causa surpresa. Tem sido demonstrada na literatura
208 uma relação linear entre o crescimento da área foliar e a disponibilidade de N (Aêgren &
209 Franklin, 2003) e relações desse tipo têm servido de base para o emprego de soluções
210 nutritivas concentradas em N no cultivo de hortaliças folhosas em sistemas fora do solo
211 (Schmidt *et al.*, 2001). Nessas soluções, as concentrações de N são superiores a 14 mmol L^{-1} .
212 Nos resultados obtidos, o crescimento máximo das plantas de alecrim foi obtido na
213 concentração de N de $9,40 \text{ mmol L}^{-1}$, indicando que essa espécie é menos exigente e
214 também menos tolerante ao excesso de N que as hortaliças folhosas. Conclusão semelhante
215 foi apontada por Deschamps *et al.* (2012), os quais compararam a produção de fitomassa de
216 *M. piperita* em cultivo no solo com doses de N de 20; 30 e 40 kg.ha^{-1} e observaram que não
217 houve aumento da fitomassa e do rendimento de óleo volátil nas duas maiores doses. Em
218 *Pogostemon cablin* Benth. 30 kg.ha^{-1} de N no plantio é suficiente para maior
219 desenvolvimento vegetativo e produção de óleo volátil em comparação com as doses de,
220 60, 90 e 120 kg.ha^{-1} (Costa *et al.*, 2010).

221 Esse resultado contraria aqueles de May *et al.* (2010), os quais obtiveram aumento
222 da produção de biomassa de *M. citrata* cultivada no solo por efeito de doses de N de 11,0;
223 16,7 e 22,3 Kg ha⁻¹, mas, sem efeito no rendimento de óleo volátil e de Sifola & Barbieri,
224 (2006) em *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), no qual a adubação nitrogenada aumentou a
225 produção de fitomassa e o rendimento de óleo. Esses resultados contraditórios podem ser
226 atribuídos a diferenças na disponibilidade e na eficiência de uso do N nos diferentes
227 sistemas de produção.

228 Um dos efeitos indiretos do aumento da concentração de um ou mais nutrientes na
229 solução nutritiva é o aumento da condutividade elétrica (CE), a qual pode diminuir o
230 crescimento das plantas por efeito da salinidade (Shannon & Grieve, 1999). Entretanto, essa
231 hipótese não se aplica aos resultados obtidos, pois somente a concentração de N variou na
232 solução nutritiva, com efeito pequeno sobre a CE. Os valores de CE variaram entre 0,93 na
233 concentração mais baixa até 1,1 dS m⁻¹, na mais elevada, situando-se abaixo daqueles
234 consideradas limitantes para o crescimento de plantas sensíveis à salinidade (2.0 e 2.6 dS.m⁻¹)
235 ¹) (Andriolo *et al.*, 2005).

236 A poda verde é uma prática realizada durante o período de crescimento e
237 desenvolvimento da parte aérea de várias espécies de plantas cultivadas, com o objetivo
238 principal de modificar a partição da massa seca entre os órgãos da planta (Iqbal *et al.*,
239 2012). Uma consequência indireta dessa prática é a diminuição da idade fisiológica da área
240 foliar da planta. No presente trabalho, a idade fisiológica da área foliar que representa a
241 idade fisiológica média de todas as folhas existentes na planta decresceu com o número de
242 coletas, pois cada coleta foi seguida pela rebrota da parte aérea.

243 A produção máxima de fitomassa foi de 68,69 g, 53,60 g, 44,37 g e 17,13 g nas coletas
244 aos 365, 270, 180 e 90 DAP, respectivamente (Figura 1). O rendimento máximo de óleo foi
245 de 4,53 g.planta⁻¹, 3,61 g.planta⁻¹, 1,53 g.planta⁻¹ e 0,38 g.planta⁻¹ nas coletas aos 365, 270,
246 180 e 90 DAP, respectivamente (Figura 2). A produção de fitomassa acumulada nas quatro,
247 três, duas e uma coleta durante o período experimental foi de 11,25 g, 56,08 g, 59,35 g e
248 68,69 g, respectivamente (Figura 3). O rendimento de óleo acumulado de quatro coletas foi
249 de 1,19 g.planta⁻¹, de três coletas foi 0,9661 g.planta⁻¹, de duas coletas 2,74 g.planta⁻¹ e de
250 uma única coleta foi de de 4,53 g.planta⁻¹ (Figura 4). Como a produção de fitomassa e o
251 rendimento de óleo foram mais elevados na última coleta realizada aos 365 DAP, sugere-se
252 que a idade fisiológica das folhas afeta a produção de óleo do alecrim.

253 A concentração de óleo em mg.g^{-1} de fitomassa foi de: 22,18; 34,48; 67,35 e 65,94
254 em 90, 180, 270 e 365 DAP, respectivamente, enquanto, a concentração de óleo por grama
255 de fitomassa acumulada em quatro, três, duas e uma coleta foi, em mg.g^{-1} , respectivamente
256 de: 28,64; 17,22; 59,14 e 65,95.

257 Esses resultados mostram que o rendimento de óleo aumenta com a idade fisiológica
258 das folhas e evidenciam que a produção de óleo seria um processo fisiológico que
259 acompanha o crescimento e o envelhecimento da área foliar da planta. Isso também foi
260 observado em *O. basilicum*, por Silva et al. (2005), quando o maior rendimento de óleo
261 volátil ocorreu em plantas com 10 meses comparando-se com plantas que estavam com 5
262 meses de idade e, em *P. hispidinervum*, por Bergo et al. (2005) quando o rendimento de óleo
263 volátil foi maior quando se realizou apenas um corte no intervalo de 12 meses.

264 Os resultados indicam que para fins de cultivo do alecrim para produção de óleo
265 volátil deve-se maximizar a produção de fitomassa de folhas, a qual é favorecida realizando a
266 coleta um ano após o plantio das mudas. Essa conclusão confirma àquela de May et al.
267 (2010), os quais mostraram que intervalos entre cortes de até 120 dias permitem que a
268 planta fique mais alta e acumule maior quantidade de massa seca da parte aérea.
269 Entretanto, os resultados aqui obtidos indicam que esse intervalo pode ser ainda maior, até
270 365 dias. Por outro lado, a produção máxima de fitomassa e o rendimento de óleo obtidos
271 no presente trabalho foram inferiores àqueles apresentados por estudo de May et al. (2010)
272 em cultivo no solo no Estado de São Paulo. Provavelmente, as diferenças climáticas entre as
273 regiões também influenciam esses resultados. Com relação à disponibilidade de N, os
274 resultados do presente estudo indicam o emprego de concentrações reduzidas de N na
275 fertirrigação, em torno de $9,40 \text{ mmol L}^{-1}$, as quais maximizam a produção de fitomassa e
276 consequentemente o rendimento de óleo volátil.

277

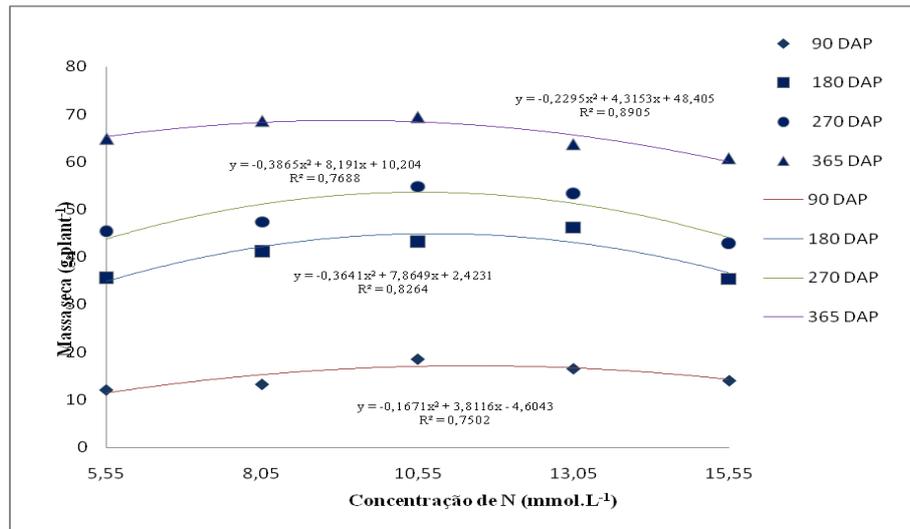
278

REFERÊNCIAS

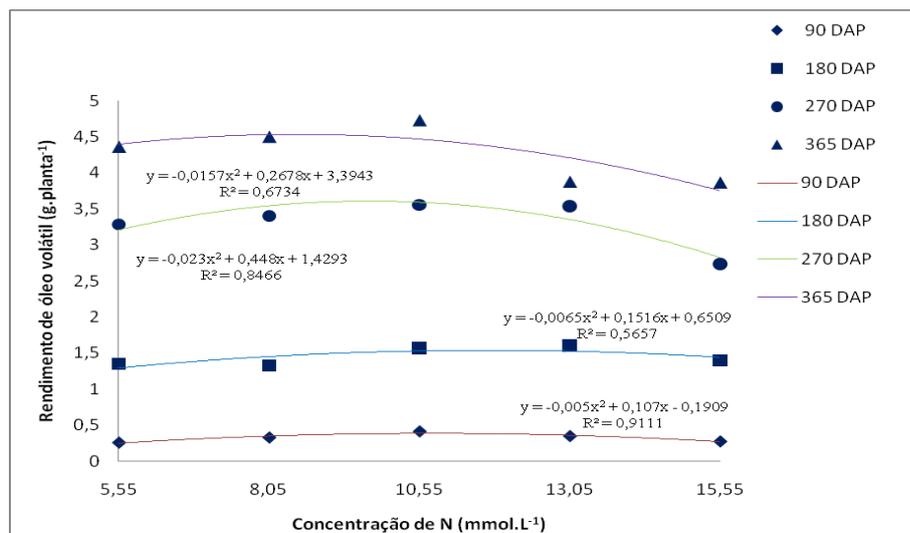
- 279
280
- 281 AÊGREN G I; FRANKLIN O. 2003. Root: Shoot Ratios, Optimization and Nitrogen
282 Productivity. *Annals of Botany* 92: 795-800.
- 283
- 284 AMARAL W; DESCHAMPS C; MACHADO MP; KOELER HS; SCHEER AP; CÔCCO LC. 2014.
285 Desenvolvimento da camomila, rendimento e qualidade do óleo volátil em diferentes
286 idades de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16(2): 237-242.
- 287
- 288 AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; FAVARETTO, N.; KOELER, H. S.; SHEER, A. P.; YAMAMOTO, C.;
289 CÔCCO, C. L. 2008. Desenvolvimento, rendimento e composição de óleo essencial de
290 camomila [Chamomila recutita (L.) Rauschert] sob adubação orgânica e mineral.
291 *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 10(4): 1-8.
- 292
- 293 ANDRIOLO JL; LUZ GL; WITTER MH, GODOI RS; BARROS GT, BORTOLOTTI, OC. 2005. Growth
294 and yield of lettuce plants under salinity. *Horticultura Brasileira* 23: 931-934.
- 295
- 296 BERGO C L; MENDONÇA H A; SILVA M R. 2005. Efeito da época e freqüência de corte de
297 pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo volátil. *Acta*
298 *Amazônica* 35(2): 111-117.
- 299
- 300 BERWICK, A. 1998. Os 24 óleos essenciais. In: _____. *Aromaterapia holística*. Rio de
301 Janeiro: Nova Era, p.166-169.
- 302
- 303 CASTRO HG; FERREIRA FA; MOSQUIM PR. 2004. *Contribuição ao estudo das plantas*
304 *mediciniais: Metabólitos secundários*. 2ª ed. Viçosa. 111p.
- 305
- 306 COSTA AG; FERRAZ EO; DESCHAMPS C; PINTO, JEBP. 2010. Desenvolvimento vegetativo do
307 patchouli após a aplicação de diferentes níveis de nitrogênio em plantio e pós-colheita.
308 *Horticultura Brasileira*, 28: S3428-S3433.
- 309

- 310 DESCHAMPS C; MONTEIRO R; MACHADO MP; BIZZO H; BIASI LA. 2012. Produção de
311 biomassa, teor e composição do óleo volátil de *Mentha piperita* L. em resposta a
312 fontes e doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 14(1): 12-17.
313
- 314 FERRARI GN; SUGUINO E; MARTINS AN; MELLO SC; MINAMI K. 2011. *Alecrim (Rosmarinus*
315 *officinalis* L.). Série Produtor Rural 49. Piracicaba: ESALQ- Divisão de Biblioteca. 33p.
316
- 317 GLYNN C, HERMS DA, ORIANIS CM, HANSEN RC, LARSSON S. 2007. Testing the growth-
318 differentiation balance hypothesis: dynamic responses of willows to nutrient
319 availability. *New Phytologist* 176: 623-634.
320
- 321 IQBAL N; MASOOD A; KHAN NA. 2012. Analyzing the significance of defoliation in growth,
322 photosynthetic compensation and source-sink relations. *Photosynthetica* 50(2): 161-
323 170.
324
- 325 LE BOT J; BÉNARD C; ROBIN C; BOURGAUD F; ADAMOWICZ S. 2009. The 'trade-off' between
326 synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by
327 nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency. *Journal of*
328 *Experimental Botany* 60: 4301-4314.
329
- 330 MARQUES VB; PAIVA HN; GOMES JM; NEVES JCL. 2006. Efeitos de fontes e doses de
331 nitrogênio no crescimento de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).
332 *Scientia Florestalis* 71: 77-85.
333
- 334 MARTINEZ HEP. 2005. *Hidroponia*. Viçosa: Editora Aprenda Fácil. 271p.
335
- 336 MARTINS ER; CASTRO DM ; CASTELLANI DC ; DIAS JE. 2000. *Plantas Mediciniais*. Viçosa : UFV.
337 220p.
338
- 339 MAY A; SUGUINO E; MARTINS A; PINHEIRO M. 2010. Produção de biomassa e óleo volátil de
340 *Mentha citrata* em função do manejo cultural e adubação nitrogenada. *Revista*
341 *Brasileira de Ciências Agrárias* 5(3): 370-375.

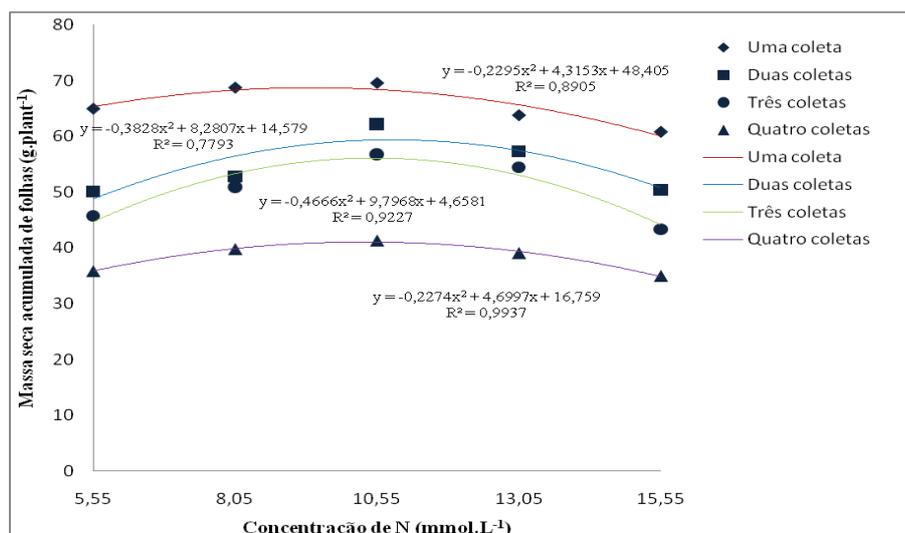
- 342 MAY A; SUGUINO E; MARTINS AN; BARATA LES; PINHEIRO MQ. 2010. Produção de biomassa
343 e óleo volátil de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo
344 entre cortes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12(2): 195-200.
- 345
- 346 PARDOSSI A; CARMASSI G; DIARA C; INCROCCI L; MAGGINI R; MASSA D. 2011. *Fertigation*
347 *and Substrate Management in Closed Soilless Culture*. University of Pisa, Dipartimento
348 di Biologia delle Piante Agrarie. 63p.
- 349
- 350 SCHMIDT D; SANTOS OS; BONNECARRERE RAG ; MARIANI OA ; MANFRON PA. 2001.
351 Desempenho de soluções nutritivas e cultivares de alface em hidroponia. *Horticultura*
352 *Brasileira* 19(2) : 122-126.
- 353
- 354 SHANNON MC ; GRIEVE CM. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia*
355 *Horticulturae* 78: 5-38.
- 356
- 357 SIFOLA MI; BARBIERI G. 2006. Growth, yield, and essential oil content of three cultivars of
358 basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae* 108:
359 408–413.
- 360
- 361 SILVA F; SANTOS RHS; ANDRADE NJ; BARBOSA JCA; CASALI VWD; LIMA RR; PASSARINHO
362 RVM. 2005. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage
363 period. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(4): 323-328.
- 364
- 365 SOUZA MAA; ARAÚJO OJL; FERREIRA MA; STARK EMLM; FERNANDES MS; SOUZA SR. 2007.
366 Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de
367 nitrogênio e fósforo. *Horticultura Brasileira* 25:041-048.
- 368
- 369



370
 371 Figura 1: Massa seca de folhas de plantas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com concentrações de
 372 N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ nas idades de 90, 180, 270 e 365 DAP. Santa Maria, RS,
 373 Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
 374 Figure 1: Dry mass of leaves of *Rosmarinus officinalis* plants grown with N concentrations of 5.55;
 375 8.05; 10.55; 13.05 and 15.55 mmol L⁻¹ at ages 90, 180, 270 and 365 DAP. Santa Maria, RS, Brazil,
 376 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
 377



378
 379 Figura 2: Rendimento de óleo volátil nas folhas de plantas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com
 380 concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ nas idades de 90, 180, 270 e 365
 381 DAP. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
 382 Figure 2: Yield volatile oil in the leaves of *Rosmarinus officinalis* plants cultured with concentrations
 383 of N 5.55; 8.05; 10.55; 13.05 and 15.55 mmol L⁻¹ at ages 90, 180, 270 and 365 DAP. Santa Maria, RS,
 384 Brazil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
 385



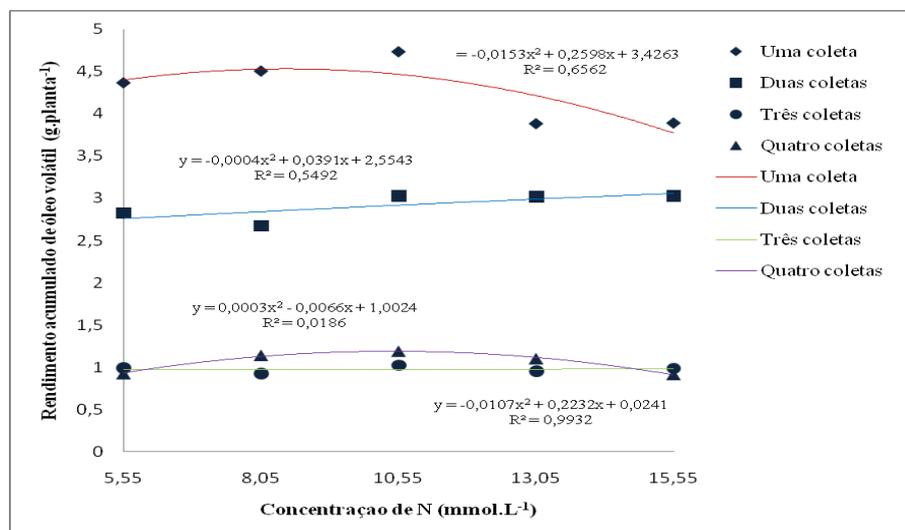
386

387 Figura 3: Massa seca acumulada de folhas de plantas de *Rosmarinus officinalis* cultivadas com
 388 concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ e submetidas a uma, duas, três e
 389 quatro coletas durante o período experimental. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de
 390 Santa Maria (UFSM).

391 Figure 3: Accumulated dry mass of leaves of *Rosmarinus officinalis* plants cultured with
 392 concentrations of N 5.55; 8.05; 10.55; 13.05 and 15.55 mmol L⁻¹ and subjected to one, two, three
 393 and four collections during the trial period. Santa Maria, RS, Brazil, Universidade Federal de Santa
 394 Maria (UFSM).

395

396



397

398 Figura 4: Rendimento acumulado de óleo volátil nas folhas de plantas de *Rosmarinus officinalis*
 399 cultivadas com concentrações de N de 5,55; 8,05; 10,55; 13,05 e 15,55 mmol L⁻¹ e submetidas a uma,
 400 duas, três e quatro coletas durante o período experimental. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade
 401 Federal de Santa Maria (UFSM).

402 Figure 4: Yield volatile oil accumulated in the leaves of *Rosmarinus officinalis* plants cultured with
 403 concentrations of N 5.55; 8.05; 10.55; 13.05 and 15.55 mmol L⁻¹ and subjected to one, two, three
 404 and four collections during the trial period. Santa Maria, RS, Brazil, Universidade Federal de Santa
 405 Maria (UFSM).

ARTIGO 3

Potencial antiproliferativo do óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivado em diferentes concentrações de solução nutritiva e doses de nitrogênio durante o crescimento da planta

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo avaliar a atividade antiproliferativa e a genotoxicidade do óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) em cultivo com diferentes concentrações de solução nutritiva, doses de nitrogênio (N) durante o crescimento da planta, bem como conhecer a composição química do óleo nessas situações. Foram cultivadas plantas de *R. officinalis* em diferentes concentrações de solução nutritiva (1, 2, 3, 4 e 5 dS.m⁻¹) com coletas aos 100 e aos 160 dias após o plantio (DAP), e em diferentes doses de N (5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹) com coletas aos 180 e aos 365 DAP. Foi realizada extração de óleo das folhas por hidrodestilação em Clevenger e posteriormente realizada cromatografia gasosa. O óleo volátil foi avaliado quanto ao efeito antiproliferativo e genotóxico em células de *Allium cepa* L., nas concentrações de 3 e 10% para óleo das plantas cultivadas nas diferentes concentrações de solução nutritiva coletadas aos 100 e aos 160 DAP e das plantas cultivadas em distintas doses de N coletadas aos 180 DAP e aos 365 DAP. Os controles negativo e positivo foram água destilada e glifosato 1,5%, respectivamente. Utilizaram-se grupos de quatro bulbos de *A. cepa*, que após enraizamento em água destilada, permaneceram 24 horas nos tratamentos. Após esse período, as raízes foram fixadas por 24 horas em fixador Carnoy. Foram preparadas lâminas pela técnica de esmagamento, observadas em microscópio óptico avaliando-se o índice mitótico e a presença de alterações cromossômicas. Os dados foram submetidos a análise da variância e comparados pelo teste Scott-Knott (p<0,05). O óleo volátil inibiu a proliferação celular em ambas as concentrações, sendo que a concentração de 10% apresentou maior efeito antiproliferativo e foi considerada genotóxica, sem ocorrer diferença desses efeitos entre o óleo obtido de plantas cultivadas nas diferentes concentrações de solução nutritiva, doses de N e idades fisiológicas da planta. Os compostos majoritários do óleo foram cânfora, 1.8 cioenol, α-pineno, β-myrceno e verbenona, além do composto β-pineno majoritário

apenas no óleo de plantas cultivadas nas concentrações de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹.

Palavras-chave: Planta aromática; Alterações cromossômicas; Índice mitótico; *Allium cepa* L.; Fertirrigação.

ABSTRACT: Antiproliferative potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil cultivated in different salinities and different nitrogen doses during the plant growth. The objective of this study was to evaluate the antiproliferative activity and the genotoxicity of volatile oil of *Rosmarinus officinalis* L. on greenhouse without soil with different concentrations of nutritious solution, nitrogen (N) during the growth of the plant. *R. officinalis* plants were cultivated in different concentrations of nutritious solution (1, 2, 3, 4 and 5 dS.m⁻¹) with harvests at 100 and 160 days after planting (DAP). In addition, plants were cultivated in different doses N (5:55, 8:05, 10:55, 13:05 and 15:55 mmol.L⁻¹) with harvests at 180 and 365 DAP. Extraction of oil from the leaves by hydrodistillation in Clevenger was performed and then performed gas chromatography. The volatile oil was evaluated for antiproliferative and genotoxic effects on cells of *Allium cepa* L. at concentrations of 3 and 10% for each of the concentrations of nutritious solution and N dose in two ages of plants. Negative control was distilled water and positive control was glyphosate 1.5%. Were used in groups of four *A. cepa* bulbs rooted in distilled water after rooting, were maintained for 24 hours on treatment. After, the roots were fixed for 24 hours in Carnoy and then the roots were collected and fixed in 3:1 Carnoy (ethanol: acetic acid) during 24 hours and afterwards were stored in 70% ethanol under refrigeration. Slides were prepared by squashing technique and they were analysed at optical microscope. Mitotic index was calculated and the presence of chromosomal changes was assessed. Data were subjected to analysis of variance and compared by Scott-Knott

($p < 0.05$). The volatile oil inhibited cell proliferation in both concentrations, whereas the concentration of 10% showed higher antiproliferative effect and was considered genotoxic. No difference was observed between the concentrations of nutritious solution and N doses used for the cultivation of rosemary and age of plant. The majority compounds camphor, 1.8 cineole, α -pinene, β -myrcene and verbenone, beyond of β -pinene compounds only controlling the oil crop plants in the concentrations of 8:05, 13:05 and 15:55 mmol.L^{-1} .

Keywords: Aromatic plant; Chromosomal changes; Mitotic index; *Allium cepa* L.; Fertirrigation.

INTRODUÇÃO

Rosmarinus officinalis L. (alecrim), espécie da família Lamiaceae, originária da região Mediterrânea (Ferrari *et al.*, 2011) tem importância econômica, principalmente devido a produção de óleo volátil utilizado pela indústria de cosméticos (Siani *et al.*, 2000). O óleo volátil da espécie tem potencial para ser utilizado amplamente como um antioxidante natural na industrialização de alimentos como o charque e produtos similares (Bertolin *et al.*, 2010), é considerado antisséptico, antifúngico, antibacteriano e é utilizado em massagens com fim revigorante e estimulante da circulação, aliviam sintomas de resfriados, dores reumáticas e musculares, diminuem a congestão nasal, acne, oleosidade do couro cabeludo e caspa (Lorenzi & Matos, 2008).

Estudos sugerem cautela na utilização de óleos voláteis devido a frequente toxicidade atribuída a essas substâncias (Simões & Spitzer, 2001). Então, devido ao intenso uso e ao efeito tóxico do óleo volátil de alecrim ser pouco conhecido, estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários e podem contribuir para

sua utilização segura e eficaz. Esses estudos podem ser realizados com ensaios biológicos como o teste de *Allium cepa* L., utilizado para avaliar o efeito de substâncias sobre o ciclo celular e material genético, que se destaca, entre outros, pelo baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (Teixeira *et al.*, 2003; Fachinetto *et al.*, 2007; Tedesco & Laughinghouse, 2012).

Por ser o óleo volátil de alecrim um metabólito secundário, fatores como variações da concentração salina do meio nutritivo (implica em mudanças na absorção de água e nutrientes) (Beltrão *et al.*, 1997), dose de Nitrogênio (N) (nutriente requerido em maior quantidade pela planta) e idade fisiológica das folhas podem alterar a sua produção quantitativamente e qualitativamente, podendo alterar seu efeito sobre organismos alvo (Castro *et al.* 2004). Então, é de fundamental importância conhecer a influência de fatores ambientais sobre o efeito do óleo volátil no ciclo celular e material genético.

Nesse cenário, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antiproliferativa e genotóxica do óleo volátil de *R. officinalis* em cultivo com diferentes concentrações de solução nutritiva, doses de N durante o crescimento da planta, bem como conhecer a composição química do óleo nessas situações.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do alecrim

As plantas de alecrim foram cultivadas em um abrigo de polietileno de 115 m², coberto com polietileno aditivado anti-UV de 200 µm de espessura, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil, no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013 (cultivo do alecrim em

diferentes concentrações de solução nutritiva) e no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014 (cultivo do alecrim em diferentes doses de Nitrogênio).

Foram utilizados vasos de polipropileno de 3 dm^3 , uma planta por vaso, sobre bancadas formadas por telhas de fibrocimento de 1,10 m de largura e 4 m de comprimento, revestidas por lona de polipropileno. Os vasos foram preenchidos com areia lavada de granulometria entre 1 mm e 3 mm. A capacidade máxima de retenção de água da areia nos vasos foi de $0,238 \text{ L.dm}^{-3}$. Os vasos foram colocados a 0,80 m de altura do solo, em quatro fileiras, com 0,3 m entre vasos e 0,27 m entre fileiras, na densidade de 12 vasos por metro quadrado. Em cada uma das bancadas foi instalado um reservatório de fibra de vidro com capacidade de 500 L para estocagem da solução nutritiva. O fornecimento de solução nutritiva foi feito através de uma bomba submersa conectada a fitas gotejadoras, com um gotejador por vaso, na vazão média de $1,3 \text{ L.h}^{-1}$, acionada por um programador horário. Foi empregado um coeficiente de drenagem não inferior a 30% em cada fertirrigação e a solução drenada foi recolhida e retornada ao reservatório de origem, em sistema fechado.

Foram feitas de uma a quatro fertirrigações diárias de forma a repor os volumes de água transpirados pelas plantas, estimada conforme descrito por Pardossi *et al.*, (2011). O pH foi mantido entre 5,5 e 6,0, tolerando-se um desvio de 0,2 unidades, mediante adição de NaOH ou H_2SO_4 na concentração 1N, conforme a necessidade. A condutividade elétrica de cada tratamento foi corrigida sempre que um desvio igual ou superior a 10% do valor de referência foi constatado. As correções foram feitas mediante adição de água ou fertilizantes, calculados a partir de uma relação linear previamente determinada entre a CE e a quantidade total de sais dissolvidos. Não houve descarte de solução nutritiva durante todo o período do experimento e o volume em cada reservatório foi mantido sempre superior a 250 L.

Cultivo do alecrim em diferentes concentrações de solução nutritiva

O plantio das mudas foi realizado no mês de agosto de 2012, com as mudas medindo aproximadamente 15 cm de comprimento e os torrões mantidos.

Foi ajustada uma solução nutritiva com concentração mediana de nitrogênio total, com a seguinte composição iônica, em mmol.L^{-1} : 11,02 de NO_3^- ; 2,32 de NH_4^+ ; 0,8 de H_2PO_4^- ; 6 de K^+ ; 1,75 de Ca^{2+} ; 1,25 de Mg^{2+} e 1,25 de SO_4^{2-} . Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações de, em mg.L^{-1} , 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn, através de uma solução estoque e o ferro fornecido separadamente, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes nitrato de potássio, fosfato monopotássico, nitrato de cálcio-Calcinit®, sulfato de magnésio e nitrato de amônio. As diferentes concentrações de solução nutritiva constituíram-se por concentrações múltiplas dessa solução, ajustadas mediante adição de água ou de quantidades adicionais de fertilizantes, de forma a obter condutividades elétricas (CE) em dS.m^{-1} de: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0.

Foram realizadas duas coletas das plantas, uma aos 100 dias após o plantio (DAP) e outra aos 160 DAP. Em cada coleta, as folhas de 10 plantas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente à sombra durante cinco dias para posterior extração do óleo volátil.

Cultivo do alecrim em diferentes doses de N

O plantio das mudas foi realizado no mês de janeiro de 2013, com as mudas medindo aproximadamente 15 cm de comprimento e os torrões mantidos.

Foi ajustada uma solução nutritiva, com a seguinte composição iônica, em mmol.L^{-1} : 5,19 de NO_3^- ; 0,36 de NH_4^+ ; 4 de H_2PO_4^- ; 6 de K^+ ; 4 de Ca^{2+} ; 2 de Mg^{2+} e 4

de SO_4^- . Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações de, em mg.L^{-1} , 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn, através de uma solução estoque e o ferro fornecido separadamente, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes: nitrato de potássio, nitrato de cálcio-Calclinit®, sulfato de magnésio, nitrato de amônio, sulfato de potássio e fosfato de amônio monobásico. As diferentes doses de N na solução nutritiva em mmol.L^{-1} foram: 5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55.

Foram realizadas duas coletas das plantas, uma aos 180 DAP e outra aos 365 DAP. Em cada coleta, as folhas de 4 plantas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente à sombra durante cinco dias para posterior extração do óleo volátil.

Extração do óleo volátil de alecrim

Para a extração do óleo volátil foram preparadas amostras compostas de 30g a partir das plantas coletadas, em quatro repetições (4 amostras de cada tratamento). A extração do óleo volátil das folhas foi realizada pelo método de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger durante 3 horas, sendo o óleo seco em sulfato de sódio anidro e armazenado a -4°C até a análise cromatográfica e avaliação do efeito sobre o ciclo celular e material genético de *A. Cepa*.

Análises cromatográficas do óleo volátil de alecrim

As análises cromatográficas foram realizadas para conhecimento da concentração dos compostos presentes no óleo volátil do alecrim cultivado nas diferentes concentrações de solução nutritiva com coletas aos 100 e aos 160 DAP e em diferentes doses de N com coletas aos 180 e 365 DAP.

Cromatografia Gasosa-Detector por Ionização em Chama (CG-DIC)

As análises cromatográficas (CG) foram realizadas utilizando um sistema Agilent Technologies 6890N GC-DIC, equipado com coluna capilar DB-5 (30 m x 0.25 mm; 0.25 mm de espessura do filme) e conectado a um detector FID. As temperaturas do detector e do injetor foram ajustadas para 280°C. O gás Hélio foi utilizado a uma taxa de fluxo de 1.3 mL.min⁻¹. O programa térmico foi de 50-300°C, a uma velocidade de 5°C.min⁻¹. Duplicatas das amostras foram processadas da mesma maneira. Concentrações relativas dos componentes foram calculados com base nas áreas dos picos de CG sem o uso de fatores de correção. O volume de injeção do óleo foi de 1 µL (Tzakou & Loukis, 2009; Verma *et al*, 2010).

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas com um sistema Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS operando no modo EI a 70 eV, equipado com um injetor de separação (250°C). A temperatura da linha de transferência foi de 280°C. Hélio foi usado como gás de arraste (1.3mL.min⁻¹) e as colunas capilares utilizadas foram uma 5MS HP (30 m x 0,25 mm; 0,25 mm de espessura do filme) e um Innowax HP (30 m x 0,32 mm, 0,50 mm de espessura do filme). O programa de temperatura foi o mesmo que o utilizado para as análises de CG. O volume injectado foi de 1 µl de óleo volátil.

Identificação dos componentes

A identificação dos componentes foi realizada com base no índice de retenção (IR), determinada com referência da série homóloga de n-alcanos, C₇-C₃₀, sob condições experimentais idênticas, comparando com a biblioteca espectros de

massa (NIST e Wiley), e com dados de espectros de massa da literatura (Adams, 1995). As quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base na área do pico da CG (resposta DIC).

Análise da genotoxicidade do óleo volátil de alecrim pelo teste de *A. cepa*

O óleo volátil utilizado no teste de *A. cepa* foi diluído em etanol, obtendo-se a concentração de 3% que é a concentração recomendada por Cunha *et al.* (2012) e a concentração de 10%, para avaliar o efeito do óleo volátil de alecrim em uma concentração superior a recomendada pela literatura.

O efeito do óleo volátil de alecrim sobre o ciclo celular de *A. cepa* foi avaliado utilizando-se 23 grupos de quatro bulbos de *A. cepa* para enraizar em água destilada, os quais constituíram 23 tratamentos com quatro repetições. Após 72 horas em água destilada, os bulbos foram transferidos para os tratamentos apresentados na Tabela 1. Esse procedimento foi realizado utilizando-se óleo volátil de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva coletadas aos 100 e 160 DAP, e em diferentes doses de N coletadas aos 180 e 365 DAP.

Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, água destilada e glifosato 1,5%, além de um controle em etanol, pois o óleo foi diluído em etanol para obtenção das concentrações de 3 e 10%.

Após 24 horas nos respectivos tratamentos, as raízes foram coletadas e fixadas em fixador Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas e em seguida transferidas para etanol 70% e armazenadas em geladeira até o preparo das lâminas.

TABELA 1: Tratamentos utilizados para avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de *Rosmarinus officinalis* pelo teste de *Allium cepa*. CE= Condutividade elétrica; DAP= Dias após o plantio.

Tratamentos referentes ao cultivo do alecrim em diferentes concentrações de solução nutritive	Tratamentos referentes ao cultivo do alecrim em diferentes doses de Nitrogênio
T1= Água destilada	T1= Água destilada
T2= Glifosato 1,5%	T2= Glifosato 1,5%
T3= Etanol	T3= Etanol
T4= Óleo 3% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T4= Óleo 3% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T5= Óleo 3% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T5= Óleo 3% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T6= Óleo 10% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T6= Óleo 10% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T7= Óleo 10% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T7= Óleo 10% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T8= Óleo 3% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T8= Óleo 3% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T9= Óleo 3% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T9= Óleo 3% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T10= Óleo 10% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T10= Óleo 10% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T11= Óleo 10% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T11= Óleo 10% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T12= Óleo 3% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T12= Óleo 3% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T13= Óleo 3% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T13= Óleo 3% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T14= Óleo 10% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T14= Óleo 10% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T15= Óleo 10% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T15= Óleo 10% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T16= Óleo 3% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T16= Óleo 3% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T17= Óleo 3% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T17= Óleo 3% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T18= Óleo 10% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T18= Óleo 10% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T19= Óleo 10% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T19= Óleo 10% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T20= Óleo 3% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T20= Óleo 3% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T21= Óleo 3% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T21= Óleo 3% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)
T22= Óleo 10% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	T22= Óleo 10% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)
T23= Óleo 10% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	T23= Óleo 10% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas comorceína acética 2% (Guerra & Souza, 2002), observadas e analisadas ao microscópio Leica® com o aumento de 40X. Foram contadas 500 células por bulbo realizando-se a contagem total de células em divisão e o número de alterações cromossômicas ocorridas em cada tratamento. Foi determinado o índice mitótico

(IM) a partir da divisão do número de células em divisão pelo número total de células observadas multiplicado por 100, obtendo-se o valor do IM em %.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não ocorreram diferenças entre o efeito do óleo volátil de alecrim oriundo das diferentes idades fisiológicas das plantas (coletas), diferentes concentrações de solução nutritiva e doses de N utilizadas para cultivo das plantas (Tabelas 2 e 3) com as mesmas tendências na composição química do óleo volátil, mantendo-se os mesmos compostos majoritários, cânfora, 1.8 cineol, α -pineno, β -myrceno e verbenona (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Apenas o composto β -pineno, nas concentrações de N de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹ nas coletas aos 180 DAP e a concentração de 13.05 na coleta aos 365 DAP, foi superior a 5%, enquanto nos demais casos a concentração desse composto foi inferior. Ainda, alguns compostos do óleo volátil de alecrim não ocorreram no óleo obtido de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva, como verbenona, pinocarvona e cedreno e que ocorreram no óleo de plantas cultivadas nas distintas concentrações de N (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Essa variabilidade observada em alguns compostos pode estar associada à nutrição da planta, já que esse é um fator que altera o metabolismo secundário vegetal (Martins *et al.*, 2000).

O óleo volátil obtido das folhas de alecrim ocasionou a redução na divisão celular nas concentrações de 3 e 10%. Isso indica efeito antiproliferativo tanto na concentração de 3%, que é a concentração recomendada para uso externo (Cunha *et al.*, 2012), quanto na concentração de 10% (Tabelas 2 e 3), corroborando com resultados observados por Stojanović-Radić *et al.* (2010), quando analisaram o efeito do óleo volátil de alecrim sobre células de raízes de *A. cepa*, bem como o observado em estudo com óleo de alecrim sobre a divisão celular de *Vicia faba* L. (Hamedo & Abdelmigid, 2009).

O efeito antiproliferativo foi superior na concentração de 10% (Tabelas 2 e 3), e com essa concentração foi observado um número maior de alterações cromossômicas (Tabelas 2 e 3) enfatizando que a toxicidade de óleos voláteis é dose dependente (Simões & Spitzer, 2001).

As alterações cromossômicas ocorreram em ambas as concentrações de óleo volátil, sendo que na concentração de 3% o número de alterações não diferiu dos resultados observados em água destilada, ao contrário do observado para a concentração de 10%, com diferença entre as alterações ocorridas nas duas concentrações do óleo. A concentração de 10% de óleo volátil diferiu do controle positivo em glifosato, o que indica potencial para genotoxicidade, no entanto, somente para a concentração de 10%, enquanto, na menor concentração estudada, apesar da ocorrência de alterações cromossômicas, a mesma não diferiu do controle em água destilada (Tabelas 2 e 3).

O óleo volátil de alecrim também foi considerado genotóxico em células de medula óssea de ratos na concentração de 2000 mg.kg⁻¹, tendo sido avaliadas também as concentrações de 300, 1000 mg.kg⁻¹, as quais não foram consideradas

genotóxicas (Maistro *et al.*, 2010), como o observado no presente trabalho quando a menor concentração não induziu genotoxicidade.

As alterações cromossômicas observadas no tratamento com óleo volátil de alecrim na concentração de 10% foram: micronúcleo, cromossomo perdido e pontes em anáfase e/ou telófase (Figuras 1a, 1b e 1c, respectivamente). Essas alterações podem indicar que essas células estão em processo de transformação maligna e podendo, portanto, funcionar como marcadores indicativos do grau de exposição do tecido a carcinogênicos (Andrade *et al.*, 2005).

O micronúcleo foi o tipo mais frequente de alteração após a exposição das células ao tratamento com óleo volátil de alecrim na concentração de 10%, considerada genotóxica. Um micronúcleo consiste em uma porção citoplasmática de cromatina de forma arredondada ou ovalada que se localiza próxima ao núcleo (Figura 1a). A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA após a ação de substâncias carcinogênicas quando as células estão em divisão (Stich & Rosin, 1983; Stich *et al.* 1984), sendo constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos (Beliën *et al.*, 1995) que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose (Stich & Rosin, 1983). Então, células micronucleadas podem refletir eventos genotóxicos, (Beliën *et al.*, 1995). O grande número de micronúcleos, na concentração de 10%, pode ter ocorrido devido a cromossomos perdidos e quebras de cromossomos/cromátides durante o processo de divisão celular, sendo indicadores de genotoxicidade.

Os resultados de inibição do ciclo celular e alterações cromossômicas podem estar relacionados aos compostos presentes no óleo volátil, sendo os majoritários: cânfora, 1.8 cineol, α -pineno, β -myrceno e verbenona, todos presentes nas diferentes concentrações de solução nutritiva nas coletas aos 100 e 160 DAP, e nas

diferentes concentrações de N nas coletas aos 180 e aos 365 DAP, além do composto β -pineno que nas concentrações de N de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹ nas coletas aos 180 DAP e a concentração de 13.05 na coleta aos 365 DAP foi superior a 5% (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Alguns compostos do óleo volátil de alecrim não ocorreram no óleo obtido de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva, como verbenena, pinocarvona e cedreno, mas ocorreram no óleo de plantas cultivadas nas concentrações de N (Tabelas 4, 5, 6 e 7). No entanto, esses compostos ocorreram em uma quantidade relativamente baixa e, como o efeito do óleo volátil de alecrim não variou em relação às condições de cultivo e idades fisiológicas das plantas, então, a ocorrência dos compostos não teria interferido no efeito do óleo sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*.

No óleo volátil das folhas de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva, coletadas aos 100 e aos 160 DAP, foram identificados, por CG, terpenos da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, de maneira que os monoterpenos apareceram em maior quantidade – 21 compostos em um total de 28 identificados. No óleo volátil das folhas de plantas cultivadas em diferentes concentrações de N, coletadas aos 180 e aos 365 DAP, foram identificados, 23 compostos monoterpenos em um total de 31 identificados.

TABELA 2: Média do índice mitótico (IM) de células de *Allium cepa*, tipos de alterações observadas em células de *Allium cepa* em 2000 células; porcentagem e média de alterações em cada tratamento (MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; PA/PT= ponte em anafase e/ou telófase; %A= porcentagem de alterações; MA= média de alterações). Alecrim cultivado em diferentes concentrações de solução nutritiva com coletas aos 100 e aos 160 DAP.

Tratamento	IM (%)	MN	CP	PA/PT	MA
Água destilada	6,32 ^a	0	0	1	0,25 ^c
Glifosato 1,5%	2,07 ^e	10	8	8	7,25 ^a
Etanol	4,65 ^b	2	0	3	1,25 ^c
Óleo 3% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,65 ^c	0	0	3	0,75 ^c
Óleo 3% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,45 ^c	2	1	2	1,25 ^c
Óleo 10% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	2,87 ^d	5	1	4	2,50 ^b
Óleo 10% (CE de 1 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	2,97 ^d	7	0	3	2,50 ^b
Óleo 3% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,60 ^c	1	1	3	1,25 ^c
Óleo 3% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,50 ^c	2	1	1	1,00 ^c
Óleo 10% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	2,92 ^d	4	2	3	2,25 ^b
Óleo 10% (CE de 2 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	2,95 ^d	6	2	2	2,50 ^b
Óleo 3% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,52 ^c	2	0	2	1,00 ^c
Óleo 3% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,37 ^c	1	2	0	0,75 ^c
Óleo 10% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	2,95 ^d	4	2	3	2,25 ^b
Óleo 10% (CE de 3 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,07 ^d	4	1	3	2,00 ^b
Óleo 3% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,70 ^c	1	0	2	0,75 ^c
Óleo 3% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,37 ^c	0	0	3	0,75 ^c
Óleo 10% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,10 ^d	4	1	3	2,00 ^b
Óleo 10% (CE de 4 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,05 ^d	4	1	4	2,25 ^b
Óleo 3% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	3,62 ^c	2	0	3	1,25 ^c
Óleo 3% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,55 ^c	1	0	3	1,00 ^c
Óleo 10% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /100 DAP)	2,95 ^d	5	0	2	1,75 ^b
Óleo 10% (CE de 5 dS.m ⁻¹ /160 DAP)	3,07 ^d	6	1	1	2,00 ^b
CV%	10.56	-	-	-	62.52

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro; Os dados entre parênteses se referem à concentração da solução nutritiva utilizada para o cultivo do alecrim, CE= Condutividade elétrica, DAP= Dias após o plantio.

TABELA 3: Média do índice mitótico (IM) de células de *Allium cepa*, tipos de alterações observadas em células de *Allium cepa* em 2000 células; porcentagem e média de alterações em cada tratamento (MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; PA/PT= ponte em anáfase e/ou telófase; %A= porcentagem de alterações; MA= média de alterações). Alecrim cultivado em diferentes doses de N com coletas aos 180 e aos 365 DAP.

Tratamento	IM (%)	MN	CP	PA/PT	MA
Água destilada	6,50 ^a	0	0	0	0 ^c
Glifosato 1,5%	2,10 ^d	10	6	17	8,25 ^a
Etanol	4,72 ^b	2	0	1	0,75 ^c
Óleo 3% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	3,30 ^c	2	0	2	1,00 ^c
Óleo 3% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	3,52 ^c	2	0	1	0,75 ^c
Óleo 10% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	2,30 ^d	5	0	4	2,00 ^b
Óleo 10% (5.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	2,37 ^d	6	1	3	2,50 ^b
Óleo 3% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	3,50 ^c	1	1	3	0,50 ^c
Óleo 3% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	3,55 ^c	0	0	2	1,00 ^c
Óleo 10% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	2,47 ^d	0	0	4	2,00 ^b
Óleo 10% (8.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	2,27 ^d	5	0	3	2,75 ^b
Óleo 3% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	3,52 ^c	7	1	3	1,25 ^c
Óleo 3% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	3,45 ^c	2	1	2	0,75 ^c
Óleo 10% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	2,37 ^d	3	0	0	3,50 ^b
Óleo 10% (10.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	2,16 ^d	6	2	6	2,25 ^b
Óleo 3% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	3,56 ^c	2	0	7	0,75 ^c
Óleo 3% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	3,40 ^c	2	0	1	1,25 ^c
Óleo 10% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	2,21 ^d	1	1	3	2,50 ^b
Óleo 10% (13.05 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	2,16 ^d	4	2	5	2,75 ^b
Óleo 3% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	3,56 ^c	0	0	3	0,75 ^c
Óleo 3% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	3,23 ^c	0	0	4	1,00 ^c
Óleo 10% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/180 DAP)	2,22 ^d	5	1	5	2,75 ^b
Óleo 10% (15.55 mmol.L ⁻¹ de N/365 DAP)	2,27 ^d	2	0	7	2,25 ^b
CV%	9,51	-	-	-	71,22

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro; Os dados entre parênteses se referem à dose de N utilizada para o cultivo do alecrim; DAP= Dias após o plantio.

TABELA 4: Composição química do óleo volátil das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 100 DAP, nas diferentes concentrações de solução nutritiva.

Compostos	IR ^a	IR ^b	T1	T2	T3	T4	T5
			%	%	%	%	%
α -pineno	936	939	9.82	8.91	10.35	9.97	8.96
α -cafeño	954	953	3.59	3.76	3.27	3.69	3.58
β -pineno	980	980	3.07	3.19	3.15	3.37	3.23
β -mirceno	991	991	8.64	8.52	7.53	8.61	8.59
α -felandreno	1003	1005	0.32	0.41	0.40	0.38	0.35
p-cimeno	1026	1026	0.71	0.73	0.85	0.79	0.70
1.8 cineol	1037	1033	16.11	16.22	16.27	16.38	17.09
Cânfora	1143	1143	23.13	22.97	22.95	23.04	23.16
δ -terpineno	1065	1062	1.37	1.26	1.31	1.40	1.38
Linalol	1098	1098	2.65	2.67	2.62	2.65	2.59
Isoboneol	1156	1156	3.86	3.81	3.78	3.89	3.85
Borneol	1165	1166	1.83	1.92	1.96	1.87	1.89
Mentol	1173	1173	0.98	1.09	1.05	0.99	0.97
Terpin-4-ol	1178	1177	0.45	0.43	0.51	0.45	0.56
Pinocarvona	1160	1162	1.18	1.15	1.19	1.12	1.18
Naftaleno	1178	1179	0.27	0.36	0.39	0.21	0.35
α -terpineol	1189	1189	2.05	1.86	2.09	1.98	1.92
piperitol <cis->	1195	1193	1.03	1.27	1.14	1.13	1.09
Verbenona	1205	1204	6.85	7.11	6.95	6.98	7.04
Pulegona	1237	1237	0.17	0.23	0.20	0.28	0.21
Eugenol	1356	1356	0.89	0.87	0.93	0.91	0.86
α -copaeno	1376	1376	0.15	0.19	0.12	0.12	0.11
Cariofileno	1417	1418	0.71	0.74	0.80	0.79	0.75
Aromadendreno	1440	1439	0.38	0.31	0.33	0.37	0.35
α -muuroleno	1498	1499	0.12	0.15	0.13	0.11	0.14
α -bisaboleno	1504	1504	0.58	0.56	0.64	0.47	0.51
α -cadideno	1538	1538	0.25	0.27	0.23	0.31	0.27
Óxido de cariofileno	1580	1581	1.57	1.69	1.55	1.58	1.38
Total identificado(%)			92.73	92.65	92.72	93.63	93.06

Proporções relativas dos constituintes do óleo volátil expersos em porcentagem. ^a Índices de retenção experimental (baseado nos homólogos de series n- alcanos C₇-C₃₀). ^b Índices de retenção índices a partir da literatura (ADAMS, 1995); T1, T2, T3, T4 e T5 = Condutividades elétricas de 1; 2; 3; 4 e 5 dS.m⁻¹, respectivamente. DAP= Dias após o plantio.

TABELA 5: Composição química do óleo volátil das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 160 DAP, nas diferentes concentrações de solução nutritiva.

Compostos	IR ^a	IR ^b	T1	T2	T3	T4	T5
			%	%	%	%	%
α -pineno	936	939	12.37	10.85	11.89	9.90	10.74
α -cafeno	954	953	3.89	4.81	4.87	3.98	5.06
β -pineno	980	980	2.91	3.56	2.95	3.47	3.58
β -mirceno	991	991	8.16	8.35	7.98	8.23	8.19
α -felandreno	1003	1005	0.27	0.22	0.25	0.28	0.25
p-cimeno	1026	1026	0.56	0.43	0.45	0.39	0.41
1.8 cineol	1037	1033	15.64	16.98	17.55	17.18	16.39
Cânfora	1143	1143	21.35	21.27	21.29	21.43	21.31
δ -terpineno	1065	1062	1.09	1.27	1.29	1.43	1.36
Linalol	1098	1098	2.51	2.58	2.49	2.53	2.59
Isoboneol	1156	1156	2.76	2.70	2.78	2.75	2.71
Borneol	1165	1166	1.87	1.81	1.79	1.83	1.80
Mentol	1173	1173	0.95	0.99	0.94	0.95	0.87
Terpin-4-ol	1178	1177	0.51	0.49	0.53	0.47	0.55
Pinocarvona	1160	1162	1.17	1.13	1.09	1.12	1.08
Naftaleno	1178	1179	0.32	0.30	0.37	0.31	0.42
α -terpineol	1189	1189	1.85	1.56	1.62	1.68	1.83
piperitol <cis->	1195	1193	0.96	0.93	0.90	0.98	0.91
Verbenona	1205	1204	7.23	7.19	7.15	7.26	7.20
Pulegona	1237	1237	0.16	0.16	0.17	0.15	0.12
Eugenol	1356	1356	0.65	0.70	0.83	0.81	0.68
α -copaeno	1376	1376	-	0.05	0.03	-	-
Cariofileno	1417	1418	1.36	1.39	1.41	1.28	1.30
Aromadendreno	1440	1439	0.44	0.51	0.53	0.47	0.45
α -muuroleno	1498	1499	0.09	0.05	0.08	0.09	0.04
α -bisaboleno	1504	1504	0.42	0.51	0.43	0.47	0.51
α -cadideno	1538	1538	0.19	0.27	0.31	0.28	0.24
Óxido de cariofileno	1580	1581	0.81	0.84	0.81	0.89	0.80
Total identificado (%)			90.49	91.90	92.78	90.61	91.39

Proporções relativas de constituintes do óleo volátil experssos em porcentagem. ^a Índices de retenção experimental (baseado nos homólogos de series n- alcanos C₇-C₃₀). ^b Índices de retenção índices a partir da literatura (ADAMS, 1995); T1, T2, T3, T4 e T5 = Condutividades elétricas de 1; 2; 3; 4 e 5 dS.m⁻¹, respectivamente. DAP= Dias após o plantio.

TABELA 6: Composição química do óleo volátil das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 180 DAP, nas diferentes concentrações de N na de solução nutritiva.

Compostos	IR ^a	IR ^b	T1	T2	T3	T4	T5
			%	%	%	%	%
α -pineno	937	939	9.83	10.24	10.07	8.69	9.95
α -cafeno	953	953	4.81	3.95	3.96	4.12	4.61
Verbenena	969	967	-	0.11	0.09	-	-
β -pineno	981	980	3.02	5.62	2.97	6.21	5.04
β -mirceno	997	991	8.67	7.81	9.16	8.45	9.01
α -terpinene	1009	1016	-	0.61	0.09	-	0.15
α -felandreno	1004	1005	0.19	0.36	0.18	0.27	0.30
p-cimeno	1023	1026	2.16	1.25	1.47	0.43	1.09
1.8 cineol	1035	1033	14.62	14.95	16.08	15.32	17.04
Cânfora	1147	1143	28.73	30.89	29.15	25.81	30.09
δ -terpineno	1061	1062	0.97	1.25	1.87	1.24	1.67
Linalol	1097	1098	1.81	2.67	1.96	3.01	1.83
Isoboneol	1159	1156	2.68	1.95	0.98	2.08	1.78
Pinorcavona	1163	1162	-	-	0.11	-	0.12
Borneol	1164	1166	1.53	2.09	1.85	2.15	1.86
Mentol	1171	1173	0.87	0.65	1.07	0.98	1.15
Terpin-4-ol	1177	1177	0.61	0.39	0.78	1.16	0.48
Naftaleno	1181	1179	0.30	0.27	0.43	0.19	0.56
α -terpineol	1185	1189	2.05	1.94	2.36	1.89	2.11
piperitol <cis->	1192	1193	0.26	0.20	0.19	0.36	0.25
Verbenona	1204	1204	8.03	7.54	9.05	8.61	7.98
Pulegona	1237	1237	-	-	0.09	0.03	-
Eugenol	1359	1356	0.72	0.49	0.94	0.73	0.64
Cedreno	1409	1411	0.07	1.11	1.98	0.15	0.06
α -copaeno	1376	1376	-	0.01	0.09	-	-
Cariofileno	1419	1418	1.16	0.98	1.25	2.04	1.04
Aromadendreno	1442	1439	0.37	0.49	0.31	0.18	0.17
α -muuroleno	1498	1499	0.01	0.08	0.04	-	0.01
α -bisaboleno	1504	1504	0.46	0.61	0.24	0.53	0.24
α -cadideno	1536	1538	0.13	-	-	0.09	0.05
Óxido de cariofileno	1581	1581	0.79	0.81	0.65	1.03	0.69
Total identificado(%)			94.85	99.32	99.46	95.75	99.97

Proporções relativas dos constituintes do óleo volátil expressos em porcentagem. ^a Índices de retenção experimental (baseado nos homólogos de series n- alcanos C₇-C₃₀). ^b Índices de retenção índices a partir da literatura (ADAMS, 1995); T1, T2, T3, T4 e T5 = Concentrações de N de 5.55; 8.05; 10.55; 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹, respectivamente. DAP= Dias após o plantio.

TABELA 7: Composição química do óleo volátil das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 365 DAP, nas diferentes concentrações de N na de solução nutritiva.

Compostos	IR ^a	IR ^b	T1	T2	T3	T4	T5
			%	%	%	%	%
α -pineno	937	939	9.61	10.15	10.12	9.34	9.78
α -cafeño	953	953	4.76	3.88	3.97	4.05	4.52
Verbenena	969	967	0.34	0.15	0.02	-	0.13
β -pineno	981	980	3.41	4.98	2.54	5.79	5.17
β -mirceno	997	991	8.92	7.36	9.34	8.29	8.94
α -terpinene	1009	1016	-	0.52	0.22	0.01	0.12
α -felandreno	1004	1005	0.23	0.32	0.17	0.25	0.29
p-cimeno	1023	1026	2.03	1.39	0.98	0.39	1.03
1.8 cineol	1035	1033	15.41	14.39	16.17	15.16	14.68
Cânfora	1147	1143	29.04	30.67	30.64	26.44	29.72
δ -terpineno	1061	1062	1.08	1.13	1.54	1.39	1.73
Linalol	1097	1098	2.15	2.48	2.56	2.54	2.14
Isoboneol	1159	1156	2.40	1.98	1.07	2.01	1.96
Pinocarvona	1163	1162	0.04	-	0.05	-	0.09
Borneol	1164	1166	1.38	1.87	1.90	2.19	1.80
Mentol	1171	1173	0.79	0.63	1.02	0.73	0.97
Terpin-4-ol	1177	1177	0.58	0.42	0.83	0.98	0.53
Naftaleno	1181	1179	0.19	0.28	0.41	0.24	0.49
α -terpineol	1185	1189	1.67	1.83	2.19	1.87	2.15
piperitol <cis->	1192	1193	0.15	0.27	0.12	0.31	0.18
Verbenona	1204	1204	7.96	7.81	8.96	8.67	7.76
Pulegona	1237	1237	0.05	-	0.01	-	-
Eugenol	1359	1356	0.61	0.45	0.95	0.49	0.60
Cedreno	1409	1411	0.05	0.16	0.13	-	-
α -copaeno	1376	1376	-	3.85	1.72	-	-
Cariofileno	1419	1418	1.09	1.03	1.19	1.87	0.97
Aromadendreno	1442	1439	0.51	0.52	0.23	0.09	0.18
α -muuroleno	1498	1499	-	0.03	-	-	0.05
α -bisaboleno	1504	1504	0.38	0.49	0.15	0.57	0.39
α -cadideno	1536	1538	0.07	0.02	0.17	0.11	-
Óxido de cariofileno	1581	1581	0.62	0.89	0.61	0.95	0.71
Total identificado(%)			94.90	99.95	99.98	94.73	97.08

Proporções relativas de constituintes do óleo volátil experssos em porcentagem. ^a Índices de retenção experimental (baseado nos homólogos de series n- alcanos C₇-C₃₀). ^b Índices de retenção índices a partir da literatura (ADAMS, 1995); T1, T2, T3, T4 e T5 = Concentrações de N de 5.55; 8.05; 10.55; 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹, respectivamente. DAP= Dias após o plantio.

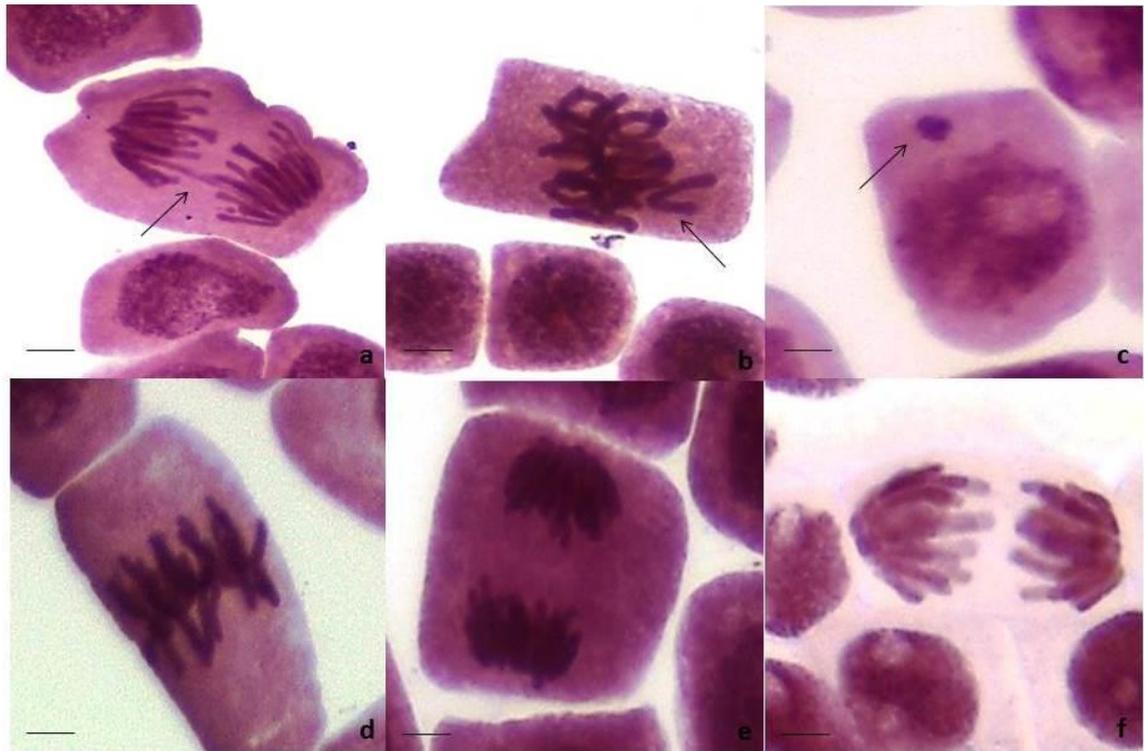


Figura 1: As setas em a b e c indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* 10%. As figuras d a f são células submetidas ao tratamento com óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* 3%. a) Célula em anáfase com ponte; b) Célula em metáfase com cromossomo perdido; c) Célula com micronúcleo; d) Célula em metáfase regular; e) Célula em telófase regular; f) Célula em anáfase regular. Escala de 10µm.

A variabilidade na concentração de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo volátil de alecrim, no presente estudo, pode ser explicada pelo metabolismo secundário ser resultado de interações complexas entre a biossíntese, o transporte, a estocagem e a degradação (Wink, 1990), de maneira que, segundo Santos (2001), parece que a produção desses metabólitos está associada ao grau de diferenciação e desenvolvimento de tecidos.

Os efeitos observados sobre as células de *A. cepa*, na maior concentração de óleo volátil de alecrim, podem ser devido ao sinergismo e/ ou antagonismo entre os compostos presentes no óleo, desde majoritários, até os compostos presentes em menor concentração (Tabelas 4, 5, 6 e 7), visto que a interação entre as diversas

substâncias químicas pode provocar sinergismo, adição ou efeitos antagônicos (Probst, 2012). Além disso, já se sabe que mesmo os terpenos tendo atividade terapêutica, em doses elevadas podem ser tóxicos (Simões & Spitzer, 2001).

São necessários estudos visando isolar e testar separadamente os compostos presentes no óleo volátil de *R. officinalis* (Tabelas 4, 5, 6 e 7), bem como avaliar a ocorrência de sinergismo e/ou antagonismo entre esses compostos. Isso pode auxiliar na descoberta de novos fármacos e até mesmo de substâncias a serem utilizadas como herbicidas naturais, o que poderá reduzir danos ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Illinois USA. 1995. 456p.
- ANDRADE, M.G.S. et al. Micronúcleo: Um Importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n.48, p. 137-141, 2005.
- BELIËN, J.Á.M. et al. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, v.16, n.10, p. 2395-4000, 1995
- BELTRÃO, J.; TRINDADE, D.; CORREIA, P.J. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. **Acta Horticulturae**, v.449, p.623-627, 1997.
- BERTOLIN, T.E. et al. Antioxidantes naturais na prevenção da oxidação lipídica em charque de carne ovina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.13, n.2, p. 83-90, 2010.
- CASTRO HG; FERREIRA FA; MOSQUIM PR. 2004. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2ª ed. Viçosa. 111p.
- CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2012. 729p.
- FACHINETTO, J. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 49-54, 2007.
- FERRARI, G.N. et al. **Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. Série Produtor Rural 49. Piracicaba: ESALQ- Divisão de Biblioteca, 2011. 33p.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec. 2002. 131 p.
- HAMEDO, H.A.; ABDELMIGID, H.M. Use of Antimicrobial and Genotoxicity Potentiality for Evaluation of Essential Oils as Food Preservatives. **The Open Biotechnology Journal**, v.3, p.50-56, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 544p.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa : UFV. 2000. 220p.
- MAISTRO, E.L. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.4, p.2113-2122, 2010.

PARDOSSI, A. et al. **Fertigation and Substrate Management in Closed Soilless Culture**. University of Pisa, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie. 2011. 64p.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração Biomoléculas – Estruturas e funções) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. ver. Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2001.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.70, p.38-43, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 397-426. 2001.

STICH, H.F.; ROSIN, M. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal Câncer**, v.31, n.3, p.305-308, 1983.

STICH, H.F.; ROSIN, M.; VALLEJERA, M.O. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosa cells in Asian betel nut and tobacco chewers. **Lancet**, v.1, p.1204-1206, 1984.

STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.). **Biologica Nyssana**, v.1, n.1-2, p.83-88, 2010.

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

TEIXEIRA, R.O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

TZAKOU, O.; LOUKIS, A. Chemical composition of the essential oil of *Achillea umbellata* growing in Greece. **Natural Product Research**, v.23, p.264-270, 2009.

VERMA, R.S. et al. Chemical investigation of the essential oil of *Thymus linearis* (Benth. ex Benth) from western Himalaya, India. **Natural Product Research**, v.24, p.1890-1896, 2010.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.D.; RHODES, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990. p. 23-41

ARTIGO 4

Atividade antiproliferativa e compostos fenólicos de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em cultivo com diferentes salinidades, concentrações de nitrogênio e idade da planta

RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e avaliar o efeito dos extratos sobre o ciclo celular e material genético de *Allium cepa* L., utilizando extratos de plantas cultivadas em diferentes salinidades e em diferentes concentrações de N na solução nutritiva durante o crescimento da planta. Os extratos foram preparados a partir de folhas de plantas cultivadas em diferentes salinidades coletadas aos 100 e aos 160 dias após o plantio (DAP) (os tratamentos constituíram-se dos extratos nas concentrações de 5, 20 e 50 g.L⁻¹ e os controles negativo em água destilada e controle positivo em glifosato 1,5%) e em diferentes concentrações de nitrogênio coletadas aos 180 e aos 365 DAP (os tratamentos constituíram-se dos extratos nas concentrações de 5 e 50 g.L⁻¹ e os controles negativo positivo). Esses extratos foram avaliados quanto ao efeito antiproliferativo e genotóxico sobre células de *A. cepa*, utilizando-se quatro bulbos de *A. cepa* por tratamento em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Os bulbos enraizados em água destilada permaneceram 24 horas nos tratamentos e, após, as raízes foram fixadas por 24 horas em fixador Carnoy e armazenadas em etanol 70%. As lâminas foram preparadas por esmagamento, observadas em microscópio óptico e avaliado-se o índice mitótico (IM) e a ocorrência de alterações cromossômicas (AC). Os dados foram comparados pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Ocorreu inibição

do IM e as AC não foram significativas nas concentrações de extratos estudadas, sem haver diferença desse efeito entre os extratos das distintas idades da planta, das salinidades e concentração de N na solução nutritiva utilizadas para o cultivo do alecrim. Os compostos fenólicos presentes nos extratos foram ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido carnósico, canferol, quercetina e rutina.

Palavras-chave: Planta medicinal; Alterações cromossômicas; Índice mitótico; *Allium cepa* L.

ABSTRACT: Antiproliferative activity and phenolic compounds of extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in cultivation different salinities, nitrogen concentrations and age of the plant. This study aimed to evaluate the effect of *Rosmarinus officinalis* L.(rosemary) extracts on the cell cycle of *Allium cepa* L., using rosemary extracts cultivated under different salinities and different N concentrations in the nutritious solution during plant growth. In addition, it was aimed to determine the phenolic compounds and the concentration of each by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The extracts were prepared from plants cultivated under different salinities collected at 100 and 160 days after planting DAP) (the treatments were extracts at 5, 20 and 50 g.L⁻¹ concentrations, and negative and positive controls were distilled water and glyphosate 1.5% respectively) and different nitrogen concentrations and collected at 180 to 365 DAP (the treatments were extracts at 5 and 50 g.L⁻¹ concentrations and the positive and negative controls). These extracts were evaluated for antiproliferative and genotoxic effect on *A. cepa* cells. Four bulbs of *A. cepa* per treatment were used in a completely randomized design. After, the roots were fixed for 24 hours in Carnoy and then the roots were collected and fixed in 3:1 Carnoy (ethanol: acetic acid) during 24 hours and afterwards were stored in 70%

ethanol under refrigeration. Slides were prepared by squashing technique and they were observed at optical microscope. Mitotic index (MI) was calculated, and the chromosomal changes (CC) occurrence was assessed. Data were compared by Scott-Knott (<0.05). MI was inhibited, and CC were no significant in the concentrations of extracts studied, no difference of this effect between extracts of different ages of plants and salinities and N concentration in the nutritious solution used for growing rosemary. The phenolic compounds present in the extracts were rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, carnosic acid, kaempferol, quercetin and rutin.

Keywords: Medicinal plant; Chromosomal changes; Mitotic index; *Allium cepa* L.

INTRODUÇÃO

Rosmarinus officinalis L., conhecida popularmente como alecrim, espécie medicinal e aromática, é originário da região Mediterrânea (Lorenzi & Matos, 2008). A espécie tem sido muito utilizada na indústria de alimentos devido às suas propriedades aromática, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Os extratos de alecrim podem conter compostos fenólicos dos grupos: diterpenos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos, destes, o ácido carnósico, o carnosol, os diterpenos e o ácido rosmarínico são os principais compostos antioxidantes presentes na espécie (Almela *et al.*, 2006). Nos extratos aquosos de *R. officinalis* cultivado em sistema protegido fora do sol ocorrem os compostos fenólicos ácido rosmarínico, ácido carnósico, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina, rutina e canferol (Frescura *et al.*, 2013).

O chá preparado por infusão na administração oral é diurético, colagogo, colerético, carminativo e anti-inflamatório intestinal, recomendado para o tratamento de cistite, enterocolite e hemorroidas inflamadas, apresenta propriedades espasmolítica sobre a vesícula e o duodeno, colerética, protetora hepática e antitumoral, além do uso tópico ser considerado cicatrizante, antimicrobiano e estimulante do couro cabeludo (Lorenzi & Matos, 2008).

É de grande importância conhecer o efeito dos extratos aquosos de *R. officinalis* sobre organismos alvo, pois são utilizados pela população na forma de chás (Martins *et al.*, 2000), e atualmente, têm grande aceitação como antioxidante na indústria alimentícia (Benzaquen, 2009). O efeito dos extratos pode ser avaliado pelo sistema teste de *Allium cepa* L., que é um bom indicador para primeiro screening de genotoxicidade dessas substâncias, pela confiabilidade, baixo custo e concordância com outros testes de genotoxicidade (Tedesco & Laughinghouse, 2012).

Além de conhecer o efeito dos extratos sobre organismos alvo, faz-se necessário o conhecimento do efeito dessas substâncias quando as plantas são oriundas de condições de cultivo distintas, pois para o cultivo do alecrim, não está estabelecido o cultivo que propicia melhor qualidade dos produtos finais da espécie e fatores abióticos, ontogenia e genética da planta, podem alterar a produção de metabólitos secundários (Castro *et al.* 2004).

Nesse sentido, o sistema de cultivo fora do solo, é uma alternativa para cultivo da espécie, utilizando-se solução nutritiva para fertirrigação, a qual deve conter todos os elementos absorvidos pelas raízes das plantas, além de determinar a composição do meio radicular (Andriolo, 1999). Na solução nutritiva um dos fatores que podem ser determinantes para a planta são a salinidade (concentração da

solução nutritiva), que leva a alterações fisiológicas (Beltrão *et al*, 1997), e a deficiência de nitrogênio (N), que causa inibição do crescimento (Floss, 2011). Esses, são fatores que, juntamente com a idade fisiológica da planta, podem influenciar a produção de metabólitos produzidos pela planta, podendo alterar o efeito dos extratos da espécie sobre organismos alvo (Gobbo Neto & Lopes, 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou determinar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de *R. officinalis* e avaliar o efeito dos extratos sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*, utilizando extratos plantas cultivadas em diferentes salinidades e em diferentes concentrações de N na solução nutritiva durante o crescimento da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de *Rosmarinus officinalis*

As plantas de *R. officinalis* foram cultivadas em um abrigo de polietileno de 115 m², coberto com polietileno aditivado anti-UV de 200 µm de espessura, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil, no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013 (cultivo do alecrim em diferentes salinidades) e no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014 (cultivo do alecrim em diferentes concentrações de N).

Empregaram-se vasos de polipropileno de 3 dm³, preenchidos com areia lavada de granulometria entre 1 mm e 3 mm, sobre bancadas formadas por telhas de fibrocimento de 1,10 m de largura e 4 m de comprimento e revestidas com lona de polipropileno. Esses vasos foram dispostos a 0,80 m de altura do solo, em quatro fileiras, com 0,3 m entre vasos e 0,27 m entre fileiras, na densidade de 12 vasos por metro quadrado. A capacidade máxima de retenção de água da areia nos vasos foi

de $0,238 \text{ L.dm}^{-3}$. Em cada uma das bancadas foi instalado um reservatório de fibra de vidro com capacidade de 500 L para estocagem da solução nutritiva que foi fornecida através de uma bomba submersa conectada a fitas gotejadoras, com um gotejador por vaso, na vazão média de $1,3 \text{ L.h}^{-1}$, acionada por um programador horário. Foi empregado um coeficiente de drenagem não inferior a 30% em cada fertirrigação e a solução drenada foi recolhida e retornada ao reservatório de origem, em sistema fechado.

Foram realizadas de uma a quatro fertirrigações diárias de forma a repor os volumes de água transpirados pelas plantas, estimada conforme Pardossi *et al.*, (2011). O pH foi mantido entre 5,5 e 6,0, tolerando-se um desvio de 0,2 unidades, mediante adição de NaOH ou H_2SO_4 na concentração 1N, conforme a necessidade. A condutividade elétrica de cada tratamento foi corrigida sempre que um desvio igual ou superior a 10% do valor de referência foi constatado. As correções foram feitas mediante adição de água ou fertilizantes, calculados a partir de uma relação linear previamente determinada entre a CE e a quantidade total de sais dissolvidos. Não houve descarte de solução nutritiva durante todo o período do experimento e o volume em cada reservatório foi mantido sempre superior a 250 L.

Cultivo de Rosmarinus officinalis em diferentes concentrações de solução nutritiva

O plantio das mudas ocorreu no mês de agosto de 2012, com mudas medindo aproximadamente 15 cm de comprimento e os torrões mantidos.

Foi ajustada uma solução nutritiva com concentração mediana de nitrogênio total, com a seguinte composição iônica, em mmol.L^{-1} : 11,02 de NO_3^- ; 2,32 de NH_4^+ ; 0,8 de H_2PO_4^- ; 6 de K^+ ; 1,75 de Ca^{2+} ; 1,25 de Mg^{2+} e 1,25 de SO_4^{2-} . Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações de, em mg.L^{-1} , 0,03 de Mo; 0,26

de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn, através de uma solução estoque e o ferro fornecido separadamente, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes nitrato de potássio, fosfato monopotássico, nitrato de cálcio-Calcinit®, sulfato de magnésio e nitrato de amônio. As diferentes concentrações de solução nutritiva constituíram-se por concentrações múltiplas dessa solução, ajustadas mediante adição de água ou de quantidades adicionais de fertilizantes, de forma a obter condutividades elétricas (CE) em dS.m^{-1} de: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0.

Cultivo de Rosmarinus officinalis em diferentes doses de N

O plantio das mudas ocorreu no mês de janeiro de 2013, com mudas medindo aproximadamente 15 cm de comprimento e os torrões mantidos.

Foi ajustada uma solução nutritiva, com a seguinte composição iônica, em mmol.L^{-1} : 5,19 de NO_3^- ; 0,36 de NH_4^+ ; 4 de H_2PO_4^- ; 6 de K^+ ; 4 de Ca^{2+} ; 2 de Mg^{2+} e 4 de SO_4^- . Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações de, em mg.L^{-1} , 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn, através de uma solução estoque e o ferro fornecido separadamente, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes: nitrato de potássio, nitrato de cálcio-Calcinit®, sulfato de magnésio, nitrato de amônio, sulfato de potássio e fosfato de amônio monobásico. As diferentes doses de N na solução nutritiva em mmol.L^{-1} foram: 5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55.

Coleta de *Rosmarinus officinalis*

Foram realizadas duas coletas de 10 plantas cultivadas em diferentes salinidades (uma aos 100 e outra aos 160 dias após o plantio (DAP)) e duas coletas

de 4 plantas cultivadas em diferentes concentrações de N (uma aos 180 e outra aos 365 DAP).

Em cada coleta, as folhas das plantas foram submetidas à secagem em temperatura ambiente à sombra durante cinco dias, para a redução da umidade das folhas. Em seguida foram preparadas 3 amostras compostas, a partir das folhas das plantas coletadas, para o preparo dos extratos aquosos.

Preparo dos extratos aquosos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do Departamento de Biologia da UFSM, por infusão das folhas secas, utilizando como líquido extrator a água destilada nas concentrações de 5, 20 e 50 g.L⁻¹ utilizando-se as plantas cultivadas em diferentes salinidades, e 5 e 50 g.L⁻¹ com as plantas cultivadas em diferentes concentrações de N.

As infusões foram obtidas fervendo-se água destilada a 100°C e vertendo-se essa água sobre o material vegetal picado para facilitar a ação da água. Após a mistura, o recipiente permaneceu tampado por 15 minutos (Martins *et al.*, 2000).

Esses extratos foram filtrados e, após atingir temperatura ambiente, foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjos de Diodo (CLAE-DAD) para identificação e quantificação dos compostos fenólicos, e utilizados para o teste de *A. cepa* para avaliação desses extratos sobre o ciclo celular e material genético de organismos alvo.

Análise do efeito dos extratos sobre o ciclo celular e material genético de *Allium cepa*

Foram realizados dois experimentos, no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do Departamento de Biologia da UFSM, um com os extratos das plantas cultivadas em diferentes salinidades (100 e 160 DAP) e outro com extratos das plantas cultivadas em diferentes concentrações de N na solução nutritiva (180 e 365 DAP).

Para o experimento realizado com as plantas cultivadas em diferentes salinidades foram utilizados controle negativo (água destilada) e controle positivo (glifosato 1,5%) e extratos nas concentrações de 5, 20 e 50 g.L⁻¹ preparados com as plantas cultivadas em 5 salinidades (CE de 1, 2, 3, 4 e 5 dS.m⁻¹) e coletadas aos 100 e 160 DAP. Já Para o experimento realizado com as plantas cultivadas em diferentes concentrações de N foram utilizados além dos controles, e extratos nas concentrações de 5 e 50 g.L⁻¹ preparados com as plantas cultivadas em 5 concentrações de N na solução nutritiva (5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹) e coletadas aos 180 e 365 DAP. Optou-se por utilizar as concentrações de extrato de 5 e 50 g.L⁻¹, pois no experimento com as plantas cultivadas em diferentes salinidades não ocorreu diferença significativa entre as concentrações de 20 e 50 g.L⁻¹ para as variáveis analisadas pelo teste de *A. cepa*.

Para avaliar o efeito dos extratos de *R.officinalis* sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa* foram colocados 32 grupos de quatro bulbos de *A. cepa* para enraizar em água destilada, os quais constituíram 32 tratamentos com quatro repetições para o experimento com as plantas cultivadas em diferentes salinidades. Enquanto para o experimento realizado com as plantas cultivadas em diferentes concentrações de N foram colocados 22 grupos de quatro bulbos de *A. cepa* para enraizar em água destilada.

Após 72 horas enraizando em água destilada, os bulbos foram transferidos para os respectivos tratamentos (Tabelas 1 e 2) onde permaneceram por 24 horas e após esse período, as raízes de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em fixador Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas, em seguida transferidas para etanol 70% e armazenadas em geladeira até o preparo das lâminas.

Foram preparadas lâminas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2% (Guerra & Souza, 2002), observadas e analisadas ao microscópio Leica® com o aumento de 40X. Foram contadas 1000 células por bulbo realizando-se a contagem total de células em divisão para calcular o índice mitótico (IM), além de ser calculado o número de alterações cromossômicas (AC) ocorridas em cada tratamento.

Análises cromatográficas dos extratos para quantificação de compostos fenólicos em *Rosmarinus officinalis*

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM.

Todos os produtos químicos foram de grau analítico. O metanol, ácido acético, ácido clorogénico e ácido cafeico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido rosmarínico, ácido carnósico, quercetina, rutina e canferol foram adquiridos da SigmaChemicalCo. (St. Louis, MO, EUA). As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) foram realizadas no sistema de CLAE (Shimadzu), com auto injetor (SIL-20A) equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) ligadas ao desgaseificador (DGU 20A5) com integrador (CBM 20A), detector UV/VIS por arranjo de diodos (SPD-M20A) e software LC solution SP1 1,22.

As análises foram realizadas em fase reversa sob condições de gradiente utilizando coluna C₁₈ (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5µm de diâmetro. Como fase móvel utilizou-se: água contendo ácido acético a 2% (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi: 5% de (B) durante 2 min, 25% (B) até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 min, seguindo o método descrito por Coelho *et al.* (2013), com modificações. Os extratos de fase móvel foram filtrados através de uma membrana de 0,45 µm (Millipore), e em seguida desgaseificada por banho de ultra-sons, antes de usar. O fluxo foi de 0,9 ml/min, volume de injeção de 50 µl e os comprimentos de onda foram de 285nm para o ácido carnósico, 325 nm para os ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico, e 365 nm para a quercetina, rutina e canferol.

As soluções padrões de referências foram preparadas na fase móvel de CLAE nas concentrações de 0,031-0,250 mg.ml⁻¹ para canferol, quercetina e rutina e 0,100-0,250 mg.ml⁻¹ para o ácido rosmarínico, ácido carnósico, ácido clorogênico e ácido cafeico.

Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do tempo de retenção e espectros de DAD (200 a 600 nm) com os padrões de referência. Curva de calibração para o ácido clorogênico: $Y = 12573x + 1206,5$ ($r = 0,9997$), ácido cafeico: $Y = 11872x + 1570,3$ ($r = 0,9996$), ácido rosmarínico: $Y = 13569x + 1344,9$ ($r = 0,9995$); ácido carnósico: $Y = 12278x + 1305,4$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 15983x - 1321,5$ ($r = 0,9998$), a quercetina: $Y = 16134x - 1422,6$ ($r = 0,9996$) e o canferol: $Y = 16423x - 1853,2$ ($r = 0,9998$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente.

Análise estatística

Os dados obtidos para os valores de índice mitótico e células com alterações cromossômicas foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que não houve diferença entre o efeito dos extratos obtidos de plantas cultivadas nas diferentes salinidades nas coletas aos 100 e aos 160 DAP (Tabela 1) e nas diferentes concentrações de N nas coletas aos 180 e aos 365 DAP (Tabela 2), tanto para a variável índice mitótico, quanto para as alterações cromossômicas.

De forma semelhante a *R.officinalis*, os extratos aquosos das espécies *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) (Dalla Nora *et al.*, 2010) e *Solidago microglossa* DC. (arnica) (Bagatini *et al.*, 2009) foram estudados pelo teste de *A. cepa* comparando-se plantas coletadas em ambientes distintos, e não apresentaram diferença no efeito dos extratos entre os locais de coleta. Além disso, as espécies *Bacharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle (carqueja) e *Bacharis articulata* (Lam.) Pers. (carquejinha) foram estudadas quanto ao efeito dos extratos oriundos de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, vegetativo e reprodutivo, as quais também não apresentaram diferença nos efeitos sobre células de *A. cepa* (Fachinetto & Tedesco, 2009).

Nas Tabelas 1 e 2, na comparação com o índice mitótico de *A. cepa* em água destilada, todos os tratamentos, incluindo o controle positivo em glifosato 1,5%, causaram inibição da divisão celular. Diferente do observado para as espécies,

também da família Lamiaceae, *Plectrantus barbatus* Andr. (boldo-da-terra) e *Plectrantus amboinicus* (Lour.) Spreng (boldo-miúdo) que induziram a divisão celular em *A. cepa* (Iganci *et al.*, 2006).

Independente da forma como as plantas foram cultivadas (diferentes salinidades ou concentração de N na solução nutritiva) e em qualquer uma das idades fisiológicas das plantas, os tratamentos com extratos de alecrim causaram inibição superior à inibição causada pelo glifosato 1,5% em todas as concentrações de extrato (Tabelas 1 e 2).

Os extratos das plantas cultivadas em diferentes salinidades nas concentrações de 20 e 50 g.L⁻¹ apresentaram maior inibição da divisão celular quando comparadas à concentração de 5 g.L⁻¹ e não diferiram entre si (Tabela 1). Os extratos das plantas cultivadas em diferentes concentrações de N foram estudados nas concentrações de 5 e 50 g.L⁻¹ e a maior concentração apresentou efeito antiproliferativo superior em relação a menor concentração (Tabela 2).

Foram observadas alterações cromossômicas nos distintos tratamentos, tais como: micronúcleo (Figura 1a), cromossomo perdido (Figuras 1b e 1c) e pontes em anáfase (Figuras 1d e 1e) ou telófase (Figura 1f); no entanto, o número de alterações causadas pelos extratos de alecrim não diferiu daquele observado em água destilada, e ambos diferiram do controle negativo em glifosato 1,5%. Assim, nas concentrações de extratos de *R. officinalis* estudadas, não ocorreu efeito genotóxico (Tabela 1).

Similarmente, os extratos das espécies *Mentha pulegium* L. nas concentrações de 5, 15 e 30 g.L⁻¹ (poejo) (Tedesco *et al.*, 2012) e *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) nas concentrações de 1,5 e 4,5% (Louvatel *et al.*, 2014), espécies da família Lamiaceae como *R. officinalis*, inibiram a divisão celular de *A.*

cepa, havendo maior inibição nas concentrações superiores estudadas e ausência de genotoxicidade nos extratos. Já, o extrato de *Hyssopus officinalis* L. (hissopo) na concentração de 3,5 g.L⁻¹, apresentou efeito antiproliferativo, porém, foi considerado genotóxico (Dragoeva *et al.*, 2010).

O efeito dos extratos de *R. officinalis* pode estar relacionado aos compostos fenólicos presentes nos extratos, já que as maiores concentrações dos extratos apresentaram maior concentração de compostos fenólicos e maior atividade antiproliferativa (Tabelas 1 a 4). Fachinetto *et al.* (2007), em estudo com *Achyrocline satureioides* DC. (macela), os quais verificaram o efeito antiproliferativo de extratos aquosos da espécie em células de *A. cepa*, e esses autores atribuíram tal efeito à atividade dos diferentes compostos químicos presentes nos extratos.

Dentre os compostos presentes nos extratos de *R. officinalis*, são citados como responsáveis pela atividade antioxidante os compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2011) e, foram identificados e quantificados nos extratos de *R. officinalis* os compostos fenólicos: ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido carnósico, canferol, quercetina e rutina, corroborando com o observado por Frescura *et al.* (2013) quando analisaram os compostos fenólicos em extratos aquosos de *R. officinalis* sob cultivo protegido fora do solo.

O ácido rosmarínico foi o composto observado na maior concentração nos extratos de alecrim (Figuras 2 a 7; Tabelas 3 e 4) e é de ampla ocorrência na família Lamiaceae, em *R. officinalis*, *Salvia officinalis* L. (sálvia), *M. officinalis* (erva-cidreira) e *Origanum vulgare* L. (orégano) (Simões *et al.*, 2001). Em estudo realizado por Del Baño *et al.* (2003), os extratos foram considerados antioxidantes e o composto com maior concentração também foi o ácido rosmarínico.

O ácido rosmarínico confere ação antioxidante ao extrato, reduzindo inúmeros eventos deletérios ao organismo, como formação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA (Izzo & Capasso, 2007; Ji & Zhang, 2008). O ácido rosmarínico, juntamente com o ácido clorogênico e outros derivados do ácido cafeico, têm sido estudados como possíveis marcadores taxonômicos na família Lamiaceae (Simões *et al.*, 2001).

O ácido carnósico foi considerado por Bernardes *et al.* (2010), juntamente com o carnosol, o princípio ativo responsável pela atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato das folhas de *R. officinalis*. Possui aplicação clínica para doenças que afetam a retina exterior, incluindo a degeneração macular relacionada à idade e retinose pigmentar, em que o estresse oxidativo é provavelmente um fator que contribui para a progressão da doença (Rezaie *et al.*, 2012).

A rutina melhora os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, sintomas de fragilidade capilar, como a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (Pathak *et al.*, 1991).

O canferol e a quercetina apresentam ação protetora contra hipertrofia pancreática e hiperplasia (Rawel *et al.*, 2002). A quercetina melhora a saúde cardiovascular, doenças oculares, doenças alérgicas, artrite, reduzindo o risco de câncer (Lakhanpal & Rai, 2007).

Não foram observadas diferenças no efeito sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa* entre as plantas de alecrim cultivadas em diferentes salinidades e concentrações de N e idades fisiológicas (Tabelas 1 e 2). Isso pode estar relacionado com os compostos fenólicos presentes nos extratos de *R. officinalis*, os quais foram os mesmos em todos os extratos (Figuras 2 a 7), e pode ter ocorrido o

sinergismo e/ou antagonismo entre os compostos fenólicos, ou entre eles e as demais substâncias não avaliadas, mas presentes (Probst, 2012).

A atividade antiproliferativa observada nos tratamentos com extratos de *R. officinalis* pode informar a respeito da capacidade de certas substância inibirem a proliferação de células cancerígenas, auxiliar na descoberta de novas substâncias para serem utilizadas como herbicidas naturais, como mecanismo menos prejudicial ao meio ambiente (Frescura, 2012), além de despertar interesse no uso para a produção de fármacos, já que nas concentrações estudadas não foi observado efeito genotóxico.

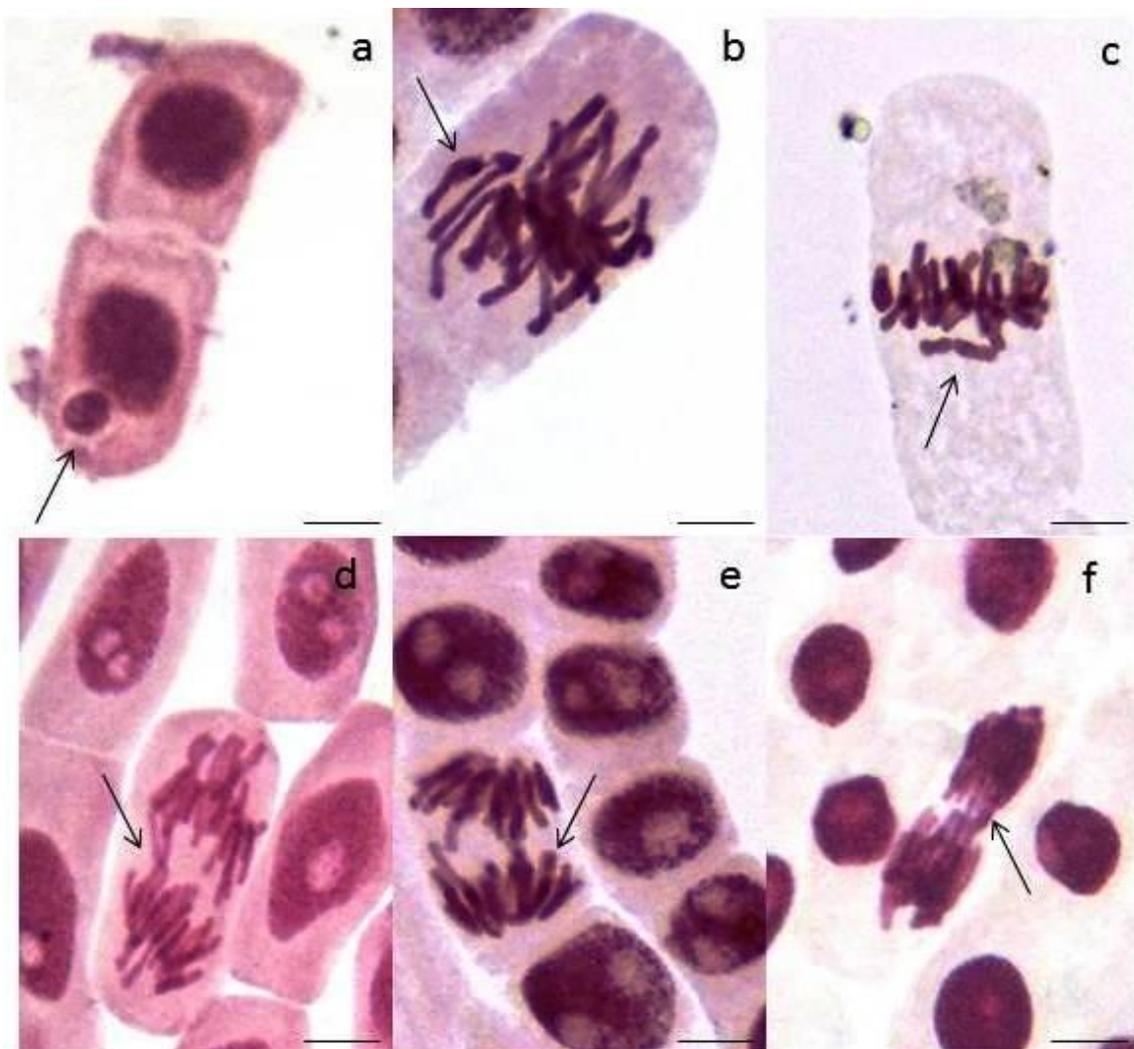


FIGURA 1: Alterações cromossômicas observadas nas células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com glifosato 1,5% (controle positivo), as setas indicam a alteração. a) célula em interfase com micronúcleo; b, c) células em metáfase com cromossomo perdido; d, e) células em anáfase com ponte; f) célula em telófase com ponte. Escala de 10 μ m.

TABELA 1: Média do índice mitótico (IM), média de alterações cromossômicas (AC) e os tipos de alterações (micronúcleo (MN), cromossomo perdido (CP) e ponte em anáfase (PA) ou ponte em telófase (PT)) observados em células de *A. cepa* nos diferentes tratamentos. Os dados entre parênteses referem-se à concentração de solução nutritiva e época de coleta do material vegetal para preparo dos extratos (C1=coleta aos 100 DAP e C2= 160 DAP).

TRATAMENTOS	IM (%)	AC	MN	CP	PA/PT
T1= água destilada	6,37 ^a	0,25 ^b	1	0	0
T2= Glifosato 1,5%	3,52 ^b	7,25 ^a	11	8	10
T3= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C1)	0,9 ^c	0,75 ^b	2	0	1
T4= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C1)	0,22 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T5= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C1)	0 ^d	0,5 ^b	1	0	1
T6= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C1)	1,07 ^c	0,5 ^b	1	0	1
T7= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C1)	0,17 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T8= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C1)	0,05 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T9= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C1)	1,17 ^c	0,75 ^b	2	0	1
T10= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C1)	0,12 ^d	0,5 ^b	1	0	1
T11= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C1)	0,07 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T12= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C1)	1,67 ^c	0,75 ^b	0	1	2
T13= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C1)	0,37 ^d	0,25 ^b	0	1	0
T14= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C1)	0 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T15= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C1)	1,42 ^c	0,5 ^b	1	0	1
T16= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C1)	0,35 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T17= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C1)	0,05 ^d	0,5 ^b	1	0	1
T18= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C2)	1,02 ^c	0,5 ^b	1	0	1
T19= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C2)	0,22 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T20= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 1 dS.m ⁻¹ /C2)	0,05 ^d	0,5 ^b	1	1	0
T21= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C2)	0,92 ^c	0,25 ^b	1	0	0
T22= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C2)	0,15 ^d	0,25 ^b	0	0	1
T23= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 2 dS.m ⁻¹ /C2)	0 ^d	0,5 ^b	2	0	0
T24= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C2)	1,12 ^c	0,5 ^b	0	0	2
T25= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C2)	0,15 ^d	0,25 ^b	0	0	1
T26= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 3 dS.m ⁻¹ /C2)	0,07 ^d	0,75 ^b	2	0	1
T27= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C2)	1,07 ^c	0,25 ^b	1	0	0
T28= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C2)	0,17 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T29= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 4 dS.m ⁻¹ /C2)	0,05 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T30= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C2)	1,17 ^c	0,75 ^b	2	0	1
T31= Alecrim 20 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C2)	0,20 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T32= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (CE de 5 dS.m ⁻¹ /C2)	0,05 ^d	0,5 ^b	2	0	0
CV (%)	74,66	108,41	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

TABELA 2: Média do índice mitótico (IM), média de alterações cromossômicas (AC) e os tipos de alterações (micronúcleo (MN), cromossomo perdido (CP) e ponte em anáfase (PA) ou ponte em telófase (PT)) observados em células de *A. cepa* nos diferentes tratamentos. Os dados entre parênteses referem-se à concentração de N na solução nutritiva e época de coleta do material vegetal para preparo dos extratos, onde C1 se refere aos 180 DAP e C2 aos 365 DAP.

TRATAMENTOS	IM (%)	AC	MN	CP	PA/PT
T1= água destilada	5,50 ^a	0 ^b	0	0	0
T2= Glifosato 1,5%	2,91 ^b	4,25 ^a	8	4	5
T3= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (5.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,97 ^c	1,00 ^b	4	0	0
T4= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (5.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,21 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T5= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (8.05mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,95 ^c	0,75 ^b	2	0	1
T6= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (8.05mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,13 ^d	0,25 ^b	0	1	0
T7= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (10.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	1,02 ^c	1,25 ^b	3	0	1
T8= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (10.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,13 ^d	0,50 ^b	0	1	1
T9= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (13.05mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,97 ^c	1,00 ^b	2	0	2
T10= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (13.05mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,31 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T11= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (15.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	1,02 ^c	1,00 ^b	1	1	1
T12= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (15.55mmol.L ⁻¹ de N/C1)	0,11 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T13= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (5.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,95 ^c	1,25 ^b	3	1	2
T14= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (5.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,07 ^d	0 ^b	0	0	0
T15= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (8.05mmol.L ⁻¹ de N/C2)	1,06 ^c	1,00 ^b	4	0	0
T16= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (8.05mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,10 ^d	0,50 ^b	1	0	1
T17= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (10.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	1,10 ^c	0,75 ^b	0	1	2
T18= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (10.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,05 ^d	0,25 ^b	1	0	0
T19= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (13.05mmol.L ⁻¹ de N/C2)	1,08 ^c	1,00 ^b	2	1	1
T20= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (13.05mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,06 ^d	0 ^b	0	0	0
T21= Alecrim 5 g.L ⁻¹ (15.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,96 ^c	1,00 ^b	2	0	2
T22= Alecrim 50 g.L ⁻¹ (15.55mmol.L ⁻¹ de N/C2)	0,02 ^d	0,50 ^b	1	1	0
CV (%)	21,46	106,26	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

TABELA 3: Concentração de compostos fenólicos, em mg.g⁻¹, nos extratos de *Rosmarinus officinalis* nas diferentes salinidades aos 100 e aos 160 DAP.

Solução nutritiva com salinidade de 1 dS.m ⁻¹						
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L ⁻¹		Extrato 20 g.L ⁻¹		Extrato 50 g.L ⁻¹	
	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP
Ácido Rosmarínico	6,74	6,78	29,91	27,86	41,69	40,66
Ácido Clorogênico	2,18	2,31	8,68	8,83	19,88	20,80
Ácido Carnósico	2,03	1,97	7,53	7,48	18,69	18,18
Ácido Cafeico	1,45	1,42	5,94	5,89	13,39	13,13
Canferol	0,82	0,83	4,94	3,82	7,55	7,55
Quercetina	1,69	1,61	5,16	5,14	16,08	14,82
Rutina	0,80	0,73	3,12	5,01	7,84	6,75
Solução nutritiva com salinidade de 2 dS.m ⁻¹						
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L ⁻¹		Extrato 20 g.L ⁻¹		Extrato 50 g.L ⁻¹	
	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP
Ácido Rosmarínico	6,54	6,32	28,96	26,31	40,19	36,88
Ácido Clorogênico	2,13	2,38	8,55	8,08	19,76	21,65
Ácido Carnósico	2,01	1,78	7,76	7,09	18,77	16,21
Ácido Cafeico	1,54	1,45	5,22	5,06	13,86	13,19
Canferol	0,74	0,71	4,64	2,76	7,32	6,47
Quercetina	1,82	1,62	5,35	5,18	17,29	14,79
Rutina	0,66	0,82	4,92	5,06	6,30	7,47
Solução nutritiva com salinidade de 3 dS.m ⁻¹						
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L ⁻¹		Extrato 20 g.L ⁻¹		Extrato 50 g.L ⁻¹	
	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP
Ácido Rosmarínico	6,92	5,99	29,27	26,30	42,31	33,90
Ácido Clorogênico	1,93	2,30	8,34	8,45	17,98	21,27
Ácido Carnósico	1,65	1,83	5,06	5,09	15,19	17,01
Ácido Cafeico	0,90	1,33	4,80	4,87	8,56	12,63
Canferol	0,73	0,61	2,29	2,40	7,21	5,85
Quercetina	1,53	1,45	4,93	5,21	14,55	13,19
Rutina	1,46	0,73	5,04	5,71	13,37	7,00
Solução nutritiva com salinidade de 4 dS.m ⁻¹						
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L ⁻¹		Extrato 20 g.L ⁻¹		Extrato 50 g.L ⁻¹	
	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP
Ácido Rosmarínico	6,41	6,08	30,63	29,52	38,45	34,83
Ácido Clorogênico	2,21	2,48	8,30	9,11	20,25	22,61
Ácido Carnósico	0,81	1,85	3,93	5,55	7,49	17,03
Ácido Cafeico	2,28	2,49	8,41	7,66	20,55	22,41
Canferol	0,64	0,53	1,20	5,03	6,36	4,77
Quercetina	1,51	1,31	4,68	5,79	14,40	11,85
Rutina	2,08	1,94	8,28	7,35	18,78	17,46
Solução nutritiva com salinidade de 5 dS.m ⁻¹						
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L ⁻¹		Extrato 20 g.L ⁻¹		Extrato 50 g.L ⁻¹	
	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP	100 DAP	160 DAP
Ácido Rosmarínico	5,83	5,98	30,30	30,29	35,96	33,82
Ácido Clorogênico	2,30	3,61	8,20	8,43	21,31	32,45
Ácido Carnósico	2,12	2,58	7,8	6,02	19,11	23,22
Ácido Cafeico	1,74	2,41	6,67	6,01	15,89	21,75
Canferol	1,52	2,17	4,87	5,43	14,92	18,44
Quercetina	0,78	1,88	3,62	5,56	7,63	17,12
Rutina	0,35	2,23	2,18	6,19	4,55	20,13

TABELA 4: Concentração de compostos fenólicos, em mg.g^{-1} , nos extratos de *Rosmarinus officinalis* nas diferentes concentrações de N solução nutritiva aos 180 DAP e aos 365 DAP.

Solução nutritiva com 5.55 mmol.L^{-1} de N				
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L^{-1}		Extrato 50 g.L^{-1}	
	180 DAP	365 DAP	180 DAP	365 DAP
Ácido Rosmarínico	7,17	6,28	28,68	25,12
Ácido Clorogênico	3,75	3,52	15,10	13,97
Ácido Carnósico	3,12	2,16	12,52	8,24
Ácido Cafeico	1,28	1,97	4,86	7,95
Canferol	1,18	2,11	4,33	8,02
Quercetina	2,00	1,97	8,12	7,83
Rutina	1,59	1,14	6,35	4,51
Solução nutritiva com 8.05 mmol.L^{-1} de N				
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L^{-1}		Extrato 50 g.L^{-1}	
	180 DAP	365 DAP	180 DAP	365 DAP
Ácido Rosmarínico	6,59	6,75	26,48	26,95
Ácido Clorogênico	3,23	3,61	12,97	14,40
Ácido Carnósico	2,18	2,14	8,72	8,50
Ácido Cafeico	0,50	1,35	2,03	5,30
Canferol	1,77	0,61	7,06	2,22
Quercetina	1,07	1,75	4,32	6,99
Rutina	1,05	1,76	4,24	7,02
Solução nutritiva com $10.55 \text{ mmol.L}^{-1}$ de N				
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L^{-1}		Extrato 50 g.L^{-1}	
	180 DAP	365 DAP	180 DAP	365 DAP
Ácido Rosmarínico	6,73	6,46	27,07	25,81
Ácido Clorogênico	3,41	2,34	13,65	9,60
Ácido Carnósico	2,22	2,34	8,89	9,38
Ácido Cafeico	0,53	1,73	2,00	6,96
Canferol	0,64	1,76	2,56	7,03
Quercetina	1,45	1,31	5,81	5,26
Rutina	1,50	1,75	6,03	7,00
Solução nutritiva com $13.05 \text{ mmol.L}^{-1}$ de N				
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L^{-1}		Extrato 50 g.L^{-1}	
	180 DAP	365 DAP	180 DAP	365 DAP
Ácido Rosmarínico	6,11	5,38	24,47	21,55
Ácido Clorogênico	2,67	2,48	10,71	9,99
Ácido Carnósico	2,16	2,08	8,61	8,40
Ácido Cafeico	0,90	1,20	3,60	4,80
Canferol	1,30	0,46	5,21	1,85
Quercetina	2,12	1,34	8,47	5,37
Rutina	2,62	1,91	10,49	7,68
Solução nutritiva com $15.55 \text{ mmol.L}^{-1}$ de N				
Compostos fenólicos	Extrato 5 g.L^{-1}		Extrato 50 g.L^{-1}	
	180 DAP	365 DAP	180 DAP	365 DAP
Ácido Rosmarínico	6,27	5,31	25,11	21,26
Ácido Clorogênico	2,87	2,74	11,51	10,97
Ácido Carnósico	2,04	2,11	8,24	8,44
Ácido Cafeico	1,04	2,00	4,17	8,00
Canferol	1,23	2,08	4,91	8,04
Quercetina	1,26	1,37	5,03	5,44
Rutina	1,96	1,38	8,01	5,68

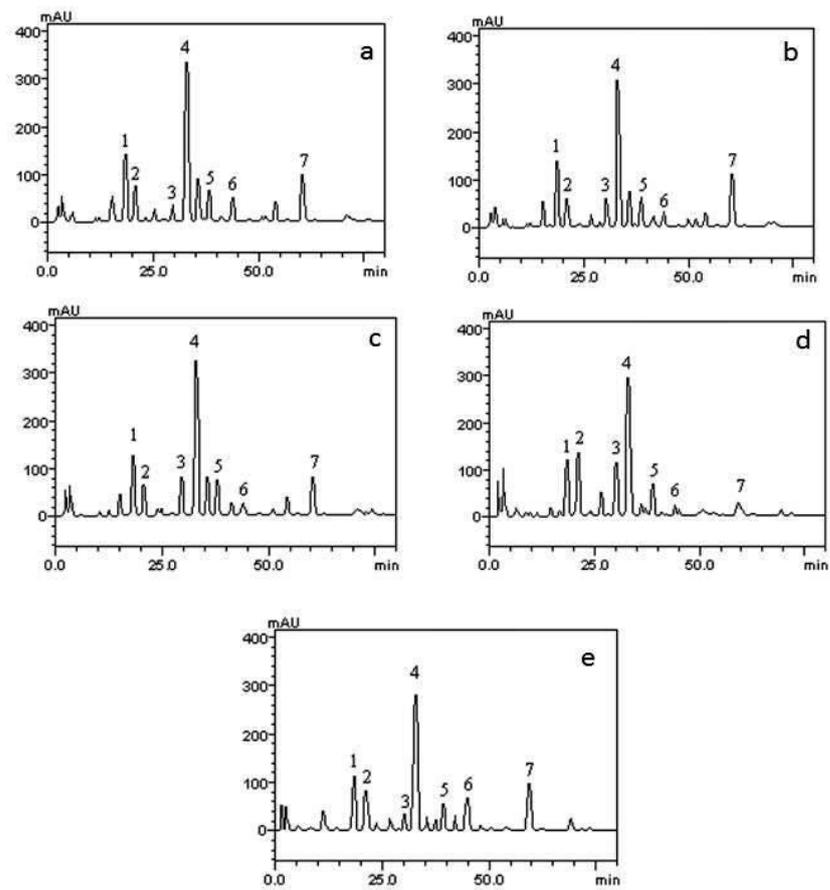


FIGURA 2: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 20 g.L^{-1} , coleta realizada aos 100 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a quercetina (pico 5), canferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). Diferentes concentrações de solução nutritiva: a) $T1= 1 \text{ dS.m}^{-1}$; b) $T2= 2 \text{ dS.m}^{-1}$; c) $T3= 3 \text{ dS.m}^{-1}$; d) $T4= 4 \text{ dS.m}^{-1}$; e) $T5= 5 \text{ dS.m}^{-1}$.

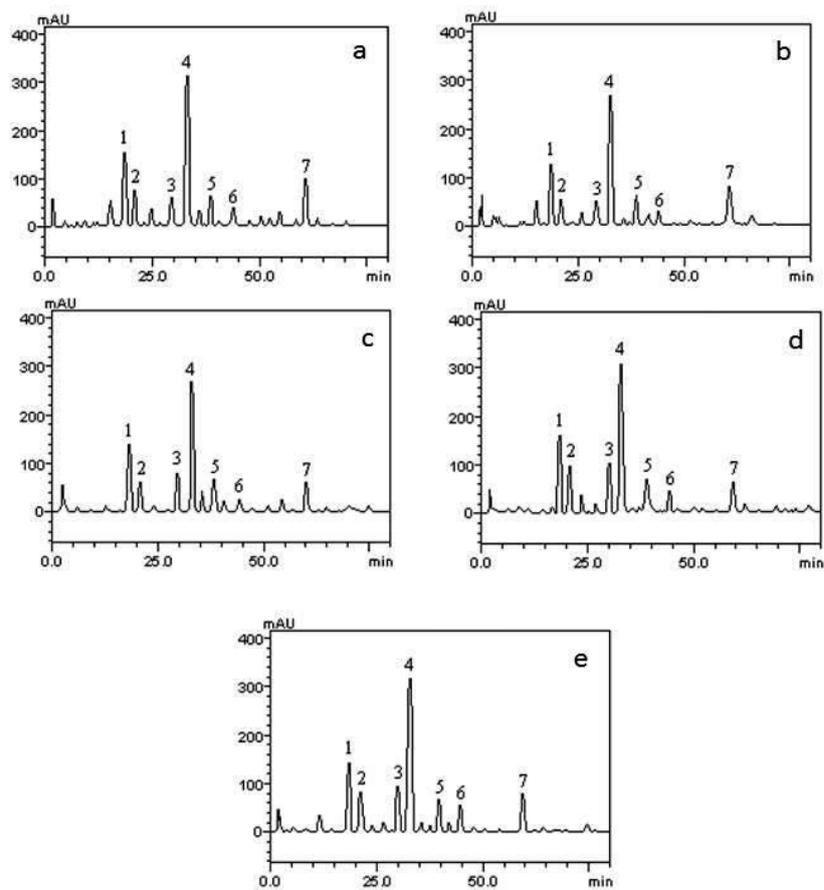


FIGURA 3: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 20 g.L^{-1} , coleta realizada aos 160 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a quercetina (pico 5), canferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). Diferentes concentrações de solução nutritiva: a) $T1= 1 \text{ dS.m}^{-1}$; b) $T2= 2 \text{ dS.m}^{-1}$; c) $T3= 3 \text{ dS.m}^{-1}$; $T4= 4 \text{ dS.m}^{-1}$; $T5= 5 \text{ dS.m}^{-1}$.

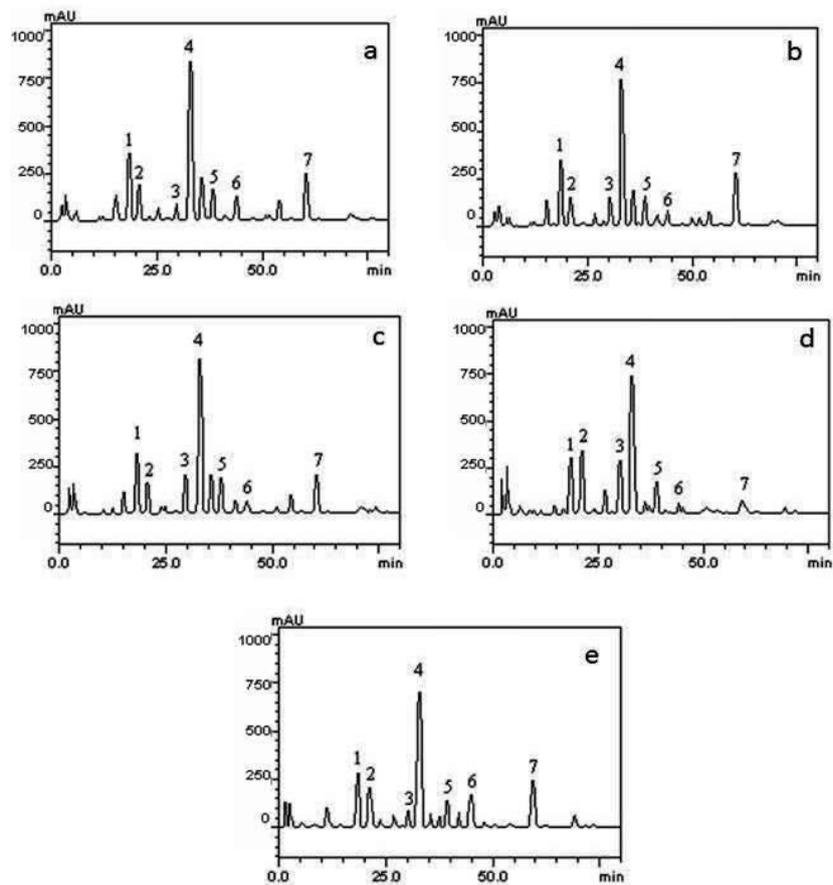


FIGURA 4: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 50 g.L^{-1} , coleta realizada aos 100 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a quercetina (pico 5), canferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). Diferentes concentrações de solução nutritiva: a) $T1= 1 \text{ dS.m}^{-1}$; b) $T2= 2 \text{ dS.m}^{-1}$; c) $T3= 3 \text{ dS.m}^{-1}$; $T4= 4 \text{ dS.m}^{-1}$; $T5= 5 \text{ dS.m}^{-1}$.

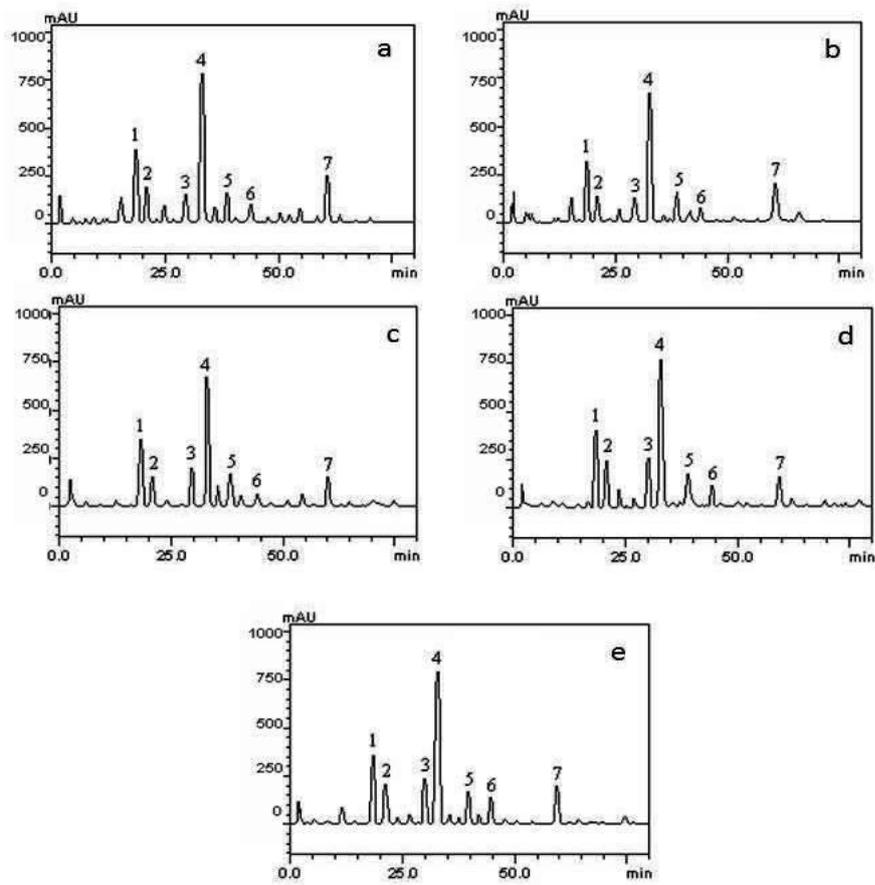


FIGURA 5: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 50 g.L^{-1} , coleta realizada aos 160 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a querquetina (pico 5), canferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). Diferentes concentrações de solução nutritiva: a) $T1= 1 \text{ dS.m}^{-1}$; b) $T2= 2 \text{ dS.m}^{-1}$; c) $T3= 3 \text{ dS.m}^{-1}$; $T4= 4 \text{ dS.m}^{-1}$; $T5= 5 \text{ dS.m}^{-1}$.

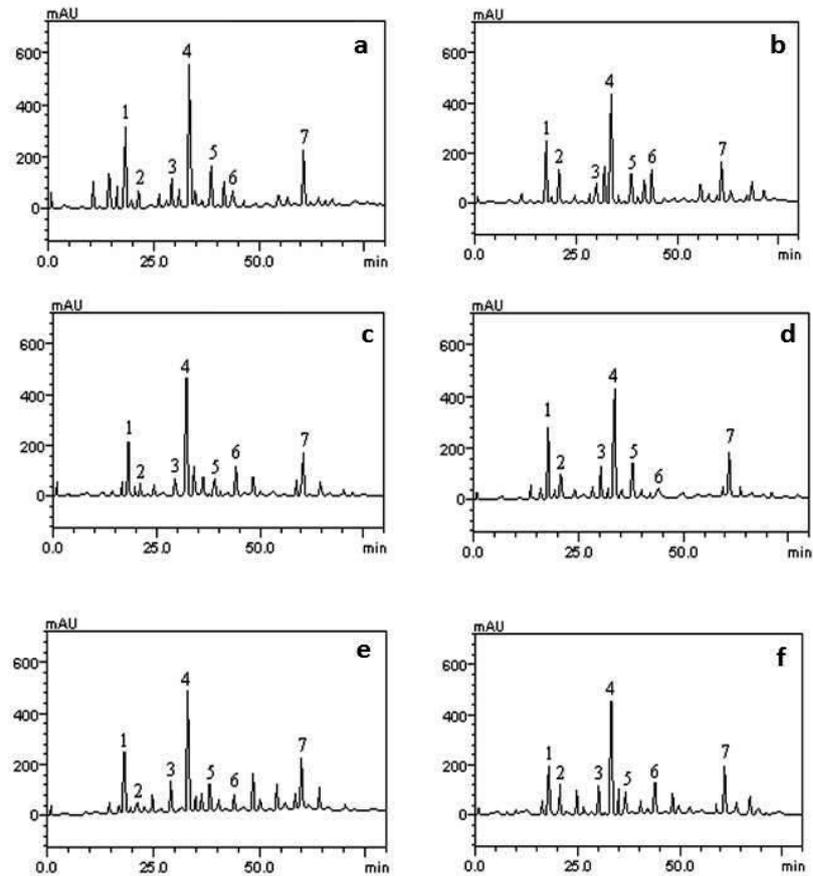


FIGURA 6: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 50 g.L^{-1} , coleta realizada aos 180 e aos 365 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a quercetina (pico 5), canferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). Diferentes concentrações de solução nutritiva: a) T1= 5.55 mmol L^{-1} de N coleta aos 180 DAP; b) T1= 5.55 mmol L^{-1} de N coleta aos 365 DAP; c) T2= 8.05 mmol L^{-1} de N aos 180 DAP; d) T2= 8.05 mmol L^{-1} de N aos 365 DAP; e) T3= $10.55 \text{ mmol L}^{-1}$ de N aos 180 DAP; f) T3= $10.55 \text{ mmol L}^{-1}$ de N aos 365 DAP.

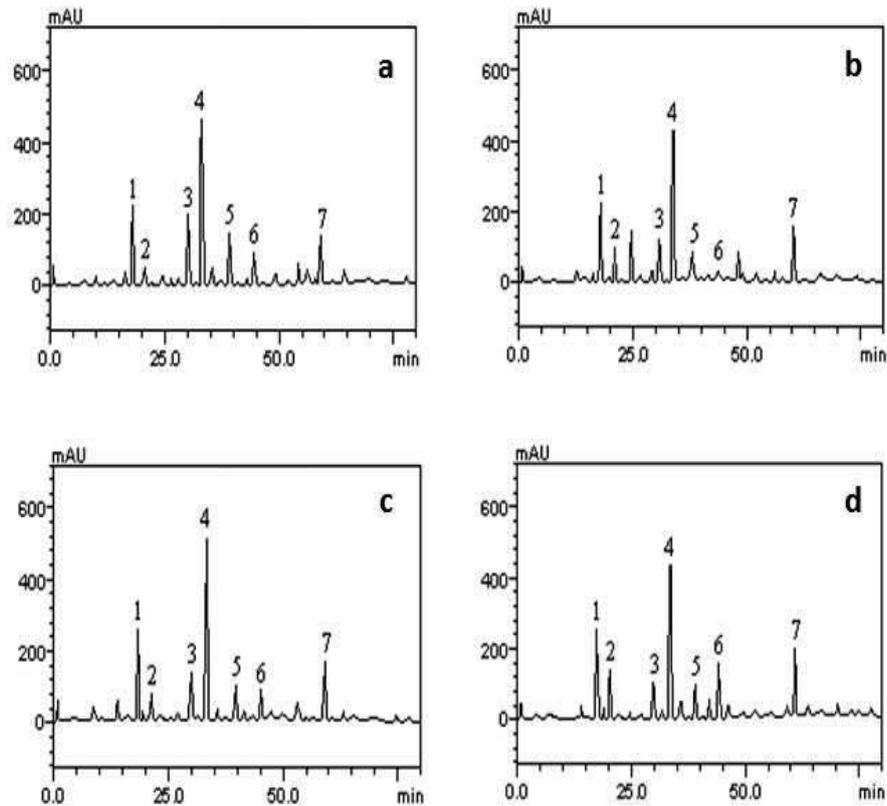


FIGURA 7: Perfil de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de extratos de *R. officinalis* na concentração de 50 g.L⁻¹, coleta realizada aos 180 e aos 365 DAP. Os picos referem-se a ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), ácido rosmarínico (pico 4), a quercetina (pico 5), canpferol (pico 6) e ácido carnósico (pico 7). a) T4= 13.05 mmol L⁻¹ de N coleta aos 180 DAP; b) T4= 13.05 mmol L⁻¹ de N coleta aos 365 DAP; c) T5= 15.55 mmol L⁻¹ de N coleta aos 180 DAP; d) T5= 15.55 mmol L⁻¹ de N coleta aos 365 DAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMELA, L. et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatogr A**, v.1120, n. 1-2, p.221-229, 2006.
- ANDRIOLO, J.L. **Fisiologia das culturas protegidas**. Santa Maria: UFSM, 1999. 142 p.
- BAGATINI, M.D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.2B, p. 632-636, 2009.
- BELTRÃO, J.; TRINDADE, D.; CORREIA, P.J. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. **Acta Horticulturae**, v.449, p.623-627, 1997.
- BERGO, C.L.; MENDONÇA, H.A.; SILVA, M.R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo volátil. **Acta Amazônica**, v.35, n.2, p.111-117, 2005.
- BERNARDES, W.A. et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, n.7, p.1835-1840, 2010.
- CASTRO HG; FERREIRA FA; MOSQUIM PR. 2004. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2ª ed. Viçosa. 111p.
- COELHO, A.P.D. et al. Avaliação dos compostos fenólicos e potencial genotóxico e antiproliferativo do extrato de *Echinodorus longiscapus* Arech. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.2698-2709, 2013.
- DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v.34, n.3, p. 95-101, 2010.
- DEL BAÑO, M.J. et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.15, p. 4247–4253, 2003.
- DRAGOEVA, A.P.; NANOVA, Z.D.; KALCHEVA, V.P. Allelopathic activity of micropropagated *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, water infusions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.20, n.4, p. 513-518, 2010.
- FACHINETTO, J.M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyroclinesatureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 49-54, 2007.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata*

(Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n.4, p. 360-367, 2009.

FLOSS E.L. **Fisiologia das plantas cultivadas**: o estudo do que está por trás do que se vê. 5 ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2011. 734p.

FRESCURA, V. D. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Briton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração Agrobiologia) – Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FRESCURA, V.D. et al. Compostos fenólicos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, 755-761, 2013.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: Funpec, 2002. 131 p.

IGANCI, J.R.V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.79-82, 2006.

IZZO, A.A.. CAPASSO, F. Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.28, n.2, p.47-48, 2007.

JI, H.F.; ZHANG, H.Y. Multipotent natural agentes to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.2, p.143-151, 2008.

LAKHANPAL, P.; RAI, D.K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. **Internet Journal of Medical Update**, v. 2, n. 2, p. 1-16. 2007.

LORENZI, H; MATOS, F.J. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LOUVATEL, K.; ZAIONS, M.I.M.; ARENHART, A.R. avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos de *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha), utilizando o sistema teste *Allium cepa*. **Unoesc & Ciência**, Edição Especial, p. 29-34, 2014.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas Mediciniais**. Viçosa : UFV, 2000. 220p.

PARDOSSI, A. et al. **Fertigation and Substrate Management in Closed Soilless Culture**. University of Pisa, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie. 2011. 64p.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recente advances. **Fitoterapia**, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2012.

RAWEL, H.M. et al. Interactions of diferents phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 130-150. 2002.

REZAIE, T. et al. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.53, n.12, p. 7847-7854, 2012.

SILVA, A.M.O. et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinusofficinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, v.24, n.1, p. 121-130, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. 833p.

TEDESCO, M. et al. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Menthapulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n.15, p. 1913-1919, 2012.

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

DISCUSSÃO

Apesar de o alecrim ser uma espécie popular, são escassos os estudos sobre essa planta, principalmente no que se refere ao cultivo sob distintas condições, bem como a produção de fitomassa, produção e composição do óleo volátil, e a concentração de compostos fenólicos nos extratos da espécie nessas condições de cultivo e durante o crescimento da planta, além do efeito dos extratos e óleo volátil sobre o material genético e ciclo celular de organismos alvo.

Avaliando-se as concentrações de solução nutritiva de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0 dS.m⁻¹ e coleta de plantas com as idades fisiológicas de 100 e 160 dias após o plantio (DAP), observou-se que a produção de fitomassa e conseqüentemente o rendimento de óleo volátil em alecrim varoiu de acordo com as diferentes concentrações de solução nutritiva e com o crescimento da planta, ocorrendo redução na produção de fitomassa e, em conseqüência disso, decréscimo no rendimento de óleo volátil em concentrações acima de 1,86 dS.m⁻¹ e a coleta aos 160 DAP proporcionou maior produção de fitomassa e óleo volátil.

Como o aumento da concentração da solução nutritiva proporcionou a diminuição da fitomassa nas plantas, maiores concentrações de solução reduzem o rendimento de óleo volátil por planta. Isso se deve ao fato de que as variações da concentração da solução nutritiva, ou seja, a salinidade do meio nutritivo, implicam mudanças na absorção de água e nutrientes, levando a alterações fisiológicas das plantas (BELTRÃO et al, 1997), sendo a deficiência hídrica a principal causa da perda de produtividade (ORTOLANI; CAMARGO, 1987), como em *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), quando ocorreu redução no rendimento de massa seca total sob condições de estresse hídrico (SIMON et al., 1992).

Em alecrim cultivado em sistema convencional no solo o déficit hídrico também resultou em redução no rendimento de óleo volátil (SINGH; RAMESH, 2000), e o mesmo ocorreu com *Pimpinella anisum* L. (anis) (ZEHTAB-SALMASI et al., 2001).

Avaliando-se as concentrações de nitrogênio (N) de 5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹ com plantas coletadas aos 90 DAP, 180 DAP, 270 DAP e 365 DAP, observou-se que o crescimento máximo das plantas de alecrim ocorreu com a concentração de 9.40 mmol.L⁻¹ de N e, a produção de fitomassa e o rendimento de óleo foram mais elevados na coleta realizada aos 365 DAP.

A redução do crescimento da planta e, conseqüentemente, da produção de fitomassa com o aumento da disponibilidade de N foi uma surpresa no estudo, já que tem sido demonstrada na literatura uma relação linear entre o crescimento da área foliar e a

disponibilidade de N (AËGREN; FRANKLIN, 2003) e relações desse tipo têm servido de base para o emprego de soluções nutritivas concentradas em N no cultivo de plantas em sistemas fora do solo (SCHMIDT et al., 2001). Nessas soluções, as concentrações de N são superiores a 14 mmol.L⁻¹ e nos resultados atuais, o crescimento máximo das plantas de alecrim foi obtido na concentração de 9,40 mmol.L⁻¹, indicando que essa espécie é menos exigente e também menos tolerante ao excesso de N do que as hortaliças folhosas. Resultado semelhante foi apontado por Deschamps et al. (2012), os quais compararam a produção de fitomassa de *Mentha piperita* L. (hortelã) em cultivo no solo com doses de N de 20; 30 e 40 kg.ha⁻¹ e observaram que não houve aumento da fitomassa e do rendimento de óleo volátil nas duas maiores doses., bem como o observado por Costa et al. (2010) em *Pogostemon cablin* Benth. estudando as doses de 30, 60, 90 e 120 kg.ha⁻¹ de N e os resultados indicaram que 30 kg. ha⁻¹ de N no plantio é suficiente para maior desenvolvimento vegetativo e produção de óleo volátil.

Esse resultado contraria aqueles de May et al. (2010), os quais obtiveram aumento da produção de biomassa de *Mentha citrata* Ehrh. (menta-do-levante) cultivada no solo por efeito de doses de N de 11,0; 16,7 e 22,3 Kg ha⁻¹, sem, contudo, efeito no rendimento de óleo volátil. Diferem também daqueles de Sifola e Barbieri, (2006) em *O. basilicum*, nos quais a adubação nitrogenada aumentou a produção de fitomassa e o rendimento de leo. Esses resultados contraditórios podem ser atribuídos a diferenças na disponibilidade e na eficiência de uso do N nos diferentes sistemas de produção.

O alecrim é uma planta perene que pode ser submetida a sucessivas coletas da parte aérea no decorrer do ano, e ao avaliar-se o efeito da periodicidade de coletas na produção de fitomassa e no rendimento de óleo volátil no período de 365 dias observou-se que a produção de fitomassa acumulada em quatro, três, duas e uma coleta durante o período experimental foi de 11,25 g, 56,08 g, 59,35 g e 68,69 g, respectivamente. E, o rendimento de óleo acumulado de quatro coletas foi de 1,19 g.planta⁻¹, de três coletas foi 0,9661 g.planta⁻¹, de duas coletas 2,74 g.planta⁻¹ e de uma única coleta foi de de 4,53 g.planta⁻¹. Ainda, a concentração de óleo em mg.g⁻¹ de fitomassa foi de: 22,18; 34,48; 67,35 e 65,94 em 90, 180, 270 e 365 DAP, respectivamente. Bem como, a concentração de óleo por grama de fitomassa acumulada em quatro, três, duas e uma coleta foi, em mg.g⁻¹, respectivamente de: 28,64; 17,22; 59,14 e 65,95. Tais resultados demonstraram aumento no rendimento de óleo com o aumento da idade fisiológica das folhas. Então, a produção de óleo seria um processo fisiológico que acompanha o crescimento e o envelhecimento da área foliar da planta indicando que para fins de cultivo do alecrim para produção de óleo volátil deve-se maximizar a produção de

fitomassa da parte aérea, a qual é favorecida realizando a coleta um ano após o plantio das mudas. Confirmando os resultados de May et al. (2010), os quais mostraram que intervalos entre cortes de até 120 dias permitem que a planta fique mais alta e acumule maior quantidade de massa seca da parte aérea. Entretanto, os resultados atuais indicam que esse intervalo pode ser ainda maior, até 365 dias.

O aumento da produção de óleo volátil em plantas com mais elevada idade fisiológica também foi observado em *O. basilicum* quando o maior rendimento de óleo volátil ocorreu em plantas com 10 meses comparando-se à plantas com 5 meses de idade (SILVA et al., 2005) e em *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta longa) em que o rendimento de óleo volátil foi maior quando se realizou apenas um corte no intervalo de 12 meses (BERGO et al., 2005).

Além das avaliações relacionadas à produção de fitomassa e óleo volátil, também foi avaliado o efeito do óleo volátil e dos extratos aquosos de alecrim sobre o ciclo celular e material genético de *Allium cepa* L. O óleo volátil e os extratos aquosos foram obtidos de plantas cultivadas nas concentrações de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0 dS.m⁻¹ coletadas aos 100 e aos 160 DAP e, de plantas cultivadas em 5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹ coletadas aos 180 e 365 DAP.

O efeito do óleo volátil foi avaliado nas concentrações de 3 e 10%, as quais apresentaram efeito antiproliferativo, com efeito superior na concentração de 10%, corroborando com resultados observados por Stojanović-Radić et al. (2010), quando analisaram o efeito do óleo volátil de alecrim sobre células de raízes de *A. cepa*, bem como o observado em estudo com óleo de alecrim sobre a divisão celular de *Vicia faba* L. (fava) (HAMEDO; ABDELMIGID, 2009).

O óleo volátil na concentração de 10% foi considerado genotóxico, pois o número de alterações cromossômicas diferiu significativamente do observado no controle negativo em água destilada. Assim como no presente trabalho, o óleo volátil de alecrim também foi considerado genotóxico em células de medula óssea de ratos na concentração de 2000 mg.kg⁻¹, tendo sido avaliadas também as concentrações de 300, 1000 mg.kg⁻¹, as quais não foram consideradas genotóxicas (MAISTRO et al., 2010), como o observado no presente trabalho quando a menor concentração não foi genotóxica.

Os resultados de inibição do ciclo celular e alterações cromossômicas devem estar relacionados aos compostos presentes no óleo volátil, sendo os majoritários: cânfora, 1.8 cineol, α -pineno, β -myrceno e verbenona, além do composto β -pineno que nas concentrações de N de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹ nas coletas aos 180 DAP e a concentração de 13.05 na coleta aos 365 DAP foi superior a 5%.

Alguns compostos do óleo de plantas cultivadas em diferentes concentrações de N não ocorreram no óleo obtido de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva, como verbenona, pinocarvona e cedreno. No entanto, esses compostos ocorreram em uma quantidade relativamente baixa e, como o efeito do óleo volátil de alecrim não variou em relação às condições de cultivo e idade fisiológica das plantas, então, a ocorrência dos compostos não teria interferido no efeito do óleo sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*.

No óleo volátil das folhas de plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva, coletadas aos 100 e aos 160 DAP, foram identificados, por CG, terpenos da classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, de maneira que os monoterpenos apareceram em maior quantidade – 21 compostos em um total de 28 identificados. No óleo volátil das folhas de plantas cultivadas em diferentes concentrações de N, coletadas aos 180 e aos 365 DAP, foram identificados, 23 compostos monoterpenos em um total de 31 identificados.

Assim como o observado no presente trabalho, observou-se em outros estudos, que a composição do óleo volátil de alecrim varia quantitativamente e qualitativamente, como por exemplo: cânfora (26,40%), 1.8 cineol (23,48%), α -pineno (9,94%) e verbenona (3,32%) foram descritos por Rahman et al. (2007) como majoritários em alecrim cultivado na Índia; no entanto, além desses compostos, foram descritos também, como majoritários, o canfeno (5,83%), mirceno (4,86%), bornil acetato (3,97%), limoneno (3,08%), borneol (2,05%) e α -terpineol (2,68%). Em estudo conduzido por Atti-Santos et al. (2005), os compostos majoritários foram α -pineno (40,55 a 45,20%), 1.8 cineol (17,40 a 19,35%), canfeno (4,73 a 6,06), verbenona (2,32 a 3,86%) e borneol (2,24% a 3,10%) em safras nos anos de 1998, 1999 e 2000; porém, para os autores Ribeiro et al. (2012), os constituintes majoritários foram α -pineno (19,8%), β -mirceno (24,2%), 1.8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%).

A existência de variabilidade na composição química do óleo volátil em plantas aromáticas é observada em estudos realizados por diferentes autores, como, por exemplo, Garlet et al. (2007), em um trabalho com *Mentha x gracilis* em que a dose máxima de K (690 mg.L⁻¹), na solução nutritiva, aumentou o teor de linalol, principal composto de interesse no óleo volátil da espécie, e quando doses de cama de frango em área de plantio de inverno sob irrigação influenciaram no teor de linalol em *O. basilicum* (LUZ et al, 2009).

A variabilidade na concentração de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo volátil de alecrim, no presente estudo, pode ser explicada pelo fato de o metabolismo secundário ser resultado de interações complexas entre a biossíntese, o transporte, a estocagem e a

degradação (WINK, 1990), de maneira que, segundo Santos (2001), parece que a produção desses metabólitos está associada ao grau de diferenciação e desenvolvimento de tecidos.

Mesmo ocorrendo variabilidade em alguns compostos entre os óleos voláteis testados sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*, não ocorreu diferença no efeito do óleo obtido de plantas cultivadas nas diferentes concentrações de solução nutritiva (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 5.0 dS.m⁻¹), com coletas aos 100 e aos 160 DAP, bem como nas diferentes concentrações de N (5.55, 8.05, 10.55, 13.05 e 15.55 mmol.L⁻¹), nas coletas aos 180 e 365 DAP.

Os extratos de alecrim foram avaliados sobre o ciclo celular e o material genético de *A. cepa* nas concentrações de 5, 20 e 50 g.L⁻¹, obtidos de plantas cultivadas nas diferentes concentrações de solução nutritiva e coletadas aos 100 e aos 160 DAP, e nas concentrações de 5 e 50 g.L⁻¹, com plantas cultivadas em diferentes concentrações de N e coletadas aos 180 e 365 DAP.

Assim como o observado com o óleo volátil de alecrim, o efeito dos extratos não variou dentre as plantas cultivadas em diferentes concentrações de solução nutritiva e distintas doses de N, nem com a idade fisiológica da planta. Corroborando com o observado por Fachineto e Tedesco (2009) ao estudarem o efeito de extratos de duas populações das plantas medicinais *Bacharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Bacharis articulata* (Lam.) Pers. coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento, utilizando como organismo alvo *A. cepa*.

Os extratos apresentaram efeito antiproliferativo em todas as concentrações e superior nas concentrações de 20 e 50 g.L⁻¹, sem efeito genotóxico sobre *A. cepa*. Isso pode estar relacionado com os compostos fenólicos presentes nos extratos de alecrim, os quais foram os mesmos em todos os extratos. Porém, além dos compostos fenólicos identificados nos extratos, ocorreu a presença de outras substâncias não identificadas, e pode ter ocorrido o sinergismo entre as substâncias presentes no extrato, pois, segundo Martins et al. (2000), as substâncias oriundas de plantas podem agir em sinergismo.

Resultados semelhantes aos observados com os extratos de alecrim foram observados em extratos das espécies *Mentha pulegium* L. nas concentrações de 5, 15 e 30 g.L⁻¹ (poejo) (TEDESCO et al., 2012) e *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) nas concentrações de 1,5 e 4,5% (LOUVATEL et al., 2014), inibiram a divisão celular de *A. cepa*, havendo maior inibição nas concentrações superiores e ausência de genotoxicidade nesses extratos. Já, o extrato de *Hyssopus officinalis* L. (hissopo) na concentração de 3,5 g.L⁻¹, apresentou efeito antiproliferativo, porém, apresentou genotoxicidade (DRAGOIEVA et al., 2010).

Nos extratos de alecrim foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido carnósico (ácidos fenólicos), canferol, quercetina e rutina (flavonoides) nas diferentes concentrações de solução nutritiva e em ambas as coletas, corroborando com Frescura et al. (2013), quando analisaram, pela mesma metodologia, os compostos fenólicos em extratos aquosos de alecrim sob cultivo protegido fora do solo e os mesmos compostos foram identificados.

O ácido rosmarínico foi o composto observado na maior concentração nos extratos de alecrim (Figuras 2 a 7; Tabelas 3 e 4) e é de ampla ocorrência na família Lamiaceae, em *R. officinalis*, *Salvia officinalis* L. (sálvia), *M. officinalis* (erva-cidreira) e *Origanum vulgare* L. (orégano) (SIMÕES et al, 2001). Em estudo realizado por Del Baño et al. (2003), os extratos foram considerados antioxidantes e o composto com maior concentração também foi o ácido rosmarínico.

O ácido rosmarínico confere ação antioxidante ao extrato, reduzindo inúmeros eventos deletérios ao organismo, como formação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA (IZZO; CAPASSO, 2007; JI; ZHANG, 2008). O ácido rosmarínico, juntamente com o ácido clorogênico e outros derivados do ácido cafeico, têm sido estudados como possíveis marcadores taxonômicos na família Lamiaceae (SIMÕES et al., 2001).

O ácido carnósico foi considerado por Bernardes et al. (2010), juntamente com o carnosol, o princípio ativo responsável pela atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato das folhas de *R. officinalis*, com aplicação clínica para doenças que afetam a retina exterior, incluindo a degeneração macular relacionada à idade e retinose pigmentar, em que o estresse oxidativo é provavelmente um fator que contribui para a progressão da doença (REZAIE et al., 2012).

A rutina melhora os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, sintomas de fragilidade capilar, como a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK et al., 1991).

O canferol e a quercetina apresentam ação protetora contra hipertrofia pancreática e hiperplasia (RAWEL et al., 2002). A quercetina melhora a saúde cardiovascular, doenças oculares, doenças alérgicas, artrite, reduzindo o risco de câncer (LAKHANPAL; RAI, 2007).

Os resultados provenientes do teste de *A. cepa* observados no presente trabalho são relevantes à saúde humana, pois o alvo é a célula eucariótica (FRESCURA, 2012) e, foram observados resultados semelhantes na comparação entre o teste de *A. cepa*, células de medula

óssea e linfócitos humano, em trabalho realizado por Teixeira et al (2003) demonstrando a eficácia dos resultados quando feito o uso do teste de *A. cepa*.

CONCLUSÃO

As salinidades, as doses de N e a idade fisiológica da planta interferem no rendimento de óleo volátil e na produção de fitomassa de *R. officinalis*, mas não alteram o efeito do óleo volátil e dos extratos aquosos sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*.

Salinidades acima de $1,86 \text{ dS.m}^{-1}$ e doses de N acima de $9,40 \text{ mmol.L}^{-1}$ reduzem a produção de fitomassa e o rendimento de óleo volátil de *R. officinalis*.

A produção de fitomassa e rendimento de óleo volátil aumentam com a idade fisiológica da planta.

O óleo volátil possui efeito antiproliferativo e o aumento da sua concentração causa efeito genotóxico sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*.

Os extratos aquosos de *R. officinalis* possuem efeito antiproliferativo e não são genotóxicos sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*, sendo que o efeito antiproliferativo é maior nas concentrações mais elevadas.

Os compostos majoritários do óleo volátil de *R. officinalis* são cânfora, 1.8 cineol, α -pineno, β -myrceno e verbenona, além do composto β -pineno que nas concentrações de N de 8.05, 13.05 e 15.55 mmol.L^{-1} na coleta aos 180 DAP e na concentração de 13.05 mmol.L^{-1} na coleta aos 365 DAP.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de *R. officinalis* são ácido rosmarínico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido carnósico, canferol, quercetina e rutina.

REFERÊNCIAS

- AÊGREN G I; FRANKLIN O. Root: Shoot Ratios, Optimization and Nitrogen Productivity. **Annals of Botany**, v.92, p.795-800, oct. 2003.
- ANDRIOLO, J.L. **Fisiologia das culturas protegidas**. Santa Maria: UFSM, 1999. 142 p.
- ATTI-SANTOS, A.C. et al. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brasilian Archives of biology and Technology**, Curitiba, v.48, n6, p. 1035-1039, nov. 2005.
- BELTRÃO, J.; TRINDADE, D.; CORREIA, P.J. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. *Acta Horticulturae*, v.449, p.623-627, 1997.
- BERNARDES, W.A. et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, n.7, p.1835-1840, 2010.
- BERWICK, A. Os 24 óleos essenciais. In:_____. **Aromaterapia holística**. Rio de Janeiro: Nova Era, 1998. p.166-169.
- CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.426, n.2, p.211-214, mai. 1999.
- CASTRO, H.G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2ª ed. Viçosa. 2004. 111p.
- COSTA AG. et al. Desenvolvimento vegetativo do patchouli após a aplicação de diferentes níveis de nitrogênio em plantio e pós-colheita. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.S3428-S3433., 2010.
- CUNHA, A.P. da; ROQUE, O.R.; SILVA, A.P. da. Monografia das plantas e dos produtos vegetais mais usados na fitoterapia. In: **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p.92-93. 2003.
- DEL BAÑO, M.J. et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.15, p. 4247-4253, 2003.
- DESCHAMPS, C. et al. Produção de biomassa, teor e composição do óleo volátil de *Mentha piperita* L. em resposta a fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.12-17, 2012.
- DRAGOEVA, A.P.; NANOVA, Z.D.; KALCHEVA, V.P. Allelopathic activity of micropropagated *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, water infusions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, vol.20, n.4, p. 513-518, aug./sept. 2010.

FACHINETTO, J.M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa**, v.17, n.1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 11, n.4, p. 360-367. 2009.

FERRARI, G.N et al. **Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. Piracicaba: ESALQ (Série Produtor Rural, 49), 2011. 33p.

FILHO, O.F.; ABDALLA, A.L. **Desordens nutricionais e síntese de compostos fenólicos e taninos totais em guandu e leucena**. 2ª ed. Brasília/Dourados: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Agropecuária Oeste. 2011. 85p.

FLOSS E.L. **Fisiologia das plantas cultivadas**: o estudo do que está por trás do que se vê. 5 ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2011. 734p.

FRESCURA, V. D. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Briton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

FRESCURA, V.D. et al. Compostos fenólicos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17, 755-761, dez. 2013.

GARLET, T.M.B. et al. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.956-962, jul./agos. 2007.

HAMEDO, H.A.; ABDELMIGID, H.M. Use of Antimicrobial and Genotoxicity Potentiality for Evaluation of Essential Oils as Food Preservatives. **The Open Biotechnology Journal**, v.3, p.50-56. 2009.

IZZO, A.A.. CAPASSO, F. Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.28, n.2, p.47-48, 2007.

JI, H.F.; ZHANG, H.Y. Multipotent natural agentes to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.2, p.143-151, 2008.

LAKHANPAL, P.; RAI, D.K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. **Internet Journal of Medical Update**, v. 2, n. 2, p. 1-16. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LOUVATEL, K.; ZAIONS, M.I.M.; ARENHART, A.R. avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos de *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *Tropaeolum majus*

L. (capuchinha), utilizando o sistema teste *Allium cepa*. **Unoesc & Ciência**, Edição Especial, p. 29-34, 2014.

LUZ, J.M.K. et al. Teor, rendimento e composição química do óleo essencial d manjerição sob doses de cama de frango. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p. 349-353, set. 2009.

MAISTRO, E.L. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.4, p. 2113-2122, oct. 2010.

MARTINEZ, H.E. P. **Hidroponia**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2005. 271p.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa : UFV, 2000. 220p.

MAY, A. et al. 2010. Produção de biomassa e óleo volátil de *Mentha citrata* em função do manejo cultural e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Pernambuco**, v.5, n.3, p.370-375, jul./set. 2010.

MAY, A. et al. Produção de biomassa e óleo volátil de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n.2, p. 223-231, feb. 2006.

ORTOLANI, A.A; CAMARGO, M.B.P. Influência dos fatores climáticos na produção. In: CASTRO RC et al. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p. 71-81. 1987.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recente advances. **Fitoterapia**, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PENG, Y. et al. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n 3-4, p 431-437, sep. 2005.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2012.

RAHMAN, L. et al. Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttanvhal Hills, India. **Journal of spices and Aromatic Crops**, v.16, n.1, p. 55-57. 2007.

RAWEL, H.M. et al. Interactions of diferents phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 130-150. 2002.

REZAIIE, T. et al. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.53, n.12, p. 7847-7854, 2012.

RIBEIRO, D.S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina**, Londrina, v.33, n. 2, pp.687-696, abr. 2012.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. ver. Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2001.

SCHMIDT, D. et al. Desempenho de soluções nutritivas e cultivares de alface em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.122-126, jul. 2001.

SIFOLA MI; BARBIERI G. Growth, yield, and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia Horticulturae**, v.108, p. 408-413, may. 2006.

SILVA, A.M.O. et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.24, n.1, p. 121-130, jan./fev. 2011.

SILVA, C.R. et al. Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p. 1-3. 2004.

SILVA, F. et al. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 323-328. 2005.

SIMON, J.E. et al. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, p. 71-75. 1992.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001. 833p.

SINGH, M.; RAMESH, S. Effect of irrigation and nitrogen on herbage, oil yield and water-use efficiency in rosemary grown under semi-arid tropical conditions. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, p.659-662. 2000.

STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.). **Biologica Nyssana**, v.1, n.1-2, p.83-88, dez. 2010.

TEDESCO, M. et al. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n.15, p. 1913-1919, nov. 2012.

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

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.26, n.4, p.551-555, dec. 2003.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.D.; RHODES, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990. p. 23-41.

ZEHTAB-SALMASI, S. et al. Effects of water supply and sowing date on performance and essential oil production of anise (*Pimpinella anisum* L.). **Acta Agronomica Hungarica**, v. 49, n.1, p.75-81. 2001.