

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

Suany Maria Gomes Pinheiro

**CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO
GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL EM ALECRIM (*Rosmarinus
officinalis* L.) SOB DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE**

Santa Maria, RS
2016

Suany Maria Gomes Pinheiro

**CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO GENOTÓXICO DO
ÓLEO ESSENCIAL EM ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) SOB DIFERENTES
PERÍODOS DE SALINIDADE**

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

Professora Orientadora: Dra. Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS
2016

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

Gomes Pinheiro, Suany Maria
CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO
GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL EM ALECRIM (*Rosmarinus
officinalis* L.) SOB DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE /
Suany Maria Gomes Pinheiro.-2016.
50 p.; 30cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2016

1. Lamiaceae 2. Condutividade elétrica 3. Divisão
celular 4. Genotoxicidade 5. Alterações cromossômicas I.
Bosio Tedesco, Solange II. Título.

Suany Maria Gomes Pinheiro

**CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO GENOTÓXICO
DO ÓLEO ESSENCIAL EM ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) SOB
DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE**

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

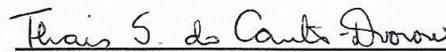
Aprovado em 16 de fevereiro de 2016



Solange Bosio Tedesco Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)



Thais Scotti do Canto Dorow, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo amor, dedicação, incentivo, e esforço que tiveram para que eu pudesse vencer na vida, investindo sempre na minha educação.

Aos meus irmãos Camila, Saulo e Sara pelo carinho, amor e aos momentos de alegria que me proporcionaram, e por me mostrarem que família é a base de tudo.

Ao meu namorado Max Dantas, pelo amor, paciência, compreensão e apoio que foram fundamentais para essa conquista.

À minha tia Nailde, que infelizmente não se encontra mais entre nós, mas se faz necessário agradecer pela sua imensa alegria que sempre contagiou a todos.

À minha bisavó (*in memorian*) pelo seu exemplo de força e luta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado me concedendo sabedoria, força de vontade, amor e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais Jurandy Pinheiro e Maria Auxiliadora, pelo amor e carinho sempre.

Aos meus irmãos Camila, Saulo e Sara pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldade.

Ao meu namorado, Max por todo o amor, amizade, paciência e companheirismo durante todo esse tempo que estamos juntos, e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

Aos meus avôs (*In memoriam*) Cília Gomes, Cipriano Gomes, Antonio Pinheiro e minha avó Nair Pinheiro pelo amor e carinho que sempre teve comigo.

À minha Bisavó Marica (*In memoriam*), deixo minha gratidão e admiração.

Aos meus tios e tias, primos e demais familiares pelos momentos de alegria, em especial a minha tia Dadá, por todo o apoio sempre.

À minha orientadora Profa. Dra. Solange Bosio Tedesco pela orientação, amizade, ensinamentos, paciência, compreensão nos momentos de falhas durante a condução deste trabalho, e pela confiança a mim conferida.

Ao Prof. Dr. Jerônimo Andriolo, pela amizade, ensinamentos, ajuda na condução do trabalho e compreensão nos momentos de falhas.

À Profa. Dra. Viviane Frescura, pela amizade, paciência, ensinamentos e grande ajuda durante todo o mestrado, sempre que precisei estava disposta a ajudar.

Aos amigos Luana, Roberto, Pedro e Jéssica pelos momentos de alegria e descontração que passamos juntos e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

Aos colegas do grupo de Olericultura pelos momentos de descontrações e pela ajuda na condução do trabalho. Em especial à Myriam companheira de todas as horas.

Às colegas do LABCITOGEN, pelo auxílio na condução do trabalho e pelos momentos de descontrações.

Aos colegas de curso da Pós Graduação em Agronomia, em especial à Francilene, pela amizade e auxílios nas horas que precisei.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós Graduação em agronomia, pela formação que me proporcionou, e à CAPES pelo auxílio financeiro.

À Prof. Dra. Cristiane de Bona da Silva e à aluna Nadine pelo grande auxílio na extração do óleo essencial.

À Prof.Dr.Margareth Linde (*in memorian*) e à aluna Aline Boligon pela ajuda com as análises cromatográficas.

Aos funcionários da UFSM, em especial aos do departamento da Fitotecnia pela ajuda durante todo o curso.

Enfim a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho.

A TODOS VOCÊS, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

RESUMO

CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO GENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL EM ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) SOB DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE

AUTORA: SUANY MARIA GOMES PINHEIRO
ORIENTADORA: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Rosmarinus officinalis L. é uma espécie que tem se destacado pelo seu intenso uso popular, tendo como principal produto o óleo essencial. O trabalho teve como objetivo determinar o efeito do período de salinidade sobre a fitomassa, teor, rendimento, composição fitoquímica e genotoxicidade do óleo essencial das folhas de alecrim. Dois experimentos foram realizados simultaneamente no período entre 3 de junho de 2014 a 12 de dezembro de 2015, os experimentos foram realizados no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal da Santa Maria. No experimento I, na testemunha (T1) foi empregada uma solução nutritiva com condutividade elétrica (CE) de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ e nos demais quatro tratamentos (T2, T3, T4, T5) foi empregada uma solução nutritiva com condutividade elétrica de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$. Em T2 o fornecimento da solução salina foi iniciado aos 140 dias após o plantio (DAP), em T3 aos 150, em T4 aos 160 e em T5 aos 170 DAP. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de dezembro de 2014 completando um período de 190 dias. O período no qual as plantas permaneceram sob condições salina antes da coleta foi de 50, 40, 30 e 20 dias em T2, T3, T4 e T5, respectivamente. No experimento II também foram utilizados quatro períodos de salinidade (CE de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$) e a testemunha (CE de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$). O plantio foi feito no mesmo dia do experimento I e o fornecimento da solução salina iniciou-se nos mesmos dias do experimento I, porém a colheita foi retardada de forma a aumentar os períodos nos quais as plantas permaneceram em condições salinas. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de fevereiro de 2015. Dessa forma, o período de salinidade antes da coleta foi de 110, 100, 90 e 80 dias nos tratamentos T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Em ambos os experimentos o delineamento experimental empregado foi casualizado, com cinco repetições. Foi realizada extração de óleo das folhas por hidrodestilação em Clevenger e posteriormente realizada cromatografia gasosa. Os óleos essenciais foram avaliados quanto aos efeitos antiproliferativo e genotóxico em células de *Allium cepa* L. na concentração de 0,20 % para o óleo das plantas cultivadas nos diferentes períodos de salinidade coletadas aos 190 dias após o plantio. Os dados de produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial foram submetidos à análise de variância com regressão polinomial e os demais dados foram comparados pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que o período de salinidade através de uma solução nutritiva com condutividade elétrica de 5 dS m^{-1} reduz linearmente a fitomassa, teor e rendimento de óleo essencial de plantas de alecrim em cultivo sem solo. Os compostos majoritários do óleo essencial foram cânfora, 1,8 cineol, verbenona, α -pineno e β -mirceno. E esse, por sua vez não se mostrou genotóxico e nem apresentou efeito antiproliferativo significativo, com exceção daquele obtido a partir das plantas que permaneceram por um maior período de exposição à salinidade, que inibiu a divisão celular de *Allium cepa*.

Palavras-chave: Condutividade elétrica; divisão celular; Lamiaceae.

ABSTRACT

GROWTH, PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND GENOTOXIC EFFECT OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) UNDER DIFFERENT PERIODS OF SALINITY.

AUTHOR: SUANY MARIA GOMES PINHEIRO
ADVISER: SOLANGE BOSIO TEDESCO

Rosmarinus officinalis L. is a species that has stood out for its intense popular use, the main product the essential oil. The work was aimed determine the effect of salinity on the biomass period, content, yield, phytochemical composition and genotoxicity of essential oil of rosemary. Dois experiments sheets were simultaneously performed between June 3, 2014 to December 12, 2015, the experiments were performed in the department of Plant Science at the Federal University of Santa Maria. In the first experiment, the control (T1) was employed in a nutrient solution with electrical conductivity (EC) of 1.0 dSm^{-1} and the other four treatments (T2, T3, T4, T5) was used with a nutrient solution conductivity electric $5,0 \text{ dSm}^{-1}$. T2 plants were submitted to the salt solution for a period of 140 days after planting (DAP) in T3 to 150 in the 160 T4 and T5 to 170 DAP. All plants were collected on 12 December 2014 completing a period of 190 days. The period in which the plants remained under saline conditions before the collection was 50, 40, 30 and 20 days in T2, T3, T4 and T5, respectively. In the second experiment it was also compared four periods of salinity (CE 5.0 dSm^{-1}) and control (CE 1.0 dSm^{-1}). The planting was done on the same day of the experiment I and the supply of saline solution began on the same day of the first trial, but the harvest was delayed in order to increase the periods in which the plants remained in saline conditions. All plants were collected on 12 February 2015. Thus, the salinity period before the collection was 110, 100, 90 and 80 days for treatments T2, T3, T4 and T5, respectively. In both experiments the experimental design was randomized with five replications. The Extraction of oil from the leaves by hydrodistillation in Clevenger was performed and then performed gas chromatography. The essential oil was evaluated for antiproliferative and genotoxic effects in cells of *Allium Cepa* at a concentration of 0.20 % for the oil of plants grown in different periods of salinity collected at 190 after planting. The biomass production data and essential oil were subjected to analysis of variance with polynomial regression and other data were compared by Scott-Knott test ($p < 0.05$). The results showed that the salinity period through a nutrient solution with electrical conductivity of 5 dS m^{-1} linearly reduces biomass, content and essential oil yield of rosemary plants in soilless culture. The major compounds of the essential oil were camphor, 1.8 cineol, verbenone, α -pinene and β -myrcene. And this in turn was not genotoxic nor showed significant antiproliferative effect, except that obtained from the plants that remained for a longer period of exposure to salinity, which inhibited cell division of *Allium Cepa*.

Keywords: Electrical conductivity; cell division; Lamiacea

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1-** Experimento I- Esquema dos diferentes tratamentos (períodos de salinidade) em que as plantas de *Rosmarinus officinalis* ficaram submetidas, até o dia da coleta (190 dias após o plantio) Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....20
- Figura 2-** Experimento II- Esquema dos diferentes tratamentos (períodos de salinidade), em que as plantas de *Rosmarinus officinalis* ficaram submetidas, até o dia da coleta (250 dias após o plantio). Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....21
- Figura 3-** Fração relativa da massa fresca e massa seca das folhas *Rosmarinus officinalis*, coletadas aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....23
- Figura 4-** Fração relativa do teor de óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis*, coletadas aos 190 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....24
- Figura 5-** Fração relativa do teor de óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis*, coletadas aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....25
- Figura 6-** Fração relativa do rendimento do óleo essencial das folhas *Rosmarinus officinalis*, coletada aos 190 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....25
- Figura 7-** Fração relativa do rendimento do óleo essencial das folhas *Rosmarinus officinalis*, coletada aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....26

ARTIGO 2

- Figura 1-** As setas em A e D indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* submetidas ao glifosato; as setas em B indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* observadas no óleo essencial de alecrim a 0,20% extraído a partir das plantas que permaneceram por um maior período de salinidade; Na figura C as setas indicam as alterações cromossômicas observadas no óleo essencial a 0,20 % extraído das plantas testemunhas; A figura E mostra células em divisão celular regular A) micronúcleo; B) célula em metáfase com cromossomo perdido; C) célula irregular (binucleada); D) célula em anáfase com ponte; E) célula em metáfase regular. Escala = 10µm.....40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

- Tabela 1-** Tratamentos utilizados para avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de *Rosmarinus officinalis* pelo teste de *Allium cepa*.....35
- Tabela 2-** Média do índice mitótico (IM) de células de *Allium cepa* em intérfase e mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) nos diferentes tratamentos.....36
- Tabela 3-** Composição química do óleo essencial de alecrim, nos diferentes períodos de salinidade.....37
- Tabela 4-** Tipos de alterações observadas em células de *Allium cepa* nos diferentes tratamentos em 4000 células; porcentagem de cada tratamento.(PA/PT= ponte em anáfase e/ou telófase; MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; CD = Células irregulares; %A = porcentagem de alterações..... 39

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	13
Família Lamiaceae e metabólitos secundários.....	13
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	14
Salinidade.....	14
Genotoxicidade	15
ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOMASSA, TEOR E RENDIIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) SOB DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE EM CULTIVO SEM SOLO	17
Resumo.....	17
Abstract.....	17
Introdução	18
Material e métodos.....	19
Resultados e discussão	23
Referências Bibliográficas.....	27
ARTIGO 2: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E GENOTÓXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) CULTIVADO SOB DIFERENTES PERÍODOS DE SALINIDADE	30
Resumo.....	30
Abstract.....	30
Introdução	31
Material e métodos.....	32
Resultados e discussão	36
Referências Bibliográficas.....	41
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

Desde as antigas civilizações o homem busca na natureza recursos para melhorar suas condições de vida, e dentre esses recursos está a utilização de plantas para fins medicinais (LORENZI; MATOS, 2006). Nas últimas décadas, o consumo desses produtos naturais vem aumentando devido a necessidade crescente da população mundial buscar medicamentos alternativos para o tratamento de doenças. (FERRARI et al., 2011). Dentre as espécies que são utilizadas para essa finalidade, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) vem se destacando pelo seu intenso uso popular, tendo como principal produto o óleo essencial, que é resultante do metabolismo secundário da planta (FERRARI et al., 2011). Segundo Faria (2005) este óleo possui propriedades terapêuticas como atividade analgésica e ação anti-inflamatória. Essa espécie, também vem sendo utilizada na indústria de perfumaria e cosmético, na indústria alimentícia, assim também como na agricultura, como biocontrole, aumentando assim o interesse pelo alecrim por pesquisadores de diversas áreas.

No Brasil, o alecrim produzido ainda está abaixo das qualidades exigidas pelo mercado, fazendo com que sejam necessárias pesquisas que desenvolvam novas técnicas de cultivo visando maior produtividade de biomassa, rendimento e qualidade do óleo essencial da planta. (FERRARI, 2011; CARVALHO, 2010). Segundo Ferrari et al. (2011) condições ambientais, assim também como, a nutrição e o estresse fisiológico ao qual as plantas estejam submetidas podem interferir na qualidade e quantidade do óleo essencial, estando diretamente correlacionados à variação na produção de substâncias ativas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O alecrim é uma espécie originária da região do Mediterrâneo, caracterizada por verões quentes e secos de acordo com a classificação de Köppen. (KÖPPEN, 1948). O clima dessa região é diferente do tipo Cfa, subtropical úmido sem estação seca definida e precipitação pluviométrica média anual superior a 1.000 mm que ocorre no Rio Grande do Sul. (ALVARES et al., 2014; KÖPPEN, 1948).

A alternativa para amenizar as condições naturais pouco favoráveis à produção do alecrim nessa região é o cultivo sem solo. Esse sistema de cultivo permite proteger as plantas da precipitação pluviométrica e controlar o fornecimento de água e de nutrientes, de forma a otimizar o crescimento. O sistema do cultivo sem solo permite também planejar a produção de fitomassa visando uma maior regularidade

no decorrer do ano, a qual é importante no segmento de processamento industrial do óleo essencial (ANDRIOLO, 1999; SANTOS, 2000).

Uma das características da região mediterrânea considerada favorável à produção de óleos essenciais é a reduzida precipitação pluviométrica associada à baixa umidade do ar e do solo. Essas condições determinam uma baixa disponibilidade de água em torno das raízes e uma elevada demanda transpiratória da parte aérea, que podem provocar estresse de água durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. No cultivo sem solo o estresse de água pode ser induzido pelo manejo da concentração salina da solução nutritiva, a qual pode modificar o crescimento, o rendimento e composição do óleo essencial do alecrim. As concentrações salinas elevadas onde as raízes crescem podem reduzir a absorção de água pela planta (DIAS; BLANCO, 2010) e/ou provocar toxidez, afetando vários processos fisiológicos e bioquímicos (ATIENZA et al., 2004; ESTEVES; SUZUKI, 2008; DIAS; BLANCO, 2010). Segundo Waterman e Mole (1994) essas alterações dependem do tipo e da intensidade do estresse, como também do período em que a planta fica submetida a essas condições. Há indicações que os efeitos a curto prazo provocam um aumento na produção de alguns metabólitos secundários, enquanto a longo prazo é observado efeito oposto (WATERMAN; MOLE, 1994).

Outro aspecto importante refere-se ao efeito dos compostos presentes no óleo essencial do alecrim sobre a divisão celular e material genético de um organismo alvo. Estudos já realizados por Frescura (2014) mostraram que o óleo essencial de alecrim a uma concentração elevada pode ser genotóxico. No entanto, em se tratando de óleo essencial são necessários mais estudos sobre a espécie em relação à genotoxicidade, tendo em vista que a composição química do óleo essencial pode variar conforme as condições de cultivo de plantas podendo assim alterar o efeito genotóxico.

Possíveis efeitos genotóxicos de compostos existentes no óleo essencial podem ser monitorados pelo uso do sistema *Allium cepa* L. (BAGATINI, 2007), que consiste em avaliar o índice de divisão celular mitótica, fornecendo informações sobre o potencial que as substâncias têm de inibir ou aumentar a proliferação celular e o número de alterações cromossômicas (FRESCURA, 2012).

O presente estudo teve como objetivo determinar a fitomassa, teor, rendimento, composição fitoquímica e efeito genotóxico do óleo essencial de *Rosmarinus offi-*

cinalis, sob diferentes períodos de salinidade, visando a produção de alecrim em cultivo sem solo na região Sul do Brasil.

REVISÃO DE LITERATURA

FAMÍLIA LAMIACEAE E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A família Lamiaceae é constituída por aproximadamente 200 gêneros e 3200 espécies distribuídas em todo o planeta (BOTREL et. al., 2010). Sendo esta composta por ervas, arbustos ou árvores; caules geralmente quadrados em corte transversal (FALCÃO; MENEZES, 2003). Os ramos jovens são em sua maioria tetragonulares, sendo as folhas simples, opostas e com o limbo mostrando transições de bordo inteiro, dentado, lobado ou partido. (BARROSO, 1991).

Essa família representa grande importância econômica, por apresentar abundância de espécies aromáticas, medicinais e ornamentais, além de produzir óleo essencial que é utilizado em vários setores da indústria (MENEZES, 1994). Nas Lamiaceae o óleo essencial é armazenado em estruturas secretoras externas, as quais são chamadas de tricomas glandulares, estes por sua vez caracterizam-se por apresentar o pedicelo ou pedúnculo, que pode ser uni ou multicelular, uni ou multiseriado e a glândula, também uni ou multicelular, quando subdivididas por paredes horizontais e verticais (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Os óleos essenciais apesar de serem bastante difundidos, não são ainda suficientemente estudados no que se refere aos problemas que seu consumo pode trazer para a saúde do usuário (FERRARI et al., 2011). Essas substâncias são produzidas em diferentes concentrações, aparentemente como defesa das plantas contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Segundo Moraes (2009), os metabólitos representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, ou seja, a composição química dos mesmos vai depender dos estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra. Esses estímulos poderão ocasionar a biossíntese de diferentes compostos, tendo em vista que o ambiente pode interferir nas rotas metabólicas.

Tais compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas possuem propriedades biológicas que por serem empregadas nos setores alimentício,

agronômico, e principalmente farmacêutico, podem provocar interesse de pesquisadores dessas áreas (BEZERRA, 2008).

ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rosmarinus officinalis, conhecida popularmente como alecrim, pertencente à família Lamiaceae, é originária da Região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto, de até 1,5 m de altura. As folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura, flores azuladas-claras, pequenas e de aroma forte e muito agradável, estando reunidas em inflorescências curtas do tipo racemo (LORENZI; MATOS, 2006; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Essa cultura é de significativa importância, devido a sua ampla utilização na indústria farmacêutica, alimentícia e na agricultura que vem sendo utilizada como controle biológico. O alecrim tem como principal produto o óleo essencial, este por sua vez é muito utilizado para fins medicinais, devido à alta quantidade de princípios ativos. (FERRARI et al., 2011). Na indústria alimentícia e de bebidas, os óleos essenciais de alecrim são empregados como aromatizantes e na área de cosméticos são apontados como matéria prima, devido à sua ação antisséptica e cicatrizante (SIANI, 2000).

Em sua composição química o óleo essencial do alecrim apresenta, borneol, cineol, pineno, cafeneno, eucaliptol entre outros (BIASI; DESCHAMPS, 2009). No entanto, o rendimento e a composição desse óleo podem variar, dependendo do manejo e das condições ambientais a que as plantas estão submetidas (NASCIMENTO et al., 2007).

SALINIDADE

Situações de estresse podem causar impactos sobre as vias metabólicas, interferindo assim na produção de metabólitos secundários (COSCOLIN, 2012). Uma dessas situações é a concentração da solução nutritiva, que é medida pela condutividade elétrica (CE). Os valores dessa condutividade são proporcionais à concentração dos íons encontrados na solução (COSTA et al., 2001). Concentrações elevadas de sais nessa solução podem induzir ao estresse hídrico, com alterações na absor-

ção de água e nutrientes e, conseqüentemente, na fisiologia da planta (MENDES, 2008). A dificuldade na absorção de água causada pela salinidade vai resultar em um primeiro momento na redução da fotossíntese e no crescimento da planta, principalmente devido ao custo metabólico de energia associado às adaptações da condição salinas (DIAS; BLANCO, 2010; RAGANGNIN, 2013). Em seguida, alterações hormonais e fisiológicas ocorrem como mecanismos de defesa para a sobrevivência da planta sob essas condições, sendo um desses mecanismos a produção de metabólitos secundários (PROBST, 2012).

Na maioria das espécies a disponibilidade limitada de água causa efeito negativo para o crescimento e desenvolvimento. Em contrapartida para espécies aromáticas, medicinais e condimentares o elevado nível de salinidade e outros fatores abióticos que causam estresse à planta têm se mostrados favoráveis ao acúmulo de constituintes ativos (MORAIS, 2009). No entanto o efeito positivo desses fatores depende tanto da intensidade como do período de ocorrência e também do estágio fenológico em que ocorre (GOLBO-NETO; LOPES, 2007).

Frescura et al. (2014) analisando diferentes concentrações de solução nutritiva no cultivo do alecrim observou que em concentrações mais elevadas de sais o teor de óleo essencial foi maior, em contrapartida para o rendimento do óleo essencial concentrações mais altas de solução nutritiva proporcionaram redução no rendimento do óleo. Esse menor rendimento de óleo essencial alcançado em solução mais salina, pode ser atribuído ao longo período no qual as plantas ficaram submetidas às altas concentrações de salinidade (durante todo o ciclo da cultura).

GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade, segundo Fernandes et al. (2011), “é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos”. Essas alterações podem ser causadas por diferentes agentes, químicos, físicos ou biológicos, denominados de genotóxicos, que são capazes de induzir instabilidade cromossômica e processos cancerosos (BAGATINI et al., 2007).

Visando a detecção de genotoxicidade têm sido utilizados para análise dos efeitos de extratos vegetais sobre as células sistemas testes como o de *Allium cepa* (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007). Segundo Cabrera e Rodriguez

(1999) esse método foi validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP).

No sistema teste de *Allium cepa* os bulbos são colocados para enraizar em água destilada e durante 24 horas são mantidos em contato direto com a substância a ser testada. A seguir são avaliados o índice mitótico como indicador da proliferação adequada das células e as alterações cromossômicas que são indicadores de genotoxicidade (FRESCURA et al., 2013; GADANO et al., 2002; KNOLL et al., 2006; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Os efeitos das infusões de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *Allium cepa* têm sido estudados por vários autores (DIAS et al., 2014; FACHINETTO et al., 2007; KNOLL et al., 2006; PAULA et al., 2015), os quais mostraram que os principais efeitos que ocorrem são a inibição da divisão celular conforme o aumento da concentração dos chás (extratos aquosos) de plantas medicinais, além do aparecimento de alterações cromossômicas.

Huang et al. (1994) utilizando o extrato de folhas de alecrim para avaliar seu efeito inibitório de tumores no estágio inicial em camundongos, observou uma redução de até 90% dos tumores. Sendo esta inibição provocada pelo ácido ursólico e carnosol presentes no alecrim. Frescura (2014) estudando o efeito antiproliferativo do óleo essencial do alecrim, observou que esse apresentou atividade antiproliferativa, nas concentrações de 3 e 10% de óleo essencial.

Pesquisas relacionadas à genotoxicidade de compostos com atividades biológicas são de suma importância, tendo em vista que tais resultados são relevantes na fabricação de novos fármacos, uma vez que a maioria das indústrias farmacêuticas se baseia nos resultados de testes de genotoxicidade, para deliberarem os processamentos de um novo agente terapêutico (PURVES et al., 1995; VARANDA, 2006).

ARTIGO 1

Produção de biomassa, teor e rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sob diferentes períodos de salinidade em cultivo sem solo

RESUMO: O trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes períodos de salinidade sobre a fitomassa, teor e rendimento do óleo essencial de plantas de alecrim em cultivo sem solo. Foram feitos dois experimentos no Departamento de Fitotecnia, UFSM, entre 03 de junho de 2014 a 12 de fevereiro de 2015. No experimento I, na testemunha (T1) foi empregada uma solução nutritiva com condutividade elétrica (CE) de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ e nos demais quatro tratamentos (T2, T3, T4, T5) foi empregada uma solução nutritiva com condutividade elétrica de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$. Em T2 o fornecimento da solução salina foi iniciado aos 140 dias após o plantio (DAP), em T3 aos 150, em T4 aos 160 e em T5 aos 170 DAP. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de dezembro de 2014 completando um período de 190 dias. O período no qual as plantas permaneceram sob condições salina antes da coleta foi de 50, 40, 30 e 20 dias em T2, T3, T4 e T5, respectivamente. No experimento II também foram comparados quatro períodos de salinidade (CE de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$) e a testemunha (CE de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$). O plantio foi feito no mesmo dia do experimento I e o fornecimento da solução salina iniciou-se nos mesmos dias do experimento I, porém a colheita foi retardada de forma a aumentar os períodos nos quais as plantas permaneceram em condições salinas. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de fevereiro de 2015. Dessa forma, o período de salinidade antes da coleta foi de 110, 100, 90 e 80 dias nos tratamentos T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Em ambos os experimentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. O período de salinidade através de uma solução nutritiva com condutividade elétrica de 5 dS m^{-1} reduz linearmente a fitomassa, teor e rendimento de óleo essencial de plantas de alecrim em cultivo sem solo.

Palavras-chave: Crescimento; salinidade; solução nutritiva.

ABSTRACT: Biomass production, content and yield of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) under different periods of salinity in soilless culture. The study aimed to determine the effect of different periods of salinity on the biomass, content and yield of essential oil of rosemary plants in soilless culture. Two experiments were made at the Department of Plant Science, UFSM, from 3 June 2014 to 12 February 2015. The experiment I in the control (T1) was employed in a nutrient solution with conductivity-electric (CE) $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ and the other four treatments (T2, T3, T4, T5) was employed one nutrient solution with electrical conductivity of 5.0 dSm^{-1} . T2 supply of saline solution was started at 140 days after planting (DAP) in T3 to 150 in the 160 T4 and T5 to 170 DAP. All plants were collected on 12 December 2014 completing a period of 190 days. The period in which the plants remained under saline conditions before the collection was 50, 40, 30 and 20 days in T2, T3, T4 and T5, respectively. In the second experiment it was also compared four periods of salinity (CE 5.0 dSm^{-1}) and control (CE 1.0 dSm^{-1}). Planting was done on the same day of the experiment I and the supply of saline solution was started on the same day I of the experiment, however the harvest was delayed in order to increase the periods in which the plants have remained in saline conditions. All plants were collected on 12 February 2015. Thus, the salinity period before the collection was 110, 100, 90 and 80 days for treatments T2, T3, T4 and T5, respectively. In both experiments the experimental design

was completely randomized, with five replications. The salinity period through a nutrient solution with electrical conductivity of 5 dSm^{-1} linearly reduces biomass, content and essential oil yield of rosemary plants in soilless culture.

Key words: Growth; salinity; nutrient solution.

INTRODUÇÃO

O emprego de plantas para fins medicinais vem ganhando destaque nos últimos anos (Lorenzi & Matos, 2006). Dentre as espécies medicinais e aromáticas, destaca-se *Rosmarinus officinalis* L. (Ferrari et al., 2011). Essa espécie é conhecida popularmente como alecrim e é originária da região mediterrânea tendo como principal produto o óleo essencial, que possui atividades antioxidantes, além de ter ação bactericida e fungicida (Bozin et al., 2007).

Essa espécie tem sido considerada de crescimento lento, podendo sua colheita ser feita em anos alternados para obter maior produção de fitomassa. (Biasi & Deschamps, 2009). Com isso, o cultivo em ambiente protegido sem solo pode ser uma técnica promissora, pois através dessa técnica é possível um maior controle no fornecimento de água e nutrientes, além dos efeitos adversos do ambiente externos serem minimizados pelo ambiente de casa de vegetação, proporcionando um maior crescimento das plantas e encurtando o ciclo produtivo, aumentando assim a produtividade (Santos, 2000). Entretanto, o estímulo ao crescimento no cultivo sem solo não vem necessariamente acompanhado pelo aumento na qualidade dos produtos. Em hortaliças como o tomate e o melão, a elevada disponibilidade de água e de nutrientes que caracteriza esse sistema de cultivo está associada a uma menor qualidade dos frutos (Fogaça et al., 2007; Blanco, 2008). Para essas culturas, tem sido recomendado o emprego de soluções nutritivas com reduzida concentração de N (Fogaça et al., 2007) ou aumento da concentração salina da solução, a fim de restringir o crescimento vegetativo e aumentar a qualidade dos frutos em cultivo sem solo. A mesma situação pode ocorrer com as plantas condimentares como o alecrim.

O óleo essencial do alecrim é constituído por flavonoides, como a luteolina, aligenina, diosmetina (Ferrari et al., 2011), além de terpenos, como o cineol, pineno e a cânfora (Serafini et al., 2002; Lorenzi & Matos, 2008; Frescura et al., 2013). No entanto, assim como a composição, o rendimento do óleo também

pode variar em função de fatores genéticos e ambientais, uma vez que esse é produzido a partir do metabolismo secundário das plantas quando essas são submetidas a algum tipo de estresse (Ferrari et al., 2011).

Dentre as condições de estresse, podemos citar altas concentrações de sais em soluções nutritivas, podendo ocasionar alterações bioquímicas e fisiológicas, implicando, dessa forma, em mudanças na absorção de água e nutrientes que afetam o crescimento da planta e, em alguns casos dependendo da duração do estresse pode causar até a morte (Saíram & Tyagi, 2004; Taiz & Zeiger, 2013; Beltrão et al., 1997).

Segundo Waterman & Mole (1994) o tempo em que a planta se encontra sob condições de estresse é um fator importante a ser considerado, uma vez que períodos menores em que as plantas ficam submetidas a tais condições podem favorecer um maior crescimento e um maior rendimento do óleo essencial. Não foram encontrados na literatura resultados indicando o efeito de diferentes períodos de salinidade no crescimento da planta e no rendimento do óleo essencial do alecrim.

O trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes períodos de salinidade sobre a fitomassa, teor e rendimento do óleo essencial de plantas de alecrim em cultivo sem solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em cultivo protegido na área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria no interior de um abrigo de polietileno. Os períodos dos experimentos foram de junho a dezembro de 2014 (experimento I) e de junho de 2014 a fevereiro de 2015 (experimento II). Segundo a classificação de Koppen, a região caracteriza-se por apresentar clima Cfa, subtropical úmido sem estação seca definida (Alvares et al., 2014; Koppen, 1948).

Durante o período dos experimentos a temperatura média do ar e radiação solar global acumulada foram coletadas diariamente por uma estação meteorológica automática cerca de 300 metros de distância. Os valores médios para essas variáveis foram, respectivamente, 13,9 °C e 249,82 MJ.m⁻² em junho; 15,10°C e 329 MJ.m⁻² em julho; 15,9 °C e 433,8 MJ.m⁻² em agosto; 18,4 °C e 484,66 MJ.m⁻² setembro; 22,5 °C e 670 MJ.m⁻² outubro; 23,1 °C e 684 MJ.m⁻² em novembro; 23,22°C

e 629,73 MJ.m⁻² em dezembro; 24,22°C e 653,31 MJ.m⁻² em janeiro e 23,20°C e 582,3 MJ.m⁻² em fevereiro.

O dispositivo para cultivo das plantas foi constituído de bancadas com telhas de fibrocimento, revestidas com filme transparente de polietileno de baixa densidade com espessura de 100 µm. As telhas apresentavam 4 m de comprimento, 1 m de largura, e 0,8 m de altura, apoiadas a uma estrutura de alvenaria formando uma declividade de 1 % (Gimenez, 2007). Sobre os canais das telhas (0,06 m de altura e 0,18 m) foram colocados britas basáltica média utilizada na construção civil, de tamanho de partículas entre 0,015 m e 0,020 m. As mudas de alecrim por sua vez foram adquiridas no comércio local e plantadas em vasos de polipropileno de 3dm³ preenchidos com areia lavada. Os vasos foram dispostos sobre as bancadas em três fileiras, na distância de 30 cm entre fileiras e de 35 cm entre os vasos na fileira, totalizando 33 vasos por tratamento com uma planta por vaso.

No experimento I (Figura 1) foram realizados cinco tratamentos constituídos por quatro períodos de salinidade e a testemunha. Na testemunha (T1) foi utilizada uma condutividade elétrica de 1,0 dSm⁻¹ e nos demais quatro tratamentos a condutividade elétrica da solução nutritiva foi de 5,0 dSm⁻¹, definida com base nos resultados de Frescura (2014). Em T2 as plantas ficaram submetidas à solução salina por um período de 140 dias, em T3 por um período de 150, em T4 e em T5 por períodos de 160 e 170 dias, respectivamente. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de dezembro, completando então um ciclo de 190 dias. Dessa forma, o período de salinidade nos quais as plantas ficaram submetidas antes da coleta foi de 50, 40, 30 e 20 dias em T2, T3, T4 e T5, respectivamente (Figura 1).

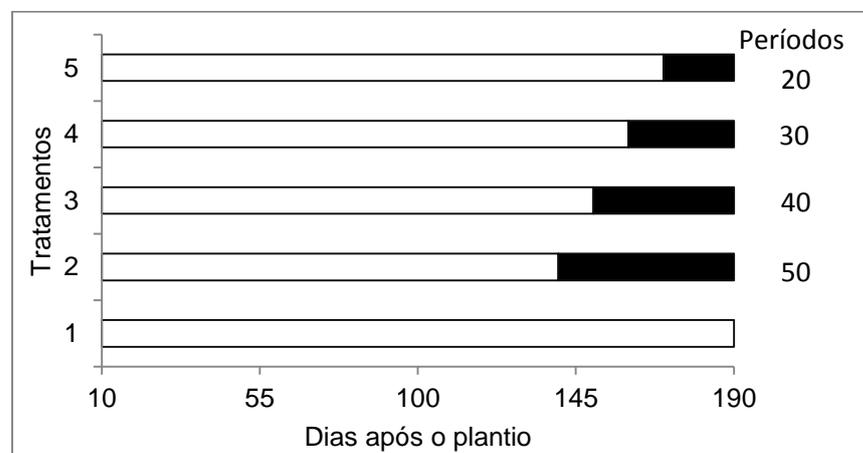


Figura 1- Experimento I. Esquema dos diferentes tratamentos (períodos de salinidade), em que as plantas de *Rosmarinus officinalis* ficaram submetidas, até o dia da coleta (190 dias após o plantio). Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

No experimento II também foram utilizados cinco tratamentos constituídos por quatro períodos de salinidade e a testemunha. O plantio foi feito concomitantemente ao experimento I (03/06/2014) e a aplicação da solução salina iniciou-se nos mesmos dias do experimento I, porém a coleta foi retardada de forma a aumentar o período de salinidade. Na testemunha (T1) foi utilizada uma condutividade elétrica de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ e nos demais quatro tratamentos a condutividade elétrica da solução nutritiva foi de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$, em procedimento idêntico àquele empregado no experimento I. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de fevereiro de 2015. Dessa forma, a duração do período de salinidade antes da coleta foi de 110, 100, 90 e 80 dias em T2, T3, T4 e T5, respectivamente (Figura 2). Em ambos os experimentos o delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

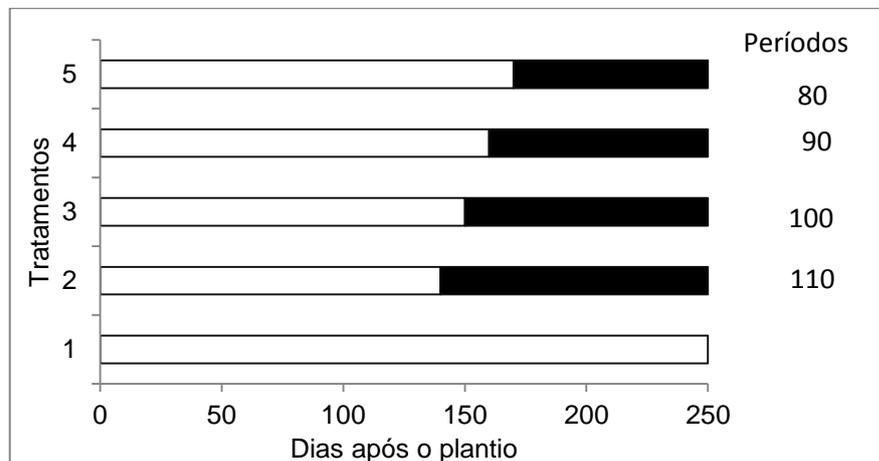


Figura 2- Experimento II-Esquema dos diferentes tratamentos (períodos de salinidade), em que as plantas de *Rosmarinus officinalis* ficaram submetidas, até o dia da coleta (250 dias após o plantio). Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Foi empregada a solução nutritiva descrita por Frescura (2014) com a seguinte composição iônica mmol.L^{-1} : 8,3 de NO_3^- ; 1,0 de NH_4^+ ; 0,7 de H_2PO_4^- ; 5,0 de K^+ ; 1,5 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 e 1,0 mg.L^{-1} de Fe na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes nitrato de potássio, fosfato monopotássico, nitrato de cálcio (Calcinit®) e sulfato de magnésio.

O fornecimento da solução nutritiva foi através de mangueira gotejadora conectada a uma bomba submersa no interior do reservatório, acionada por um programador horário (temporizador). Para cada fileira de vaso foi distribuída uma fita gotejadora, de modo que fique um gotejador para cada vaso. Sendo empregado um coeficiente de drenagem não inferior a 30% em cada fertirrigação e a solução dre-

nada foi recolhida e retornada ao reservatório de origem, em sistema fechado. Foram feitas de uma a quatro fertirrigações diariamente de forma a repor os volumes de água transpirados pelas plantas.

A condutividade elétrica permaneceu próximo ao valor inicial, tolerando-se um desvio de 10 %, utilizando para suas possíveis correções, água ou alíquotas de nova solução nutritiva, dependendo da necessidade. O pH foi mantido entre 5,5 e 6,5 tolerando-se um desvio de 0,2 unidades, mediante adição de NaOH ou H₂SO₄ na concentração 1 N, conforme a necessidade. A solução nutritiva foi completada sempre que o volume for igual ou inferior a 50 % do volume original.

As coletas das plantas foram feitas aos 190 (experimento I) e 250 (experimento II) dias após o plantio, nas quais foram coletadas dez plantas por tratamento em cada experimento. As plantas foram avaliadas quanto à produção de fitomassa e óleo essencial.

Nas coletas as ramificações foram cortadas imediatamente após a terceira gema axilar visível. As folhas foram separadas das hastes, a massa fresca foi determinada imediatamente após a coleta e a massa seca após secagem em estufa de circulação forçada de ar, na temperatura de 60 °C, até obter massa constante entre duas determinações sucessivas.

Para a extração do óleo essencial, as folhas após coletadas foram armazenadas em freezer com temperatura de aproximadamente 4 °C. A extração foi feita no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando o processo de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger durante 3 horas (Farmacopéia Brasileira, 2000). O óleo foi seco sobre sulfato de sódio anidro e, após filtração, foi armazenado a 4 °C, de acordo com a metodologia. O rendimento do óleo essencial foi calculado a partir da relação entre a massa de folhas da planta e a massa de óleo e o teor foi calculado a partir de uma relação entre a massa de óleo essencial e a fitomassa da amostra.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste F foram analisadas por regressão polinomial ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados das plantas submetidas a diferentes períodos de salinidade foram expressos em fração relativa dos resultados das plantas testemunhas para cada uma das variáveis determinadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento I, cuja coleta foi realizada 190 dias após o plantio, a massa fresca e seca não diferiram significativamente entre os tratamentos. As médias foram de 179,5 e 54 g.planta⁻¹, respectivamente. No entanto houve diferenças significativas entre os tratamentos no experimento II, no qual a coleta foi realizada 250 dias após o plantio. Quanto ao rendimento e ao teor do óleo essencial, houve diferença significativa entre os tratamentos nos dois experimentos.

A massa fresca e seca no experimento II decresceu linearmente com o aumento do período de salinidade (Figura 3). As plantas que permaneceram por um período de 110 dias sob condições salinas alcançaram 170 g.planta⁻¹, o que corresponde a 79 % do crescimento das plantas testemunhas (215 g.planta⁻¹). A massa seca também decresceu linearmente, e aos 110 dias sob condições salinas as plantas atingiram aproximadamente 70 % (59 g.planta⁻¹) da massa seca das plantas testemunhas.

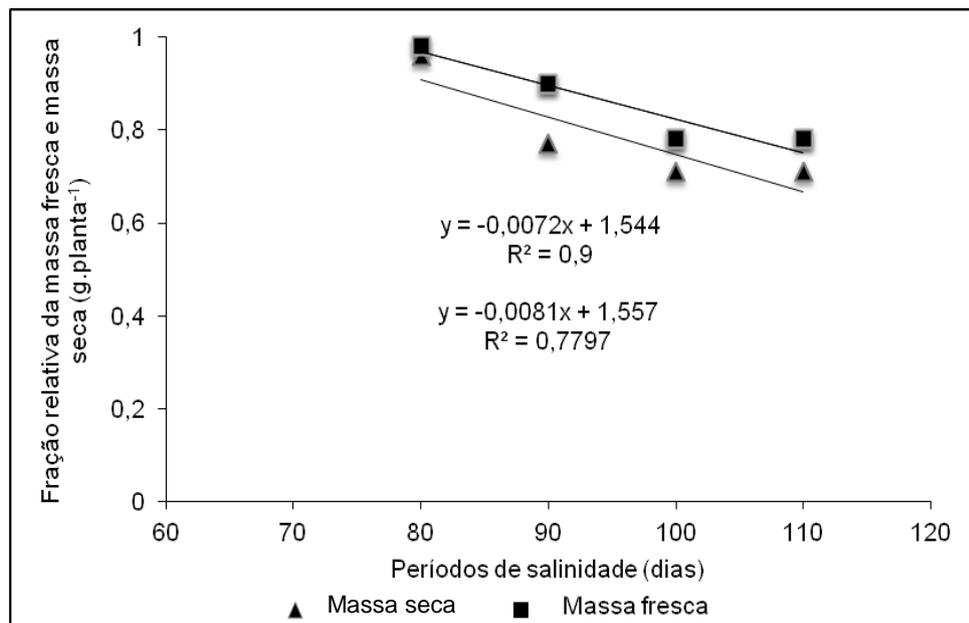


Figura 3- Fração relativa da massa fresca e massa seca das folhas *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A produção máxima de fitomassa seca foi de aproximadamente 83g nas plantas testemunhas que foram colhidas aos 250 dias após o plantio. Essa produção superou àquela obtida por Frescura et al. (2014) em cultivo sem solo no mesmo local, que foi de 68,69 g. Também foi observado o incremento na massa seca de alecrim,

comparado proporcionalmente ao tempo de cultivo, em relação ao estudo realizado por May et al. (2010), quando este cultivou o alecrim em solo no estado de São Paulo. Esses resultados indicam que a produção do alecrim em ambiente protegido sem solo pode ser uma boa alternativa, para o cultivo dessa espécie, podendo vim a atender a demanda do comércio.

A diminuição da produção de fitomassa motivada por condições adversas também foi observada na espécie de plantas do gênero *Plectranthus*, onde o uso da água com níveis crescentes de condutividade elétrica (0,7; 1,9; 3,1; 4,3 e 5,5 dS m⁻¹) associadas a diferentes níveis de radiação promoveu reduções significativas na matéria seca das plantas, ou seja, a maior condutividade elétrica da água promoveu uma redução no crescimento das plantas (Freitas et al., 2014). Entretanto, a redução relatada nesse, foi inferior ao encontrada no presente trabalho, já que a espécie *P. grandis* apresentou uma perda percentual de 34,76% de massa seca quando esta foi cultivada em condutividade elétrica de aproximadamente 4,5 dSm⁻¹ sob tela-do. Frescura (2014), em condições semelhantes de cultivo do alecrim também observou uma redução na fitomassa com o aumento da salinidade.

O teor do óleo essencial decresceu linearmente em ambos os experimentos (Figuras 4 e 5). Esses valores foram inferiores ao encontrados por Frescura (2014) que avaliando o teor de óleo essencial do alecrim em diferentes concentrações de solução nutritiva em ambiente protegido fora do solo obteve um valor máximo de aproximadamente 2,69 %.

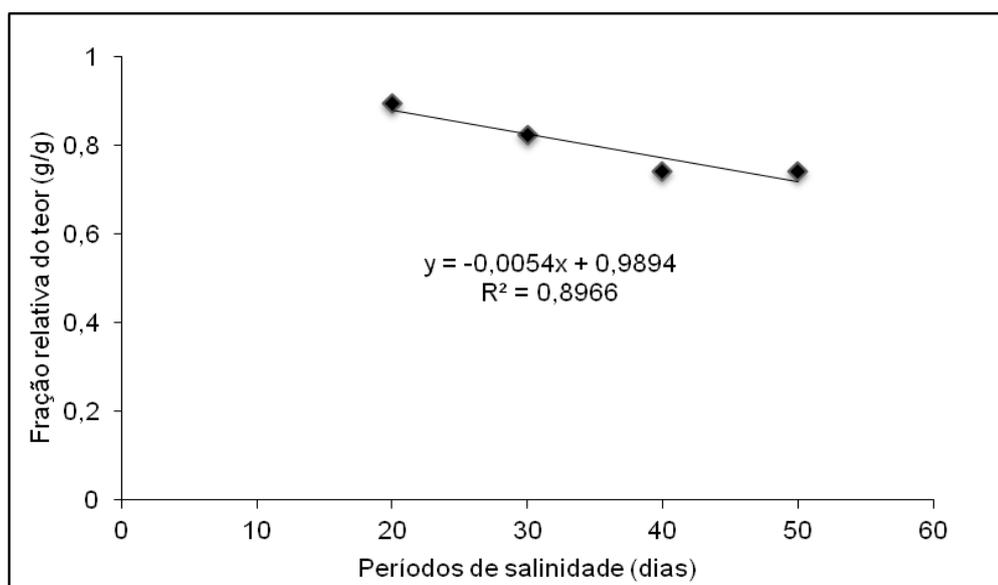


Figura 4- Fração relativa do teor de óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 190 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

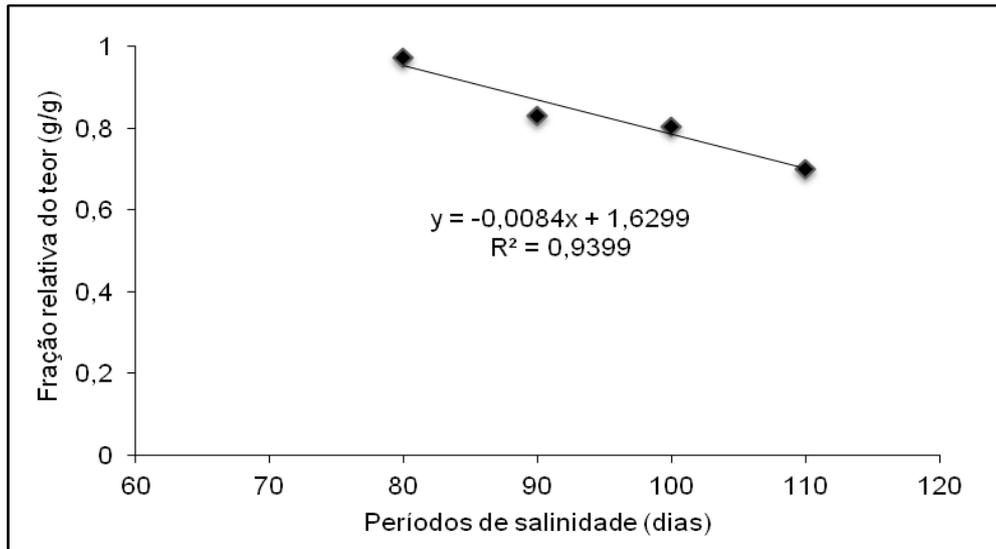


Figura 5- Fração relativa do teor de óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Para o rendimento do óleo essencial observa-se na figura 6 (experimento I), que quando as plantas permaneceram 50 sob condições de salinidade, as plantas alcançaram um rendimento de óleo essencial de 68 % ($1,04 \text{ g.planta}^{-1}$) em relação ao a testemunha ($1,51 \text{ g.planta}^{-1}$). Frescura (2014) avaliando o rendimento do óleo essencial do alecrim em cultivo sem solo com diferentes concentrações de nitrogênio obteve um rendimento máximo de $1,53 \text{ g.planta}^{-1}$ de plantas com idade de 180 dias. Obtendo-se assim um rendimento semelhante ao encontrado no presente trabalho.

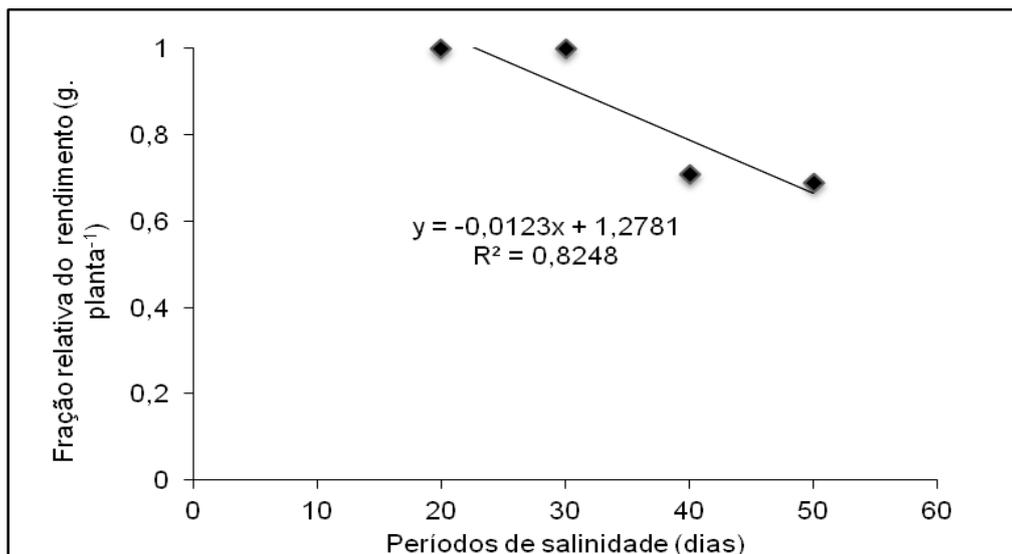


FIGURA 6- Fração relativa do rendimento do óleo essencial das folhas *Rosmarinus officinalis* coletadas aos 190 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

May et al. (2010) avaliando o rendimento do óleo essencial em cultivo no solo no Estado de São Paulo, obteve um rendimento de 0,75%, ou seja, rendimento menor do que o do presente trabalho cujo rendimento máximo foi de aproximadamente 0,85%.

No experimento II, também houve um decréscimo linear no rendimento de óleo à medida que o período de salinidade aumentava (Figura 7). As plantas que permaneceram cultivadas sob condições salinas durante 100 e 110 dias, respectivamente alcançaram um rendimento de aproximadamente 70 e 50% das testemunhas. Esses resultados diferem dos encontrados por outros autores em outras espécies. Em Manjeriçã (*Ocimum basilicum* L.) cultivado sob diferentes períodos de suspensão de irrigação, em cultivo sem solo, Leonardo (2007) observou que o rendimento do óleo essencial foi diretamente proporcional ao aumento do período de suspensão da irrigação. Pinto et al. (2014) estudando diferentes níveis de estresse hídrico em Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), observaram que o estresse mais acentuado, ou seja aquele que recebeu a menor lâmina de irrigação durante todo o ciclo, foi o que obteve maior rendimento do óleo essencial.

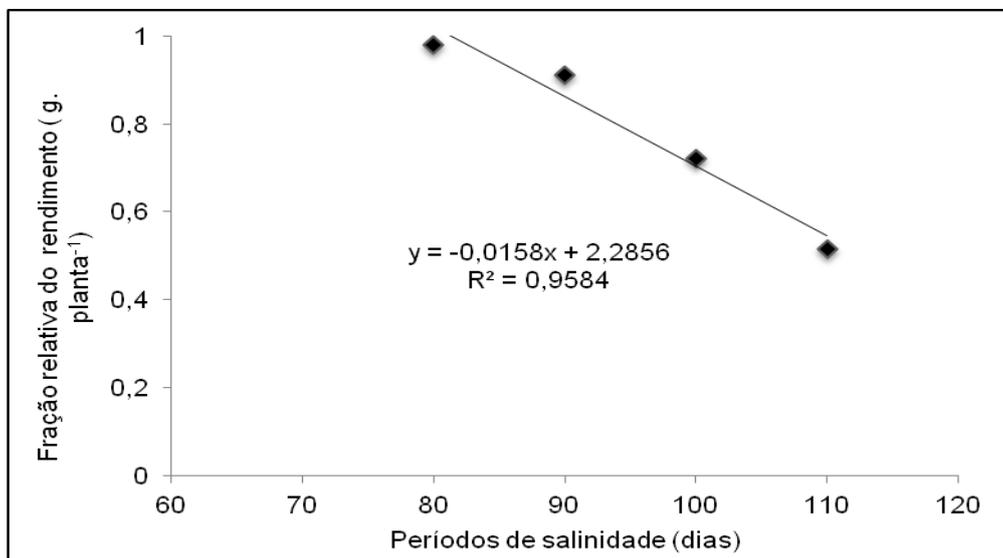


Figura 7- Fração relativa do rendimento do óleo essencial das folhas *Rosmarinus officinalis* coletada aos 250 dias após o plantio, cultivadas sob diferentes períodos de salinidade. Santa Maria, RS, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Estudos como o de Gobbo Neto & Lopes (2007) têm relacionado os óleos essenciais com a produção de metabólitos secundários como uma resposta da planta às condições ambientais adversas para o crescimento. Entretanto, além de fatores ambientais aqueles genéticos também afetam a produção dessas substân-

cias. O presente estudo indica que a produção de óleo essencial pelas plantas de alecrim não é favorecida por condições de salinidade, ao contrário da grande parte das espécies medicinais e aromáticas para as quais condições adversas aumentam essa produção (Morais, 2009).

É possível observar que o rendimento do óleo essencial do alecrim independe do período de salinidade, para os quais as plantas ficaram submetidas e da idade da planta, tendo em vista que não houve diferenças significativas em relação a essa variável analisada quanto à permanência dessas plantas a períodos distintos de salinidade, bem como, quando as coletas que foram feitas aos 190 e 250 dias após o plantio.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que alta condutividade elétrica da solução nutritiva (5 dSm^{-1}), ou seja, solução salina, induziu reduções significativas no crescimento do alecrim. Em contrapartida o cultivo em ambiente protegido sem solo mostrou-se uma boa alternativa para a produção de fitomassa da planta, uma vez que as plantas que não foram submetidas à salinidade, ou seja, foram cultivadas com solução nutritiva de 1 dSm^{-1} , apresentaram bons rendimentos, tendo em vista que o rendimento do óleo alcançado no presente estudo foi semelhante ao encontrado na Espanha, um dos maiores produtores da cultura (Biasi & Deschamps, 2009). Esse aumento no rendimento pode estar relacionado à minimização dos efeitos das condições ambientais adversas que é proporcionado pelo cultivo em ambiente protegido, fazendo com que o ciclo da cultura seja reduzido, o que possibilita a realização de pelo menos duas colheitas em aproximadamente 365 dias, aumentando assim a oferta de matéria prima para comércio. O período de salinidade através de uma solução nutritiva com condutividade elétrica de 5 dS m^{-1} reduz linearmente a fitomassa, teor e rendimento de óleo essencial de plantas de alecrim em cultivo sem solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, C.A, et al. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728. 2014. Disponível em: <<https://www.schweizerbart.de/journals/metz>>. Acesso em: 28 nov. 2015.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS. **Descrição de algumas plantas aromáticas**. In: Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial. 1ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora, 2009, p. 33-38.

BLANCO, F.F. Doses de N e K no tomateiro sob estresse salino: III. Produção e qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.12, n.2, p.122–127, 2008.

BELTRÃO, J. et al. Lettuce yield response to salinity of sprinkle irrigation water. **Acta Horticulturae**, v. 449, p. 623-627, 1997.

BOZIN, B, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. Lamiaceae) essential oils. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7879-7885, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ed, Atheneu: São Paulo, 2000.

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

FOGAÇA, M.A. et al. Concentração de nitrogênio na solução nutritiva na produtividade e qualidade de frutos de melão cultivado em substrato. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.72-78, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782007000100012&ing=pt&nrm=isso&tlng=pt> Acesso em: 26 nov. 2015.

FREITAS, M.A.C. et al. Crescimento e tolerância à salinidade em três espécies medicinais do gênero *Plectranthus* expostas a diferentes níveis de radiação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.4, p.839-849, 2014.

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

FRESCURA, V.D.S. **Parâmetros fitoquímicos, genotóxicos de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

GIMENEZ, G. 2007. Produção de mudas de morangueiro em hidroponia. In: Andriolo, J.L. (ed). SEMINÁRIOS SOBRE O CULTIVO HIDROPÔNICO DE MORANGUEIRO, Santa Maria, RS, Anais...Santa Maria: UFSM, p.18-29.

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.

KÖPPEN, W. Climatologia. México, DF: Fundo de Cultura Económica. 1948. 71p.

LEONARDO, M. **Produção de óleo essencial associado à deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L. cv. genovese**. 2007. 132p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, 512p

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

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 Mediciniais**, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.4050-4063, 2009. CD-ROM.

PINTO, D.A., et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.1, p.51-64, 2014.

SAIRAM, R.K.; TYAGY, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v.86, n.3, p.407-421, 2004.

SANTOS, O.S. **Cultivo sem solo**: hidroponia. 1ed. Santa Maria: UFSM/CCR, 2000. 107p.

SERAFINI, L.A. et al. **Óleos essenciais**: Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. 1ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 55p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 918p.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 238p

ARTIGO 2

Composição fitoquímica, efeito antiproliferativo e genotóxicidade do óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cultivado sob diferentes períodos de salinidade

RESUMO: Este estudo teve como objetivo, identificar a composição química do óleo essencial de alecrim cultivado em diferentes períodos de salinidade, bem como seu efeito antiproliferativo e genotóxico sobre o material genético de *Allium cepa* L. As plantas foram cultivadas em abrigo de polietileno no departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, sob diferentes períodos de salinidade. Na testemunha (T1) foi utilizada condutividade elétrica de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ e nos demais quatro tratamentos a condutividade elétrica da solução nutritiva foi de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$. Em T2 as plantas ficaram submetidas à solução salina por um período de 140 dias, em T3 por um período de 150, em T4 e em T5 por períodos de 160 e 170 dias, respectivamente. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de dezembro de 2014, 190 dias após o plantio (DAP). Foi realizada extração de óleo das folhas por hidrodestilação em Clevenger e posteriormente realizada cromatografia gasosa. O óleo essencial foi avaliado quanto ao efeito antiproliferativo e genotóxico em células de *Allium cepa* na concentração de 0,20 % para os óleos das plantas cultivadas nos diferentes períodos de salinidade. Foram utilizados quatro bulbos de *A. cepa*, por tratamento. Esses bulbos foram colocados em água destilada para enraizarem e depois de emitidas as raízes os bulbos foram transferidos para os tratamentos ficando as raízes submersas nos tratamentos por 24 horas com exceção do controle (T1) que ficou em água destilada. A seguir, as raízes foram coletadas e fixadas em fixador Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por mais 24 horas e em seguida transferidas para etanol 70 % e armazenadas sob refrigeração até o preparo das lâminas. As preparações das lâminas foram feitas pela técnica de esmagamento e coradas comorceína acética 2 %. Foi utilizada como controle negativo a água destilada e como controle positivo o glifosato 2,0 %, Os dados foram submetidos ao teste de Sott-Knott ($p < 0,05$). Os compostos majoritários do óleo essencial foram cânfora, 1,8 cineol, verbenone, α -pinene e β -myrcene. E esses, por sua vez não se mostraram genotóxicos e nem apresentaram efeito antiproliferativo significativo, com exceção daquele obtido a partir das plantas que permaneceram por um maior período sob condições de salinidade, que inibiram a divisão celular, podendo assim aumentar interesse para a produção de fármacos.

Palavras-chave: *Allium cepa*; índice mitótico; alterações cromossômicas.

ABSTRACT: Phytochemical composition, antiproliferative effect and genotoxicity of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) grown under different periods of salinity. This study aimed to identify the chemical composition of essential oil of rosemary grown in different periods of salinity and its antiproliferative and genotoxic effect on the genetic material of *Allium Cepa* L. Plants were grown in polyethylene under the Department of Plant Science the Federal University of Santa Maria, in different periods of salinity. In the control (T1) was used an electric conductivity of 1.0

dSm⁻¹ and the other four treatments the electrical conductivity of the nutrient solution was 5.0 dSm⁻¹. T2 plants were submitted to the salt solution for a period of 140 days at T3 for a period of 150 at T4 and T5 for periods of 160 and 170 days, respectively. All plants were collected on 12/12/2104 at 190 DAP. The Extraction of oil from the leaves by hydrodistillation in Clevenger was performed and then performed gas chromatography. The essential oil was evaluated for antiproliferative and genotoxic effects in cells of *Allium Cepa* at a concentration of 0.20% for oil from plants grown in different durations of salt stress collected at 190 after planting. Was used four *A.cepa*. bulbs per treatment. These bulbs were placed in distilled water and after rooted were transferred to the treatments for 24 hours except for the control (T1) which was in distilled water. After completion of the 24 hours, the roots were collected and fixed in Carnoy fixative 3: 1(ethanol: acetic acid) for 24 hours and then transferred to 70 % ethanol and stored under refrigeration until preparation of the slides. The preparations the blades were made by of the crushing technique and stained with 2 % acetic orcein. Distilled water was used as a negative control and as positive control glyphosate 2.0 % The data were submitted to the test Sott-Knott ($p < 0.05$). The majority compounds of the essential oil were camphor, 1.8 cineol, verbenone, α -pinene and β -myrcene. And this oil in turn was not genotoxic and not showed significant antiproliferative effect, except than that was obtained from the plants have remained for a longer period under saline conditions which inhibit cell division, and may thereby increase interest for the production of pharmaceuticals.

Key words: *Allium cepa*; mitotic index; chromosomal alterations

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas medicinais já eram utilizadas pelo homem, para o tratamento de diversas doenças. (Feijó et al., 2012). E, nos últimos anos o consumo dessas vem crescendo, principalmente pelo fato dos altos custos dos medicamentos industrializados, e a falta de assistência médica. Fazendo com que as populações mais carentes busquem nas plantas uma alternativa para a cura de algumas enfermidades (Brasilero et al., 2008; Battisti, 2013).

Uma espécie, que é bastante utilizada pela população é o *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecida como alecrim (Ferrari et al., 2011). Essa por sua vez tem um vasto uso terapêutico, devido à elevada quantidade de princípios ativos. Segundo Diniz & Ribeiro (2008) e Ferrari et al. (2011), o alecrim é utilizado como anti-séptico, cicatrizante, digestivo, estimulante, desintoxicante, diurético, além de combater elevados níveis de colesterol e fortalecer o sistema imunológico (Beewick, 1998). Esta espécie tem como principal produto o óleo essencial que é resultado do metabolismo secundário das plantas, sendo esse muito utilizado na indústria de

cosmético e na indústria alimentícia como um antioxidante natural. (Bertolin et al., 2010; Bozin et al., 2007).

No entanto, deve-se ter cautela na utilização desses produtos naturais, tendo em vista que a maioria não possui estudos suficientes, em relação ao efeito dessas substâncias sobre a divisão celular e material genético de um organismo alvo. Principalmente pelo fato de que se tratando de metabólitos secundários sabe-se que a composição desses pode variar conforme as condições em que a planta se desenvolve, ou seja, dependendo das condições de cultivo os teores de alguns compostos podem ser alterados, podendo modificar o efeito dessas substâncias no material genético. Sendo então de fundamental importância estudar o efeito do óleo essencial extraídos de plantas cultivadas em diferentes condições de cultivo sob a divisão celular e material genético, para que dessa forma seja possível orientar a população quanto ao seu uso seguro e eficaz. (Frescura, 2014; Fachineto & Tedesco, 2009)

Segundo Pasqualli et al. (2015), Frescura et al. (2013) e Tedesco & Laughinghouse (2012) um dos testes que vem sendo utilizado para a avaliação do efeito genotóxico e do efeito antiproliferativo de algumas substâncias é sistemas testes de *Allium cepa*. Esse teste já foi utilizado por vários pesquisadores que compararam os resultados desses com o de testes em animais *in vitro*, obtendo-se resultados semelhantes, demonstrando assim sua eficiência (Camparoto et al. 2002, Teixeira et al. 2003, Pinho et al. 2010).

Luz et al. (2012) avaliando o potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste de *Allium cepa* e no teste de micronúcleo em medula óssea de roedores também observaram resultados semelhantes para ambos os testes.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o de identificar a composição química do óleo essencial de alecrim cultivado em diferentes períodos de salinidade assim como avaliar seu efeito genotóxico e antiproliferativo.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de alecrim foram cultivadas em estufa de polietileno de baixa densidade com espessura de 100 µm, no departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no período de junho a dezembro de 2014.

As mudas foram adquiridas em comercio local e transplantadas para os vasos de 3 dm³, que foram preenchidos com areia lavada e colocados sobre as bancadas

sendo essas constituídas de telhas de fibrocimento, de forma que em cada bancada ficassem 33 vasos. Em cada uma das cinco bancadas foram instalados reservatórios com capacidade de 500L para a estocagem da solução nutritiva.

Para as fertirrigações foram instaladas fitas gotejadores que eram acopladas a uma bomba de aquário no interior do reservatório que constava a solução nutritiva. As fitas gotejadoras ficaram dispostas de maneira que cada gotejador ficasse por vaso. A fertirrigação foi feita diariamente para repor o volume de água transpirado pelas plantas e essa por sua vez era controlada por um programador horário. O sistema empregado é considerado fechado, já que a solução drenada era recolhida e retornada ao reservatório de origem.

A solução nutritiva utilizada foi a descrita por Frescura (2014) com a seguinte composição iônica mmol.L^{-1} : 8,3 de NO_3^- ; 1,0 de NH_4^+ ; 0,7 de H_2PO_4^- ; 5,0 de K^+ ; 1,5 de Ca^{2+} ; 1,25 de Mg^{2+} e 1,25 de SO_4^{2-} . Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações em mg.L^{-1} , de 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn e 1,0 mg.L^{-1} de Fé na forma quelatizada. Os macronutrientes foram fornecidos através dos fertilizantes nitrato de potássio, fosfato monopotássico, nitrato de cálcio- Calcinit® e sulfato de magnésio.

Foram utilizados cinco tratamentos constituídos por quatro períodos de salinidade e a testemunha. Na testemunha (T1) foi utilizada uma condutividade elétrica de $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ e nos demais quatro tratamentos a condutividade elétrica da solução nutritiva foi de $5,0 \text{ dSm}^{-1}$, definida com base nos resultados de Frescura (2014). Em T2 as plantas ficaram submetidas à solução salina por um período de 140 dias, em T3 por um período de 150, em T4 e em T5 por períodos de 160 e 170 dias, respectivamente. Todas as plantas foram coletadas no dia 12 de dezembro, completando então um ciclo de 190 dias. Dessa forma, o período de salinidade nos quais as plantas ficaram submetidas antes da coleta foi de 50, 40, 30 e 20 dias em T2, T3, T4 e T5, respectivamente.

A condutividade elétrica das soluções nutritivas foi mantida próximo ao valor inicial, sendo corrigidas quando havia um desvio de 10 % para mais ou para menos. As correções eram feitas com acréscimos de água ou alíquotas de nova solução nutritiva, dependendo da necessidade. O pH foi mantido entre 5,5 e 6,5 tolerando-se um desvio de 0,2 unidades, mediante adição de NaOH ou H_2SO_4 na concentração 1N, conforme a necessidade.

As coletas foram feitas aos 190 dias após o plantio, nas quais foram coletadas as folhas de cinco plantas por tratamento para a extração do óleo essencial. Assim que foram colhidas, estas folhas foram armazenadas em freezer à temperatura de 4°C, até o momento da extração.

Para a extração do óleo essencial foram preparadas quatro amostras compostas de 50 g de cada tratamento a partir das folhas coletadas, constituindo assim quatro repetições. E em seguida foram levadas ao Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Santa Maria, para ser realizada a extração do óleo essencial utilizando o processo de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger durante 3 horas, utilizando-se 50 g de folhas, em quatro repetições. O óleo foi seco sobre sulfato de sódio anidro e, após filtração, foi armazenado a 4 °C .

Depois de extraído, o óleo foi diluído a uma concentração de 0,20 % e levado ao Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências de Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, para a realização da análise cromatográfica. A análise do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em chama (CG-FID) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) utilizando uma coluna capilar de 30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 mm e hélio sendo empregado como o gás de arraste.

A identificação dos componentes foi realizada com base no índice de retenção (IR), determinada com referência da série homóloga de n-alcenos, 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).

Para a avaliação do efeito do óleo essencial sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa*, o óleo essencial utilizado foi diluído em etanol, obtendo-se a concentração de 0,20 %. A avaliação do efeito do óleo essencial de *R. officinalis* sobre o ciclo celular e material genético de *A. cepa* foi realizada no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas na Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizados oito grupos de quatro bulbos, constituindo assim oito tratamentos com quatro repetições cada.

Os bulbos foram colocados em água destiladas por aproximadamente 72 horas, para enraizarem e depois de emitidas as raízes, os bulbos foram transferidos para os tratamentos descritos na tabela 1, ficando as raízes submersas nos tratamentos por 24 horas com exceção do controle (T1) que ficou em água destilada. Completada às 24 horas, às raízes foram coletadas e fixadas em fixador Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por mais 24 horas e em seguida transferidas para etanol 70 % e armazenadas sob refrigeração até o preparo das lâminas.

Foi utilizada como controle negativo a água destilada e como controle positivo o glifosato 2,0 %, que por sua vez já demonstrou induzir alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* (Souza et al. 2010; Frescura et al. 2012) além de um controle em etanol, pois o óleo foi diluído em etanol para obtenção da concentração de 0,20 %.

As preparações das lâminas foram feitas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2 % (Guerra & Souza, 2002). Sendo utilizado para a análise das lâminas um microscópio ótico com o aumento de 40 X. Foi feita a contagem de células em interfase e divisão celular, e observadas às alterações cromossômicas totalizando 4000 células por tratamento, então calculado o índice mitótico (IM) baseando-se na porcentagem de células em divisão e as porcentagens de alterações cromossômicas. As alterações cromossômicas foram analisadas observando-se as células durante a interfase e divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), verificando os tipos de irregularidades ocorridas durante esse período.

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

TABELA 1: Tratamentos utilizados para avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de *Rosmarinus officinalis* pelo teste de *Allium cepa*.

T1= Água destilada
T2= Glifosato 2,0%
T3= Etanol
T4= Óleo 0,20% (CE de 1,0 dSm ⁻¹ até a coleta)
T5= Óleo 0,20% (CE de 5,0dSm ⁻¹ com início aos 50 dias antes da coleta)
T6= Óleo 0,20% (CE de 5,0dSm ⁻¹ com início aos 40 dias antes da coleta)
T7= Óleo 0,20% (CE de 5,0dSm ⁻¹ com início aos 30 dias antes da coleta)
T8= Óleo 0,20% (CE de 5,0dSm ⁻¹ com início aos 20 dias antes da coleta)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os efeitos antiproliferativo e genotóxico do óleo essencial de Alecrim a uma concentração de 0,20 % foram avaliados através do sistema teste vegetal de *A. cepa*. O número de células em interfase, e em mitose e o índice mitótico (IM), são mostrados na tabela 2.

TABELA 2: Média do índice mitótico (IM) de células de *Allium cepa* em interfase e mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
Água destilada (T1)	3640	190	50	31	89	10,27a
Glifosato 2,0% (T2)	3751	76	94	22	57	6,20b
Etanol (T3)	3873	66	22	6	33	3,17c
Óleo 0,20% (T4)	3721	99	53	32	95	8,35a
Óleo 0,20% (T5)	3739	134	46	30	51	7,20b
Óleo 0,20% (T6)	3692	138	54	35	81	8,42a
Óleo 0,20% (T7)	3713	96	39	27	125	8,15a
Óleo 0,20% (T8)	3714	129	33	20	104	8,42a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro; T1= água destilada; T2= glifosato 2,0%; T3= etanol; T4= condutividade elétrica de 1dSm^{-1} ; T5= período de 50 dias sob condições salinas; T6= período de 40 dias sob condições salinas; T7= período de 30 dias sob condições salinas; T8= período de 20 dias sob condições salinas. CV%= 16.70.

Observa-se que o único tratamento de óleo essencial que diferiu estatisticamente do controle negativo (água destilada) foi o T5, ou seja, as plantas que foram cultivadas em um maior período de salinidade, produziram um óleo essencial que na concentração de 0,20 % inibiu a divisão celular de *Allium cepa*, levando a uma redução dos valores dos índices mitóticos, indicando por sua vez atividade antiproliferativa do óleo essencial da espécie. No entanto para os demais tratamentos não foram observados efeito antiproliferativo, já que o índice mitótico (IM), desses não diferiram da água destilada.

Frescura (2014), avaliando o óleo essencial do alecrim nas concentrações de 3 e 10 %, observou uma redução na divisão celular de *Allium cepa*, no entanto na concentração de 10 % o efeito antiproliferativo foi maior. Resultado semelhante também foi encontrado por Stojanović-Radić et al (2010), quando analisaram o efeito do óleo essencial de alecrim sobre células de raízes de *A. cepa*.

Esses resultados podem estar relacionados à composição química do óleo essencial, que conforme a tabela 3, apesar de todos os tratamentos terem obtidos os mesmos compostos majoritários, como a cânfora, 1,8 cineol, verbenona, α -pineno e β -mirceno, no T2, foram encontrados teores de α -terpineno de 19 a 100 % a mais do que os demais tratamentos, assim também como o composto naftaleno, o qual teve sua concentração de 13 a 70 % superior aos diferentes tratamentos. Pode-se observar também que o óleo das plantas que ficaram submetidas a um maior período de salinidade alcançaram maiores teores de α -cafeol, eugenol, verbenone e borneol. Portanto, essas substâncias em conjunto e em maiores quantidades podem ter causado o efeito antiproliferativo no óleo essencial de alecrim extraído.

TABELA 3: Composição química do óleo essencial de alecrim, nos diferentes períodos de salinidade.

Compostos (%)	RI ^a	RI ^b	T1	T2	T3	T4	T5
			0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
α -pineno	940	939	8.41	9.82	10.15	9.87	10.26
α -cafeol	951	953	2.97	3.05	2.98	1.63	1.17
Verbenone	967	967	0.02	0.23	0.19	0.21	0.15
β -pineno	979	980	0.95	1.17	1.03	1.14	1.26
β -mirceno	995	991	7.33	9.75	8.45	10.27	11.23
α -felandreno	1006	1005	0.08	0.32	0.29	0.18	0.42
α -terpineno	1017	1016	-	0.16	0.08	0.07	0.13
p-cimeno	1025	1026	3.71	2.49	2.93	2.34	1.97
1.8 cineol	1033	1033	11.60	15.08	18.52	16.01	15.68
Cânfora	1146	1143	25.52	30.11	29.47	30.15	29.85
δ -terpineno	1060	1062	1.13	0.58	0.09	0.42	0.14
Linalol	1097	1098	0.39	1.05	0.67	1.18	-
Isoborneol	1154	1156	2.11	0.98	1.03	1.05	0.73
Borneol	1169	1166	1.25	4.04	3.86	2.71	1.64

Mentol	1173	1173	0.49	0.17	0.45	0.28	0.32
Terpin-4-ol	1175	1177	1.87	1.58	1.19	1.05	1.70
Naftaleno	1178	1179	0.09	0.31	0.27	0.13	0.15
α -terpineol	1190	1189	4.32	3.26	2.95	4.07	3.28
piperitol <cis>	1193	1193	0.18	0.23	0.20	0.29	0.25
Verbenona	1204	1204	10.45	10.69	11.03	10.45	12.06
Pulegona	1238	1237	-	0.11	0.08	-	0.14
Eugenol	1355	1356	0.34	1.07	0.59	0.63	0.97
Cedreno	1412	1411	-	0.16	0.31	0.58	1.03
Cariofileno	1417	1418	3.27	1.30	1.06	2.11	2.47
Aromadendreno	1441	1439	1.84	0.95	0.89	1.06	1.18
α -muuroleno	1498	1499	-	-	0.13	0.09	0.05
α -bisaboleno	1506	1504	1.06	0.43	0.06	-	0.62
Óxido de Cariofileno	1583	1581	2.07	1.05	0.92	1.06	0.95
Total identificado (%)			83.04	99.95	99.97	99.75	99.80

T1= água destilada; T2= glifosato 2,0%; T3= etanol; T4= Condutividade elétrica de 1dSm^{-1} ; T5= período de 50 dias sob condições salinas; T6= período de 40 dias sob condições salinas; T7= período de 30 dias sob condições salinas; T8 = período de 20 dias sob condições salinas.

Yuan et al. (2014) avaliando o efeito antiproliferativo do naftaleno associados a outros compostos, verificaram que esses promoveram um aumento da atividade antitumoral. Smeh-Skrbin et al. (2007) estudando a eficácia do naftaleno, no tratamento de pacientes com dermatite atópica, doença na qual é causada pelo aumento da proliferação celular, provou que esse composto tem efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos. Podendo assim o efeito antiproliferativo observado no tratamento em que as plantas ficaram submetidas a um maior período sob condições salinas ser atribuído a maiores teores deste composto. Segundo Fachinetti et al. (2007), é possível que concentrações mais elevadas de alguns compostos apresentem efeito inibitório no ciclo celular. No entanto, são necessários estudos da atuação individual dessas substâncias sobre organismos-alvo.

Frescura (2014) no município de Santa Maria, RS encontrou os mesmos compostos majoritários no óleo essencial do alecrim, cultivados em diferentes concentrações de solução nutritivas e doses de nitrogênio em ambiente protegido fora do solo.

Quanto ao efeito genotóxico do óleo essencial do alecrim cultivado em diferentes períodos de salinidade, observa-se a partir da tabela 4 que todos os tratamentos diferiram do glifosato 2,0 %, mostrando assim que o óleo essencial do alecrim obtido a partir de tais condições na concentração de 0,20 % não é genotóxico, ou seja, apesar de ter encontrado algumas alterações cromossômicas nos tratamentos, o número dessas alterações foram menores do que as encontradas no controle positivo (glifosato).

Resultados semelhantes foram encontrados por Frescura (2014) que a uma concentração de 3% de óleo essencial de alecrim observou poucas alterações cromossômicas comparadas ao glifosato. No entanto a concentração de 10 % do óleo essencial mostrou-se genotóxico.

TABELA 4: Tipos de alterações observadas em células de *Allium cepa* nos diferentes tratamentos em 4000 células; porcentagem de cada tratamento. (PA/PT= ponte em anáfase e/ou telófase; MN=micronúcleo; CP= cromossomo perdido; CI=Células irregulares; %A= porcentagem de alterações).

Tratamento	PA/PT	MN	CP	CI	%A
Água destilada (T1)		2			0,05b
Glifosato 2,0% (T2)	21	4	1	99	3,07a
Etanol (T3)		5		1	0,15b
Óleo 0,20% (T4)			2	6	0,20b
Óleo 0,20% (T5)				2	0,05b
Óleo 0,20% (T6)				2	0,075b
Óleo 0,20% (T7)				6	0,15b
Óleo 0,20% (T8)			2		0,05b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade de erro; T1= água destilada; T2= glifosato 2,0%; T3= etanol; T4= Condutividade elétrica de $1dSm^{-1}$; T5= período de 50 dias sob condições salinas; T6= período de 40 dias sob condições salinas; T7= período de 30 dias sob condições salinas; T8= período de 20 dias sob condições salinas. CV%= 31,70%.

As alterações observadas nos óleos essenciais de alecrim a 0,20% foram células irregulares como, por exemplo, células binucleadas e cromossomos perdidos, sendo a primeira citada com maior ocorrência. O aparecimento de células binuclea-

das pode representar uma falha no processo de citocinese. (Holland et al., 2008). Segundo Lucio Neto (2011) com o aparecimento dessa irregularidade tem-se uma previsão de que no processo de diferenciação celular pode ocorrer algum erro, além dessa anormalidade ser indicadora de agentes genotóxicos (Figura 1).

Por sua vez os cromossomos perdidos podem posteriormente originar micronúcleos, que são formados a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose, podendo essas células resultar em eventos genotóxicos. (Stich et al., 1984; Palazzo, 2011).

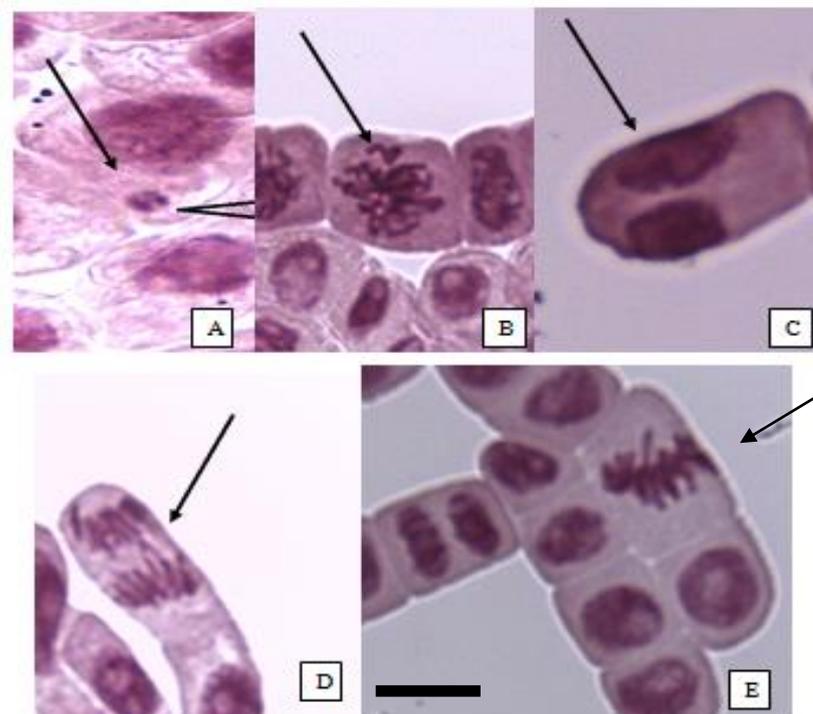


FIGURA 1: As setas em A e D indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* submetidas ao glifosato; as setas em B indicam as alterações cromossômicas nas células de *Allium cepa* observadas no óleo essencial de alecrim a 0,20% extraído a partir das plantas que permaneceram por um maior período de salinidade; Na figura C as setas indicam as alterações cromossômicas observadas no óleo essencial a 0,20 % extraído das plantas testemunhas; A figura E mostra células em divisão celular regular A) micronúcleo; B) célula em metáfase com cromossomo perdido; C) célula irregular(binucleada); D) célula em anáfase com ponte; E) célula em metáfase regular. Escala = 10 μ m.

Faria (2005) analisando aspectos comportamentais tóxicos do óleo essencial do alecrim também em camundongos mostrou que o mesmo é seguro até uma dose de 5000mg/kg.

As plantas de alecrim cultivadas por um maior período de salinidade, em ambiente protegido fora do solo em condições locais, produzem um óleo essencial que

mesmo em baixa concentração (0,20 %), possui efeito antiproliferativo e não genotóxico, podendo assim aumentar o interesse para a produção de fármacos. Os compostos majoritários do óleo essencial de alecrim são; a cânfora, 1,8 cineol, verbena, α -pineno e β -mirceno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Illinois USA. 1995. 456p.

BATISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista brasileira Biociências**, v.11, n.3, p.338-348, 2013. Disponível em:< <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2457>> Acesso em: 21 dez. 2015.

BERWICK, A. **Os 24 óleos essenciais**. In: Aromaterapia holística. 2ed. Rio de Janeiro: Nova Era, 1998, p.166-169.

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.

BRASILEIRO, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família” Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.44, n.4, p.629-636, 2008.

BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7879-7885, 2007.

CAMPAROTO, M.L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.1, p.85-89, 2002

DINIZ, R.C.; RIBEIRO, P.G.F. **Alecrim**. In: Plantas aromáticas e medicinais. 1ed. Londrina: IAPAR, 2008. p.60-61.

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.

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

FARIA, L.R.D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) atividade antiinflamatória e analgésica.** 2005. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)–Unifenas, Alfenas.

FEIJÓ, A.M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de plantas medicinais.** v.14, n.1, p 50-56, 2012.

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

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

FRESCURA, V.D.S et al. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. **Biocell**, v.37, n.2, p.23-28, 2013.

FRESCURA, V.D.S. **Parâmetros fitoquímicos, genotóxicos e de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio.** 2014. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria

GUERRA, M; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** São Paulo: Funpec, 2002.131p.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for bio-monitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v.659, n.2, p 93-108, 2008.

LUCIO NETO. M.P. **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3- (2-cloro-6-fluorobenzil) imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas.** 2011.129p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Piauí, Teresina..

LUZ, A.C. et al. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste in vivo. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.4, p.635-642, 2012.

PALAZZO, R.P.; MALUF,S.W.Técnicas micronúcleo com bloqueio da citocinese celular.In: MALUF,S.W.;RIEGEL,M. et al. **Citogenética Humana.** 1ed. Porto Alegre: ARTMED, 2011, p.180-193 .

PASQUALLI, M. et al. Potencial antiproliferativo e genotóxico de extratos de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.21, p.2365-2372, 2015.

PINHO, D.S. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.165-170, 2010.

SMEH-SKRBIN, A et al., Naphthalene in the treatment of patients with atopic dermatites. **Acta Dermatovenerol Croat**, v.15. n.1. p.9-15, 2007.

SOUZA, L.F.B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v.67, n.6, p.871-877.2010.

STICH, H.F. et al. 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, n.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. **Biindicator 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.

YUAN, J.W. et al. Synthesis and biological evaluation of compounds which contain pyrazole, thiazole and naphthalene ring as antitumor agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, n.10, p.2324-2328, 2014

DISCUSSÃO

Os resultados atuais relativos aos diferentes períodos de salinidade em cultivo sem solo do alecrim mostraram maior produção de fitomassa e rendimento do óleo essencial quando essas plantas foram cultivadas sob baixa condutividade elétrica (1dSm^{-1}). Como a alta condutividade elétrica da solução nutritiva pode vir a dificultar a absorção de água pela planta (SCHOSSLER. et al., 2012), era de se esperar que a produção de fitomassa diminuísse. Em outras plantas condimentares como *Melissa officinalis* L. foi obtida maior produção de fitomassa fresca e seca com o aumento da lâmina d'água aplicada, porém a produção de óleo diminuiu (MEIRA et al., 2013). A literatura demonstra também que grande parte das plantas que são utilizadas para fins medicinais responde às condições adversas aumentando sua produção de metabólitos secundários o que não foi observado no presente trabalho. (MORAIS, 2009; MEIRA et al., 2013). Entretanto, observa-se que as plantas que foram cultivadas com solução nutritiva de baixa condutividade elétrica obtiveram um rendimento de óleo essencial superior ao encontrado em cultivos feitos no campo na região sudeste do Brasil (MAY et al., 2010). Isso pode ser devido a que o cultivo protegido e sem solo possibilita um maior controle de variáveis meteorológicas como temperatura, radiação solar, vento, chuvas e permite também otimizar a disponibilidade de água e de nutrientes, traduzindo-se em ganho na produção (SILVA, 2014). Sendo assim o cultivo em ambiente protegido sem solo pode ser uma boa alternativa para produção dessa espécie, principalmente na região Sul do Brasil, onde há uma grande ocorrência de chuvas e de baixas temperaturas, fatores esses que prejudicam a produção do alecrim.

Além de terem sido avaliados a biomassa e o óleo essencial, também foram analisados o efeito do óleo essencial de alecrim sobre o ciclo celular e material genético de *Allium cepa* L. obtidos das plantas cultivadas em diferentes períodos de salinidade coletadas aos 190 dias após o plantio.

O efeito do óleo essencial foi analisado na concentração de 0,20 % a qual só apresentou efeito antiproliferativo o óleo extraído das plantas que permaneceram por mais tempo sob condições de salinidade. Esse resultado deve estar relacionado à composição do óleo, tendo em vista que um período maior de salinidade proporcionou ao óleo essencial aumento significativo nos teores de algumas substâncias como: o naftaleno que segundo alguns autores tem efeito antiproliferativo. (YUAN et

al., 2014; SMEH-SKRBIN et al., 2007). No entanto, estudos sobre o efeito individual das substâncias encontrada na composição do óleo essencial de alecrim no material genético de *Allium cepa*, poderá esclarecer quais compostos que possuem maior envolvimento na inibição da divisão celular, ressaltando ainda que pode estar ocorrendo sinergia de compostos químicos dessa espécie.

Quanto aos compostos majoritários não houve diferença entre os diferentes tratamentos sendo eles; a cânfora, 1,8 cineol, verbenona, α -pineno e β -mirceno.

O óleo essencial de alecrim na concentração de 0,20 % não foi considerado genotóxico, tendo em vista que o número de alterações cromossômicas diferiu do glifosato 2 % (controle positivo).

O resultado do presente estudo indica que o manejo das condições ambientais durante o período de crescimento e desenvolvimento das plantas pode interferir na composição química de metabólitos secundários, podendo ser um fator importante para a produção de fármacos. Pesquisas mais aprofundadas devem ser feitas com esse objetivo, tanto com plantas de alecrim ou com outras espécies de plantas condimentares.

CONCLUSÃO

Em condições de salinidade (condutividade elétrica de 5 dS m^{-1}) as plantas de alecrim reduz a produção de fitomassa e o rendimento do óleo essencial.

Os compostos majoritários do óleo essencial de alecrim são; a cânfora, 1,8 cineol, verbenona, α -pineno e β -mirceno.

O óleo essencial do alecrim a uma concentração de 0,20%, não apresenta efeito genotóxico e nem efeito antiproliferativo, com exceção do óleo que foi extraído a partir das plantas que permaneceram por 50 dias sob condições de salinidade, o qual inibe a divisão celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARES, C.A, et al. Koppen's climate classification map for Brazil Meteorologische Zeitschrift, v.22, n.6, p.711-728. jan. 2014. Disponível em: <<https://www.schweizerbart.de/journals/metz> >. Acesso 28 novembro 2015.
- ANDRIOLO, J.L. **Fisiologia das culturas protegidas**. 1.ed. Santa Maria: UFSM, 1999,142p.
- ATIENZA,S.G. et al. Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. **Plant Science** [S.l]: v.167, n.6, p.1359-1365, july. 2004.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, v. 3. 1991.
- BEGATINI, M.D.; SILVA. A.C.F.; TEDESCO.S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, PB, v.17, n.3, p.444-447, set, 2007.
- BOTREL, P. P. et al. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**. Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p.33-37. nov, 2010.
- BEZERRA, D.A.C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (wild) poiret e *piptadenia stipulacea* (benth) ducke**. 2008. 49p Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2008.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Descrição de algumas plantas aromáticas**. In: Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial. 1.ed.Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora, 2009, 33-38p.
- 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, may, 1999.
- CARVALHO,L.M.; COSTA.J.A.M.; CARNELOSSI.M.A.G. **Qualidade em plantas medicinais**.Aracajú: Emprapa Tabuleiro Costeiros.Sergipe, 2010.Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf> Acesso em: 22 novembro 2015.
- COSCOLIN, R.B,S. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos induzidos por deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L**. 2012. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Irrigação e Drenagem)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.

COSTA, P.C. et al. Condutividade elétrica da solução nutritiva e produção de alface em hidroponia. **Scientia Agricola**, [S.l.], v.58, n.3, p.595-597, jul./set. 2001

DIAS, N.S.; BLANCO, F.F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. In:Tolerância das plantas à salinidade: Efeitos dos sais no solo e na planta. 1.ed. Fortaleza: INCT Sal, 2010. 472p.

DIAS, M.G. et al. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.16, n.2, p.202-208, abr/jun, 2014.

ESTEVEZ, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Ecologia Brasileira**, São Paulo, v.12, n.4, p.662-679, nov, 2008.

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.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 84, n. 3, p. 69- 74, abr, 2003.

FARIA, L.R.D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.(alecrim) atividade antiinflamatória e analgésica**. 2005. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)—Unifenas, Alfenas, MG, 2005.

FERNANDES, L.M. **Avaliação da atividade genotóxica de extratos e do alcaloide indol-monoterpênico obtidos das raízes de *Galianthe thalictroides* (rubiaceae)**. 2011. 74p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste)- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2011.

FERRARI, G.N. et al. **Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)** 1ed. Piracicaba: ESALQ-Divisão de Biblioteca, 2011. 33p. (Série Produtor Rural 49).

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

FRESCURA, V.D. et al. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. **Biocell**. Mendoza, v.37, n.2, p.23-28, ago, 2013.

FRESCURA, V.D.S. **Parâmetros fitoquímicos, genotóxicos e de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio**. 2014. 111f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

GADANO, A. et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*L. **Journal Ethnopharmacol.** [S.l.], v.81, n.1, p.11-16, jun, 2002.

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

HUANG, M. T. et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents, carnosol and ursolic acid. **Cancer Research**. [S.l.], v.54, n.3, p.701-708, feb, 1994.

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

KÖPPEN, W. Climatologia. México, DF: Fundo de Cultura Económica. 1948. 71p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2.ed. São Paulo. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, 512p.

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**, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, jun, 2010.

MEIRA, M.R., et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.43, n.5, p.779-785, fev, 2013.

MENDES, J.S. et al. Variabilidade temporal da fertilidade, salinidade e sodicidade de solos irrigados no município de Congo, PB. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, n.1, p.13-19, mar, 2008.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae**. 1994. 94f. Dissertação (Mestrado - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.4050-4063, ago, 2009. CD-ROM.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira Farmacognosia**. João Pessoa, v.17, n.1, p.108-113, jan/mar, 2007.

PAULA, R.P. et al. Sistema teste de *allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade em *aristolochia elegans mast.*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.11, n.21, p.1749-1756, jun, 2015.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.

PURVES, D. et al. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**. [S.l.], v.10, n. 4, p. 297-312, 1995.

RAGAGNIN, R.C.G. **Efeito do estresse salino no crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. 2013. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais)-Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN, 2013.

SANTOS, O.S. **Cultivo sem solo: hidroponia**. 1.ed. Santa Maria: UFSM/CCR, 2000. 107p.

SMEH-SKRBIN, A et al. Naphthalene in the treatment of patients with atopic dermatites. **Acta Dermatovenerol Croat**. [S.l.]. v.15, n.1, p.9-15, 2007.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais, potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.16, p.38-43, set/out, 2000.

SILVA, B.A.; SILVA, A.R.; PAGIUCA, L.G. **Cultivo protegido**. 2014. Disponível em:<http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/132/mat_capa.pdf> Acesso 04 dezembro 2015.

SCHOSSLER, T.R. et al. Salinidade: efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v.8, n.15, p.1563-1578, nov, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 915p.

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

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, june, 2003.

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

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994, 238p.

YUAN, J.W et al. Synthesis and biological evaluation of compounds which contain pyrazole, thiazole and naphthalene ring as antitumor agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. [S.l.], v.24, n.10, p.2324–2328, apr, 2014.